

Mécanismes de régulation de la traduction lors de la tumorigenèse pancréatique

Maxime Libert

Mai 2024

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques

Secteur des sciences de la santé

Membres du jury de thèse

Promoteur

Professeur JACQUEMIN Patrick - Université catholique de Louvain

Membres internes

Professeure DECOTTIGNIES Anabelle (Présidente) - Université catholique de Louvain

Professeur LEMAIGRE Frédéric - Université catholique de Louvain

Professeur MICHIELS Thomas - Université catholique de Louvain

Membres externes

Professeur REAL Francisco - Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Espagne)

Professeur CLOSE Pierre - Université de Liège (Belgique)

Table des matières

Membres du jury de thèse.....	3
Résumé.....	7
Abréviations.....	11
Introduction.....	19
1. Structure et fonctions du pancréas.....	20
a. Composants exocrines.....	20
b. Composants endocrines.....	22
2. Néoplasie intraépithéliale et adénocarcinome canalaire du pancréas.....	23
a. Modèle de progression pathologique du cancer.....	23
b. Etiologie et facteurs de risque.....	27
c. Mutations et voies de signalisation de KRAS.....	28
d. Modèles murins de PanIN et de PDAC.....	31
e. Traitements du PDAC.....	34
3. Synthèse protéique.....	37
a. Traduction.....	37
o Initiation.....	37
o Elongation.....	40
o Terminaison.....	41
b. Ribosomes and leur biogenèse.....	42
o Composition des ribosomes.....	42
o Synthèse des protéines ribosomales.....	42
o Synthèse et processus de maturation des rRNA.....	44
c. Synthèse des protéines transmembranaires et sécrétées.....	46
o Repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique, UPR et ERAD.....	46
o Glycosylation des protéines.....	47
d. Mécanismes de contrôle de la traduction.....	49
4. Protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2.....	51
a. Introduction.....	51
b. Structure.....	51
c. Rôles physiologiques.....	53
d. Rôles dans le cancer.....	53
o Rôles en lien avec la traduction.....	53
o Rôles dans les voies de signalisation.....	55
e. Rôles dans les granules de stress.....	56
Objectifs de la thèse.....	58
Résultats.....	60
I. Combinaison inattendue d'une augmentation de la traduction des protéines et d'une diminution du stress du réticulum endoplasmique au cours de l'initiation du cancer du pancréas.....	62
a. Abstract.....	64
b. Introduction.....	65
c. Results.....	67

d.	Discussion.....	80
e.	Materials and methods.....	83
f.	References.....	89
II.	Aucune preuve de la présence et du contrôle de la croissance tumorale par les granules de stress dans les cancers porteurs d'une mutation Kras.....	91
a.	Abstract.....	93
b.	Introduction.....	94
c.	Results and discussion.....	96
d.	Supplemental figures.....	107
e.	Materials and methods.....	109
f.	References.....	113
III.	L'inactivation génétique des protéines de liaison à l'ARN G3BP1/2 entrave la tumorigenèse pancréatique.....	121
a.	Abstract.....	122
b.	Introduction.....	123
c.	Matériels et méthodes.....	124
d.	Résultats.....	133
e.	Discussion.....	147
f.	Figures supplémentaires.....	152
	Discussion et perspectives.....	155
I.	Synopsis.....	156
II.	Régulation de la synthèse protéique lors de l'initiation tumorale pancréatique.....	156
III.	Rôles des granules de stress renforcés par KRAS dans la tumorigenèse pancréatique.....	160
IV.	Rôles des protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2 dans la tumorigenèse pancréatique.....	163
a.	Rôles de G3BP1/2 en lien avec la traduction.....	164
b.	Rôles de G3BP1/2 via la régulation d'ARNm.....	165
V.	Modèles cellulaires et murins de tumorigenèse pancréatique.....	170
VI.	Rôles de G3BP1 et de G3BP2 dans le contrôle de la synthèse protéique des cellules métaplasiques.....	172
VII.	Rôles de G3BP1 et de G3BP2 dans le transport nucléaire des cellules acinaires.....	172
VIII.	Perspectives de traitements du PDAC ciblant G3BP1 et G3BP2.....	174
	Annexes.....	179
	Références.....	227

Résumé

Les cellules acinaires synthétisent et sécrètent des quantités importantes de protéines, principalement des enzymes digestives telles que la trypsine et l'amylase, présentant de ce fait un niveau exceptionnellement élevé de capacité de traduction. Dans des conditions pathologiques, il a été établi, à l'aide de modèles murins, que le dérèglement des cellules acinaires conduit au développement de tumeurs pancréatiques par le biais d'une métaplasie acino-canaire (ADM), entraînant la formation de lésions néoplasiques connues sous le nom de néoplasie intraépithéliale du pancréas (PanIN). Ces lésions constituent l'un des précurseurs de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC). Alors que de nombreux mécanismes de contrôle transcriptionnel ont été identifiés au cours de la tumorigénèse pancréatique, les mécanismes de régulation de la traduction sont encore largement inconnus. Dans mon travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de ces mécanismes en utilisant deux approches différentes.

Ma première étude a cherché à comprendre de quelle façon la traduction était contrôlée lorsque la tumorigénèse est initiée à partir des cellules acinaires du pancréas, sachant que ce type cellulaire montre une capacité exceptionnellement élevée de synthèse protéique, et que les cellules cancéreuses présentent généralement des niveaux de synthèse protéique plus élevés que leurs homologues non cancéreuses.

Il est connu que l'initiation du cancer est associée dans de nombreux types de cellules à une augmentation de différentes voies, à savoir les niveaux de traduction, l'activité ribosomale, l'expression des facteurs d'initiation de la traduction (eIF) et le stress du réticulum endoplasmique (RE). Dans ce contexte, la question se pose de savoir comment les cellules acinaires, qui présentent notamment des niveaux élevés de stress du RE liés à ses niveaux élevés de synthèse protéique, vont adapter ces paramètres à un contexte d'initiation tumorale. En utilisant un modèle de souris qui mime l'initiation d'un cancer du pancréas, nous avons trouvé que lors de cette initiation, les cellules acinaires

peuvent encore augmenter leur niveau de synthèse protéique. Cette augmentation repose sur une élévation de la biogenèse des ribosomes et de l'expression de nombreux eIFs, comme cela a été observé dans d'autres types de cellules. En revanche, nous avons observé une diminution du stress du RE. Sachant que le stress du RE est élevé en présence d'une activité importante des enzymes de la N-glycosylation de protéines, un processus essentiel à la sécrétion, nos résultats suggèrent que cette réduction est associée à la réorganisation du programme génétique présent lors de la métaplasie acino-canalaire qui entraîne une diminution des enzymes de la N-glycosylation. Ainsi, ce travail fournit des preuves de l'adaptation spécifique au pancréas de la régulation de la traduction au cours de la tumorigenèse, qui est caractérisée par la combinaison inattendue d'une augmentation du taux de synthèse des protéines et d'une diminution du stress du RE. Cela met en évidence la diversité et les capacités adaptatives des mécanismes de traduction des protéines dans les tissus en transformation.

Ma seconde étude a été consacrée aux rôles de deux protéines de liaison à l'ARN (RBP) impliquées dans le contrôle de la traduction au cours de la tumorigenèse pancréatique. Nous avons initialement découvert une augmentation de l'expression de deux RBP, nommés G3BP1 et G3BP2, dans les PanIN par rapport aux cellules acinaires. De manière intrigante, cette augmentation s'accompagne d'un changement de localisation cellulaire, G3BP1 et G3BP2 passant d'une localisation principalement périnucléaire dans les cellules acinaires, qui suggère un rôle potentiel dans le transport nucléaire, à une localisation cytoplasmique dans les PanIN. Afin d'explorer leur rôle dans le cancer du pancréas, nous avons inactivé génétiquement leur expression dans un modèle d'initiation tumorale pancréatique à l'aide de CRISPR/Cas9. L'inactivation de l'une ou l'autre des isoformes dans les cellules acinaires ne perturbe pas l'initiation tumorale. En revanche, l'absence combinée de G3BP1 et de G3BP2 réduit fortement la formation des lésions précancéreuses PanIN. Cette réduction pourrait être attribuée à une régulation de la traduction de certains ARNm. Cette étude montre la redondance fonctionnelle de G3BP1 et G3BP2, et soutient un rôle pro-oncogénique des deux protéines dans la tumorigenèse pancréatique. Dans une étude indépendante, nous avons par ailleurs

montré que ce rôle ne passait pas par la présence de G3BP1 et G3BP2 dans les granules de stress, des organelles cytoplasmiques potentiellement impliquées dans la progression tumorale.

Abréviations

Acronyme	Nom en français	Nom en anglais
15-d-PGJ2	15-déoxy-delta-12,14-prostaglandine J2	15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2
3'UTR	Région Non-Traduite en 3'	3' Untranslated Region
4E-BP1/2	Protéine de liaison du facteur 4E d'initiation de la traduction eucaryote ½	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-binding protein ½
5' TOP	Motif oligopyrimidine terminal 5'	5' terminal oligopyrimidine motif
α-SMA	Actine musculaire lisse α	Smooth muscle actin α
AAS	Acétylcystéine	Acetylcysteine
ACN	Acétonitrile	Acetonitrile
ADM	Métaplasie acino-canalaire	Acinar-to-Ductal Metaplasia
AKT (PKB)	Protéine kinase B	Protein Kinase B
apCAF	Fibroblastes associés au cancer et présentateurs d'antigènes	Antigen-presenting cancer-associated fibroblasts
ARNr	ARN ribosomique	Ribosomal RNA
ARNt	ARN de transfert	tRNA, Transfer RNA
ATF4	Facteur de transcription activateur 4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Facteur de transcription activateur 6	Activating Transcription Factor 6
ATP5B	ATP Synthase F1 Sous-unité Beta	ATP Synthase F1 Subunit Beta
ATXN2L	Protéine semblable à l'ataxie 2	Ataxine 2-like
BART	Ligan d'Arl Deux	Binder of Arl Two
BMI	Indice de masse corporelle	Body Mass Index
CAF	Fibroblaste associé au cancer	Cancer-associated fibroblast
CAPRIN1	Protéine associée au cycle cellulaire 1	Cell Cycle Associated Protein 1
CCK	Cholécystokinine	Cholecystokinin
CD24	Cluster de Différentiation 24	Cluster of Differentiation 24
CDK	Kinase dépendante de la cycline	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2A	Inhibiteur 2A de la kinase dépendante de la cycline	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
cGAS	GMP-AMP cyclique Synthase	Cyclic GMP-AMP Synthase
CHIP	Immunoprécipitation de la chromatine	Chromatin Immunoprecipitation

CK19	Cytokératine 19	Cytokeratin 19
COAD	Adénocarcinome colorectal	Colon Adenocarcinoma
COX-2	Cyclooxygénase-2	Cyclooxygenase-2
Cre	Recombinase Cre	Cre Recombinase
CRISPR/Cas9	Répétitions palindromiques courtes régulièrement intercalées en cluster/CRISPR-associated protein 9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9
CRS	Séquence de Rétention Cytoplasmique	Cytoplasmic Retention Sequence
CXCL1	Ligand 1 de la chimiokine à motif C-X-C	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	3,3'-Diaminobenzidine
DART-seq	Désamination adjacente aux cibles de modification de l'ARN - Séquençage	Deamination adjacent to RNA modification targets - Sequencing
DDOST	Sous-unité Dolichyl-Diphosphooligosaccharide--Protéine Glycosyltransférase	Dolichyl-Diphosphooligosaccharide--Protein Glycosyltransferase Subunit
DDX3X	DExD/H-box helicase 3, liée au chromosome X	DExD/H-box helicase 3, X-linked
DEPTOR	Protéine interagissant avec la mTOR et contenant un domaine DEP	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Sulfoxyde de diméthyle	Dimethyl Sulfoxide
DSP	Dithiobis(succinimidyl propionate)	Dithiobis(succinimidyl propionate)
ECM	Matrice extracellulaire	Extracellular matrix
EDTA	Acide éthylènediamine-tétraacétique	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGCG	Gallate d'épigallocatechine	Epigallocatechin Gallate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Récepteur du facteur de croissance épidermique
EIF	Facteur d'initiation eucaryote	Eukaryotic Initiation Factor
eIF2 α	Facteur d'initiation eucaryote 2 Alpha	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha
eIF3	Facteur d'initiation eucaryote 3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3
eIF4E	Facteur d'initiation eucaryote 4E	eukaryotic initiation factor 4E
eIF4F	Facteur d'initiation eucaryote 4F	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4F
eIF4G	Facteur d'initiation eucaryote 4G	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G
eIF5A	Facteur d'initiation eucaryote 5A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A
Ela-K	Elastase Cre recombinaison estrogen receptor-LSL KrasG12D	Elastase Cre recombinaison estrogen receptor-LSL KrasG12D

ELAVL1	Protéine de liaison à l'ARN de type ELAV-1	ELAV-like RNA-binding protein 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmic Reticulum	Endoplasmic Reticulum
ERAD	Dégradation associée au RE	ER-associated Degradation
ERK	Kinase régulée par le signal extracellulaire	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FACS	Tri cellulaire activé par fluorescence	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Sérum bovin fœtal	Fetal Bovine Serum
FDR	Taux de fausse découverte	False Discovery Rate
FG	Phénylalanine et glycine	Phenylalanine and glycine
G3BP	Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein	Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein
G3BP1	Protéine de liaison de la protéine activatrice de la GTPase Ras 1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
G3BP2	Protéine de liaison de la protéine activatrice de la GTPase Ras 2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2
GANAB	Alpha-glucosidase neutre AB	Neutral alpha-glucosidase AB
GAP	Protéine activant la GTPase	GTPase-activating protein
GAS5	Growth Arrest-Specific 5	Growth Arrest-Specific 5
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de nucléotides de guanine	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GEPIA2	Analyse interactive des profils d'expression génétique 2	Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2
GFP	Protéine fluorescente verte	Green Fluorescent Protein
GHR	Ghréline	Ghrelin
GNAS	Protéine G alpha stimulatrice	Guanine Nucleotide-Binding Protein G(s) subunit alpha
GRP78	Protéine régulée par le glucose 78	Glucose Regulated Protein 78
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosine triphosphate
GTPase	Protéine activatrice de la GTPase	Guanosine Triphosphatase
HBSS	Solution saline équilibrée de Hank	Hank's Balanced Salt Solution
HDGF	Facteur de croissance dérivé de l'hépatome	Hepatoma-Derived Growth Factor
HE	Hémalun-Éosine	Hematoxylin-Eosin
HEK293	Cellules 293 de rein embryonnaire humain	Human Embryonic Kidney 293 cells
HeLa	Henrietta Lacks	Henrietta Lacks

HES1	Hairy and Enhancer of Split 1	Hairy and Enhancer of Split 1
HNF1β	Facteur de transcription hépatique 1β	Hepatocyte Nuclear Factor 1β
HNF6	Facteur de transcription hépatique 6	Hepatocyte Nuclear Factor 6
HRI	Kinase eIF2 Alpha régulée par l'hème	Heme-Regulated eIF2 Alpha Kinase
HRP	Peroxydase de raifort	Horseradish Peroxidase
HSC70	Choc Thermique Apparenté 70	Heat Shock Cognate 70
HSPA	Protéine de choc thermique A	Heat Shock Protein A
iCAF	Fibroblastes inflammatoires associés au cancer	
ICMT	Isoprénylcystéine carboxyl méthyltransférase	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
IDR	Domaine Intrinsèquement Désordonné	Intrinsically Disordered Region
IF	Immunofluorescence	Immunofluorescence
IGF-II	Facteur de croissance analogue à l'insuline II	Insulin-Like Growth Factor II
IgG	Immunoglobuline G	Immunoglobulin G
IHC	Immunohistochimie	Immunohistochemistry
IL-1β	Interleukine-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukine-6	Interleukin-6
IP	Immunoprécipitation	Immunoprecipitation
IPMN	Néoplasme mucineux papillaire intracanalair	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
IRE1α	Enzyme 1 alpha nécessitant l'inositol	Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha
IRES	Site d'entrée du ribosome interne	Internal Ribosome Entry Site
IκBα	Inhibiteur de la kappa B alpha	Inhibitor of kappa B alpha
JAK	Janus Kinase	Janus Kinase
KEGG	Encyclopédie de Kyoto sur les gènes et les génomes	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO	Knockout	Knockout
KPE	Lignée cellulaire de carcinome pancréatique obtenues à partir d'une souris ElaKP	Pancreatic carcinoma cell line obtained from an ElaKP mouse
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LARP1	Protéine liée à la La 1	La-related protein 1
LINC01554	ARN Non Codant Long 01554	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1554
lncRNA	ARN non codant long	Long Non-Coding RNA
LUAD	Adénocarcinome pulmonaire	Lung Adenocarcinoma

Man1a	Mannosidase Alpha de classe 1	Mannosidase Alpha Class 1
MAPK	Protéine kinase activée par le mitogène	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2	Murine Double Minute 2	Murine Double Minute 2
MEK	Kinase extracellulaire régulée par le signal mitogène	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité	Major histocompatibility complex
MS	Spectrométrie de masse	Mass Spectrometry
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem	Tandem Mass Spectrometry
mTOR	Cible mammalienne de la rapamycine	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Complexe 1 de la cible mammalienne de la rapamycine	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
myCAF	Fibroblastes myofibroblastiques associés au cancer	Myofibroblast-like cancer-associated fibroblasts
NAC	N-acétylcystéine	N-acetylcysteine
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B	Nuclear Factor-kappa B
N-glycosylation	Glycosylation glycosylation liée à l'asparagine	Asparagine-linked glycosylation
NLS	Séquence de signal nucléaire	Nuclear Localization Signal
NTF2	Facteur de transport nucléaire 2	Nuclear Transport Factor 2
NTF2-like	Facteur de transport nucléaire de type 2	Nuclear Transport Factor 2-Like
NUFIP2	Protéine nucléaire interagissant avec le syndrome de l'X fragile 2	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2
NUP	Nucléopore	Nucleoporin
OCT4	Protéine de liaison à l'octamère 4	Octamer-Binding Protein 4
p53	Protéine 53	Protein 53
PABPC1	Protéine de liaison au polyadénylate 1	Polyadenylate-binding protein 1
PanIN	Néoplasie intraépithéliale du pancréas	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate	Phosphate-buffered saline
PCR	Réaction en chaîne par polymérase	Polymerase Chain Reaction
PDEδ	Phosphodiesterase δ	Phosphodiesterase δ
PDAC	Adénocarcinome canalaire pancréatique	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PDI	Protéine disulfure isomérase	Protein Disulfide Isomerase
PDK1	Protéine kinase dépendante de la phosphoinositide	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1

Pen. Strep.	Pénicilline-Streptomycine	Penicillin-Streptomycin
PERK	Protéine Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase	Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PERK	Kinase du RE de type PKR	PKR-like ER kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Phosphoinositide 3-kinase
PIC	Complexe de pré-initiation	Pre-Initiation Complex
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKC	Protéine kinase C	Protein Kinase C
PKR	Protéine Kinase R	Protein Kinase R
PLC	Phospholipase C	Phospholipase C
PMP22	Protéine 22 de la Myéline Périphérique	Peripheral Myelin Protein 22
Pol	ARN polymérase	RNA Polymerase
POI	Protéine d'intérêt	Protein of interest
PROTAC	Chimères ciblant la protéolyse	Proteolysis-targeting chimeras
PTBP3	Protéine de liaison au tract polypyrimidique 3	Polypyrimidine tract-binding protein 3
qPCR	PCR quantitative	Quantitative PCR
RanBP2	Protéine de liaison 2 à RAN	RAN Binding Protein 2
RBD	Domaine de liaison aux récepteurs	Receptor Binding Domain
RBM25	Protéine du motif de liaison à l'ARN 25	RNA-binding motif protein 25
RBP	Protéine de liaison à l'ARN	RNA-Binding Protein
RCE1	Enzyme de conversion de la Ras 1	Ras-converting enzyme 1
RICTOR	Compagnon de mTOR insensible à la rapamycine	Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR
RPS6	Protéine ribosomale S6	Ribosomal Protein S6
RRM	Domaine de reconnaissance de l'ARN	RNA Recognition Motif
RRN3	Facteur d'initiation de la transcription spécifique à l'ARN polymérase I	RNA polymerase I-specific transcription initiation factor
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative PCR	Reverse Transcription Quantitative PCR
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase	Receptor Tyrosine Kinase
S6K	S6 Kinase	S6 Kinase
SA-β-Gal	Bêta-galactosidase sénescence associée	Senescence-Associated Beta-Galactosidase
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEM	Microscopie électronique à balayage	Scanning Electron Microscopy
siRNA	Petits ARN interférents	Small Interfering RNA
SMAD4	Mères contre l'homologue décapentaplégique 4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
SOX9	Facteur de transcription SRY(Région Y déterminant le sexe)-Box 9	SRY (Sex Determining Region Y)-Box Transcription Factor 9
SRP	Reconnaissance du signal Particule	Signal Recognition Particle
STAT	Transducteur de signal et activateur de transcription	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tampon Tris Saline	Tris Buffered Saline
TBST	Tampon Tris Saline Tween	Tris Buffered Saline Tween
TCA	Acide trichloracétique	Trichloroacetic Acid
TCGA	L'atlas du génome du cancer	The Cancer Genome Atlas
TGF- α	Facteur de croissance transformant alpha	Transforming Growth Factor-alpha
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta	Transforming Growth Factor-beta
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha	Tumor Necrosis Factor-alpha
TOPII α	Topoisomérase II α	Topoisomerase II α
UPR	Réponse aux protéines non repliées	Unfolded Protein Response
UPS	Système d'ubiquitine-protéase	Ubiquitin-protease system
USP10	Peptidase spécifique à l'ubiquitine 10	Ubiquitin-Specific Peptidase 10
UV	Ultraviolet	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot	Western Blot
WT	Sauvage	Wild Type
YFP	Protéine fluorescente jaune	Yellow Fluorescent Protein
ZC3HAV1	Protéine antivirale de type zinc doigt CCHC 1	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1

Introduction

I. Structure et fonctions du pancréas

Le pancréas se trouve dans la partie supérieure de l'abdomen, postérieur à l'estomac et à la droite de la rate (**Figure 1**). Le pancréas est une glande exocrine qui constitue une partie du système gastro-intestinal qui produit et sécrète des enzymes digestives dans le duodénum. Il s'agit également d'un organe endocrine qui produit et sécrète des hormones dans le sang pour contrôler le métabolisme et le stockage de l'énergie dans l'ensemble du corps¹.

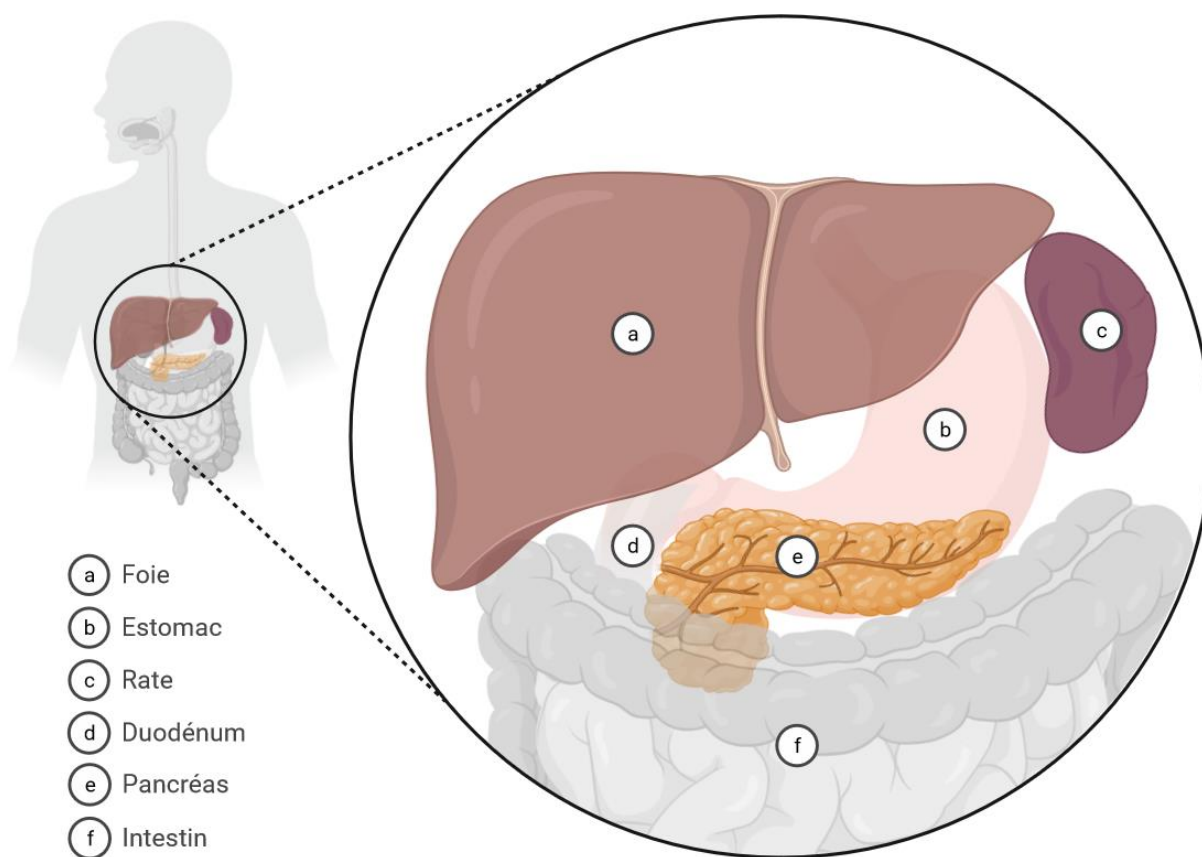


Figure 1. Localisation du pancréas, du foie, de l'estomac, de la rate, du duodénum et de l'intestin au sein de l'abdomen.

A. Composants exocrines

Les composants exocrines représentent plus de 95% de la masse du pancréas. L'unité sécrétoire du pancréas exocrine est l'acinus, un ensemble de cellules acinaires, de cellules centroacinaires adjacentes qui font saillie dans la lumière de l'acinus, et de petits canaux proximaux. Les cellules

acinares, organisées de manière concentrique autour d'une lumière, fournissent les proenzymes et les enzymes nécessaires à la digestion des lipides, des glucides, et des protéines alimentaires dans l'intestin. Au niveau histologique, la coloration de sections par de l'hématoxyline (un colorant acidophile des noyaux) et de l'éosine (un colorant des structures basiques telles que le cytoplasme) montre la polarité des cellules acinares (**Figure 2**). Leur cytoplasme est bleuâtre dans la région basale (périnucléaire), reflétant la teneur élevée en ARN. Le cytoplasme basilaire et périnucléaire des cellules acinares contient un abondant réticulum endoplasmique rugueux (RER). Au pôle apical, le cytoplasme est éosinophile, reflétant la teneur élevée en protéines dans les granules de Golgi et de zymogène contenant les enzymes digestives. Les mitochondries sont dispersées dans tout le cytoplasme des cellules acinares, mais leur densité est plus élevée dans la partie basale et centrale de la cellule. Elles sont peu nombreuses dans le cytoplasme adjacent à la surface luminale.

La membrane cellulaire basale des acini jouxte l'espace interstitiel où se trouvent les capillaires et les terminaisons nerveuses. Les membranes latérales sont étroitement liées à celles des cellules acinares ou centroacinares adjacentes et ces membranes sont reliées par des jonctions serrées linéaires. La caractéristique la plus distinctive de la membrane luminale est la formation de microvillosités, qui sont des prolongements étroits dans la lumière de l'acinus.

Sur la face luminale du noyau, de petites vésicules de transport liées à la membrane semblent bourgeonner à partir du RER, puis rester libres dans le cytoplasme. Au centre de cette région se trouve un empilement de saccules membranaires, appelées Golgi, qui semblent naître de la fusion de multiples vésicules de transport. Du côté luminal du Golgi, les vésicules commencent à s'arrondir et à se densifier ; il s'agit de granules de zymogène naissants. Ceux-ci perdent progressivement leur membrane à mesure que leur contenu se condense pour devenir des granules de zymogène matures. Le cytoplasme apical près de la lumière acinaire est occupé par un nombre variable de granules zymogènes matures. La fusion des membranes des granules de zymogène et de la membrane cellulaire luminale adjacente est observée avant la sécrétion du zymogène dans la lumière.

Les cellules canalaire sécrètent un liquide riche en bicarbonates qui neutralisent les sécrétions acides de l'estomac, assurant ainsi le pH correct pour la digestion intestinale par les enzymes pancréatiques. Les cellules canalaire reliant les acini acheminent l'ensemble des sécrétions jusqu'au duodénum.

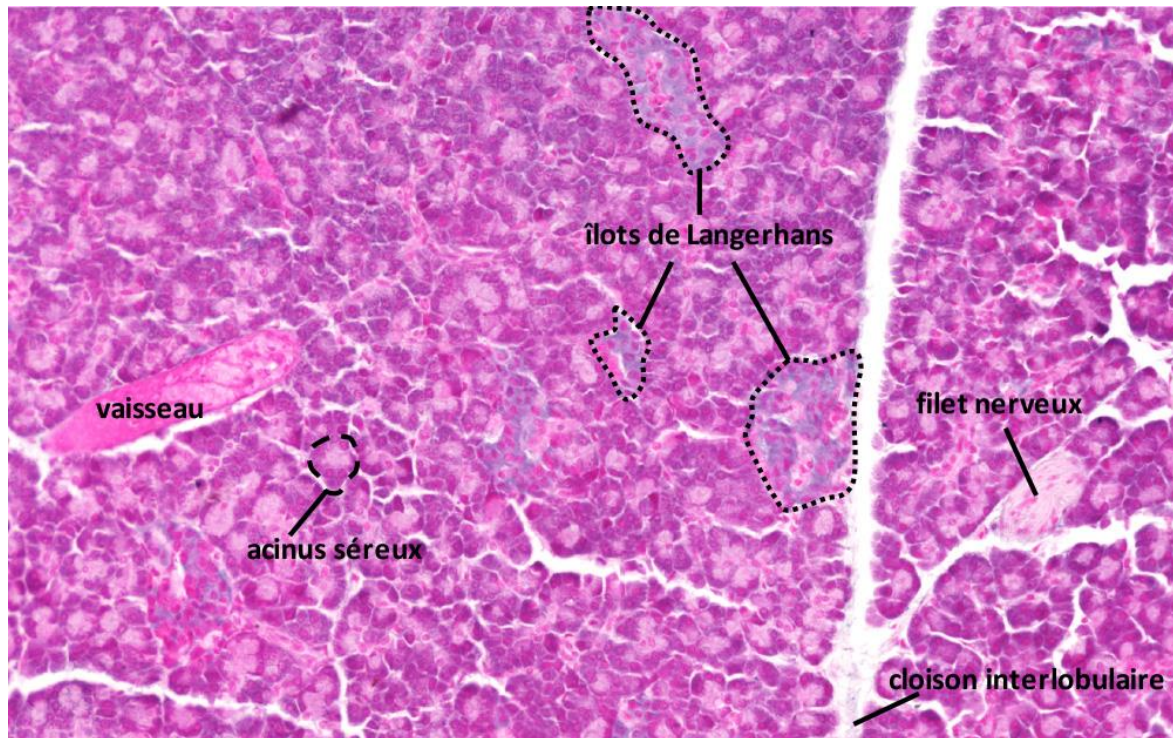


Figure 2. Coupe histologique d'un pancréas de chien, colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (<https://histologie.univ-nantes.fr/?p=29>).

B. Composants endocrines

La partie endocrine du pancréas est constituée par les îlots de Langerhans (**Figure 2**). Il s'agit d'agglomérats de cellules spécialisées parmi lesquels on trouve des cellules β , qui produisent l'insuline, et des cellules α , qui produisent le glucagon. Les autres types cellulaires des îlots synthétisent des hormones telles que la ghréline, la somatostatine, ou le polypeptide pancréatique. Le glucagon, l'insuline et la somatostatine sont des hormones cruciales pour la régulation de la glycémie. Le glucagon augmente la concentration de glucose plasmatique alors que l'insuline la diminue. De son côté, la somatostatine régule la sécrétion d'insuline et de glucagon². Le polypeptide pancréatique régule les sécrétions endocrines et exocrines^{3 4}, et enfin, la ghréline stimule l'appétit et l'apport alimentaire⁵.

II. Néoplasie intraépithéliale et adénocarcinome pancréatique canalaire du pancréas

Le sous-type de cancer du pancréas le plus courant est l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), qui représente 85% de toutes les incidences⁶. Le PDAC est l'un des cancers les plus agressifs avec un taux de survie à 5 ans d'environ 12%⁷, représentant la septième cause de décès liés au cancer⁸. Un certain nombre de facteurs contribuent à la mortalité élevée, notamment la présentation tardive de la maladie, les options thérapeutiques limitées, et l'apparition fréquente de rechutes après les résections⁹.

Le pronostic défavorable découle d'un diagnostic tardif, résultant de l'absence de symptômes aux premiers stades, ainsi que de la résistance aux traitements observée aux stades avancés¹⁰. En effet, les patients atteints de cancer du pancréas ne présentent des symptômes, tels que des douleurs abdominales, une perte de poids, une asthénie, et une anorexie, qu'à des stades avancés de la maladie. Les métastases se retrouvent principalement dans les poumons et dans les organes abdominaux, dont les plus fréquemment touchés sont le foie et la rate^{11 12}.

A. Modèle de progression pathologique du cancer du pancréas

Le profilage moléculaire couplé à l'histologie a permis de développer un modèle de progression pathologique, analogue au modèle d'adénocarcinome du côlon¹³. Dans ce modèle, les précurseurs intra-canaux sont supposés subir une progression de lésions de bas grade à des lésions de haut grade, acquérant des atypies cytologiques et des aberrations génétiques croissantes, culminant en adénocarcinomes invasifs. Trois principaux types de lésions néoplasiques, initialement non invasives, peuvent donner naissance à un PDAC : la lésion la plus fréquente, appelée néoplasie intraépithéliale du pancréas (PanIN), les néoplasmes mucineux papillaires intra-canaux (IPMN), et les néoplasmes kystiques mucineux (MCN). Les PanIN ont été bien étudiées et caractérisées, contrairement aux IPMN et aux MCN¹⁴. Les PanIN sont les lésions précurseurs les plus courantes du PDAC¹⁵. Les PanIN sont des

lésions microscopiques (< 5 mm) qui ne peuvent être que difficilement observées sur les examens d'imagerie abdominale¹⁶, et qui sont, par ailleurs, courantes dans des pancréas de sujets sains¹⁷. Elles sont papillaires ou plates et expriment des quantités variables de mucine. Les cellules composant ces lésions sont cuboïdes ou cylindriques.

Les PanIN peuvent dériver des cellules acinaires qui se transforment, en présence d'une inflammation du pancréas, en cellules semblables à un conduit cylindrique ; ce processus est appelé métaplasie acino-canaulaire (ADM)¹⁸ (**Figure 3**). Au cours de ce processus, les cellules acinaires désactivent leur programme transcriptomique acinaire, caractérisé par la présence de facteurs de transcription spécifiques (MIST1 et PTF1A, entre autres) qui contrôlent notamment l'expression des enzymes digestives, et acquièrent un programme transcriptomique canalaire. En conséquence, ces cellules semblables à des canaux expriment dès lors des marqueurs canaux et progéniteurs, tels que PDX1, HES1, HNF1 β , HNF6, CK19, et SOX9^{19 20 21}. Pendant l'ADM, les voies de signalisation embryonnaires impliquées dans le développement du pancréas sont également réactivées.

Au niveau macroscopique, les PDAC sont des lésions infiltrantes qui modifient progressivement l'architecture lobulaire du pancréas. Au niveau microscopique, le PDAC est constituée de structures glandulaires et canaux entourées d'un stroma dense. Le PDAC peut être bien ou peu différencié.

Les PDAC bien différenciés sont caractérisés par des glandes invasives distribuées de façon aléatoire ou par des structures en forme de canaux. Les cellules néoplasiques de ces canaux contiennent plus de cytoplasme éosinophile que les cellules bénignes, des noyaux ronds ou ovales avec un faible polymorphisme, et un faible rapport nucléaire/cytoplasmique. Ces structures présentent un faible nombre de mitoses et une forte production de mucine.

Les PDAC moyennement différenciés sont similaires aux PDAC bien différenciés. Cependant, elles présentent des glandes tubulaires de forme et de taille variables, ainsi que des structures de taille moyenne ressemblant à des conduits. Ces conduits ont une production de mucine plus faible, mais avec un nombre de mitoses plus élevé.

Le PDAC peu différencié est constitué de glandes denses, irrégulières, mal formées, et plus petites. Ces glandes sont composées de cellules pléomorphes présentant un polymorphisme nucléaire et un rapport nucléaire/cytoplasmique élevé. Des cellules infiltrantes peuvent également être individuellement observées. Ces structures ne produisent pas de mucine mais présentent une activité mitotique élevée^{12 22}. La composante cellulaire représente environ 10 à 20% du volume tumoral tandis que les 80 à 90% restants correspondent au stroma.

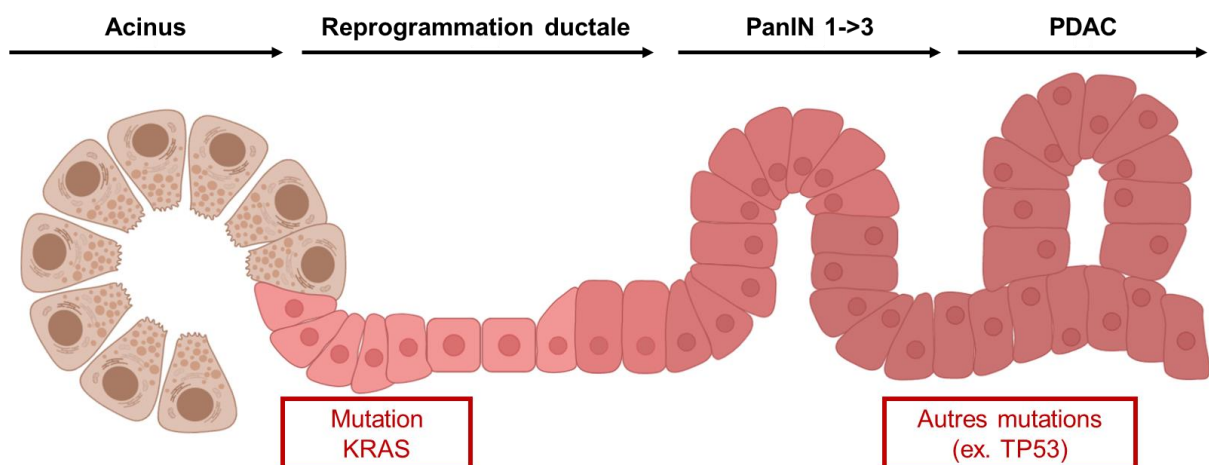


Figure 3. Initiation et progression du cancer du pancréas. La néoplasie intraépithéliale du pancréas (PanIN) peut être issue de cellules acinaires qui subissent d’abord une métaplasie acino-canaulaire, et constitue une lésion précurseur de l’adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC). Les cellules acinaires ont montré qu’elles pouvaient servir de cellules d’origine pour l’adénocarcinome canalaire du pancréas après l’acquisition de mutations oncogéniques, comme des mutations de KRAS, et/ou la perte de la fonction de suppression des tumeurs tel que TP53^{23 24}.

L’une des caractéristiques du PDAC est une réponse desmoplastique prononcée caractérisée par un microenvironnement fibrotique étendu dont le volume dépasse celui des cellules tumorales²⁵. Ce microenvironnement dense, composé principalement de fibroblastes associés au cancer (CAF), de cellules immunitaires et d’un réseau complexe de matrice extracellulaire (ECM), ne sert pas simplement d’échafaudage passif mais participe activement à la progression de la tumeur et à la formation de métastases²⁶. L’interaction entre les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral forme une boucle d’auto-renforcement. D’une part, le microenvironnement peut protéger les cellules tumorales en bloquant l’accès aux agents thérapeutiques et aux cellules immunitaires²⁷.

D'autre part, les signaux émis par les cellules tumorales peuvent inciter les cellules stromales à sécréter des facteurs de croissance et des cytokines, favorisant ainsi la croissance et la survie de la tumeur²⁸. Ces interactions complexes entre la tumeur et son microenvironnement ont des implications thérapeutiques car elles affectent l'action des médicaments administrés des rôles multiples dans la progression tumorale en favorisant l'évasion immunitaire, la résistance aux traitements et les métastases²⁹. Les CAF sont hétérogènes et peuvent être sous-classés en plusieurs populations sur la base de leurs fonctions et de leurs marqueurs. Les sous-types comprennent les CAF myofibroblastiques (myCAF), les CAF inflammatoires (iCAF) et les CAF présentateurs d'antigènes (apCAF). Les myCAF sont situés à proximité immédiate des cellules tumorales, expriment des niveaux élevés d'actine musculaire lisse alpha (α -SMA) et sont stimulés par le facteur de croissance transformant α (TGF α). Les iCAF sont situés à une distance importante des cellules malignes et expriment l'actine musculaire lisse α (α -SMA) à de faibles niveaux, mais produisent des cytokines inflammatoires, notamment l'interleukine (IL)-6 et le ligand 1 de la chimiokine à motif C-X-C (CXCL1)^{30 31 32}. Le troisième sous-type de CAF associé au PDAC, appelé apCAF, exprime le gène du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC)-II et le CD74³². Les apCAF induisent la liaison des récepteurs des cellules T aux cellules T CD4⁺, mais manquent de molécules de costimulation pour la prolifération des cellules T^{32 33}. Leur abondance est négativement corrélée au ratio CD8⁺/cellules T régulatrices dans les PDAC humaines, suggérant ainsi une fonction immunosuppressive.

L'ECM du PDAC est particulièrement dense et contribue à sa nature desmoplastique. Elle est composée de collagène, de protéoglycanes, de laminine et de fibronectine. La modification de la composition et la réticulation de l'ECM peuvent moduler le comportement des cellules tumorales, favoriser les métastases et interférer avec l'action des médicaments administrés²⁷.

Le stroma du PDAC est infiltré par une variété de cellules immunitaires. Certaines cellules immunitaires, comme les macrophages M2 et les cellules T régulatrices, favorisent la progression tumorale et l'évasion immunitaire, tandis que d'autres, comme les cellules T cytotoxiques et les cellules

NK, contrecarrent la croissance tumorale. Cependant, un microenvironnement immunosuppresseur limite souvent leur activité³⁴.

B. Etiologie et facteurs de risque

Le risque de développer un cancer du pancréas augmente avec l'âge, et les hommes ont des taux d'incidence légèrement plus élevés que les femmes³⁵. Par ailleurs, l'incidence du cancer du pancréas a augmenté au cours des dernières décennies et devrait continuer à augmenter dans les prochaines années⁷. Le tabagisme, l'obésité, le diabète de type II, l'inactivité physique, et la consommation de régimes riches en calories et en graisses, et de viande rouge, expliquent dans certains pays l'augmentation des taux d'incidence de ce cancer^{36 37 38}, comme le montre l'association entre un produit intérieur brut élevé par habitant et un nombre élevé de cas de cancer du pancréas³⁹. D'autres facteurs de risque de cancer du pancréas sont les mutations génétiques prédisposant au cancer, qu'elles soient héritées ou acquises, les syndromes familiaux⁴⁰, les kystes mucineux du pancréas⁴¹, ou encore les pancréatites aiguës et chroniques^{42 43}.

La pancréatite chronique est un syndrome pancréatique fibro-inflammatoire associé à une architecture pancréatique anormale (atrophie et fibrose glandulaire), des symptômes cliniques (par exemple, douleur) et un dysfonctionnement des organes (par exemple, insuffisance exocrine et endocrine)⁴⁴. Environ 5% des patients atteints de pancréatite chronique recevront un diagnostic de cancer du pancréas au cours des deux décennies qui suivent leur diagnostic de pancréatite^{45 46}, ce qui serait au moins en partie une conséquence de l'inflammation chronique et de l'hyperprolifération des cellules stellaires qui génèrent un microenvironnement propice à la transformation maligne⁴⁷.

La recherche de mutations génétiques a permis d'identifier dans les PanIN quatre mutations très fréquentes qui touchent les gènes KRAS, CDKN2A, SMAD4 et TP53.

Les mutations, qui conduisent à l'activation de l'oncogène KRAS et à la perte de fonction de p53, sont retrouvées respectivement dans 95% et dans 60-70% des cas de PanIN⁴⁸ alors que les fréquences des mutations génétiques de CDKN2A et de SMAD4 dans les PanIN sont de 50%. Des mutations du gène

KRAS sont observées dans la plupart des PanIN de bas grade, ce qui suggère que les mutations du gène KRAS interviennent dans l'initiation de la néoplasie exocrine⁴⁹.

TP53 code pour la protéine suppresseur de tumeur p53, un facteur de transcription activé en réponse à divers stress cellulaires, capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose dans les cellules endommagées⁵⁰. Les mutations de TP53 sont généralement des mutations faux-sens qui entraînent une perte de sa fonction^{6 13}.

C. Mutations et voies de signalisation de KRAS

Le gène KRAS code pour l'homologue de l'oncogène viral du sarcome du rat, un membre de la famille des petites GTPases de Ras. Le gène KRAS et ses deux paralogues étroitement apparentés, HRAS et NRAS, sont fréquemment mutés dans les cancers humains⁵¹. La grande majorité des mutations dans le gène KRAS sont des mutations faux-sens au niveau des trois acides aminés hautement mutables G12, G13, et Q61. Ces mutations favorisent l'état actif, lié au GTP, de la protéine KRAS⁵².

KRAS est une protéine associée à la membrane plasmique ; elle contient un site catalytique renfermant l'activité GTPase et deux régions (commutateur I et II) qui subissent un changement de conformation lors de l'échange GDP/GTP⁵³. L'extrémité C-terminale des protéines RAS est la plus divergente, et KRAS peut subir un épissage alternatif pour donner naissance à deux isoformes d'épissage, KRAS4A et KRAS4B, présentant des séquences C-terminales distinctes⁵⁴. La modification post-traductionnelle des protéines KRAS au niveau de leurs régions hypervariables implique la farnésylation d'une cystéine (par la farnesyl transférase, FTase), la protéolyse de leurs 3 acides aminés terminaux (par l'enzyme de conversion RAS 1, RCE1), et la carboxyméthylation de la cystéine farnésylée (par l'isoprénylcystéine carboxyl-méthyltransférase, ICMT) (**Figure 4**). KRAS4A est également palmitoylé car, au contraire de KRAS4B, il ne possède pas de région polybasique riche en lysine facilitant l'ancrage à la membrane plasmique⁵⁵. KRAS4B peut subir une phosphorylation médiée par la protéine kinase C (PKC) ou la protéine kinase 2 dépendante du GMPc (PKG2) qui réduit son affinité pour la membrane plasmique⁵⁶. Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles à la fonction de KRAS car elles régulent

son association à la membrane plasmique et à d'autres compartiments endomembranaires de la cellule⁵⁸.

Dans le PDAC, la transition d'un tissu normal à un tissu cancéreux semble avoir un impact plus prononcé sur la transcription de KRAS4A que sur celle de KRAS4B. Dans les tumeurs pancréatiques exprimant KRAS4A mutant, une augmentation statistiquement significative de l'abondance de transcrits a été observée, mais pas dans les tumeurs exprimant KRAS4A WT. Par rapport aux niveaux de transcription dans le tissu pancréatique normal, aucune modification statistiquement significative des niveaux de transcription de KRAS4B n'a été observée dans les tumeurs pancréatiques⁵⁹. Plus important encore, l'expression de l'isoforme endogène KRAS4A^{G12V}, en l'absence de KRAS4B^{G12V}, est suffisante pour induire des adénocarcinomes pulmonaires qui se transforment en métastases proximales en l'absence de p53⁶⁰.

Par ailleurs, l'activité de KRAS est contrôlée par des récepteurs de facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones localisés à la membrane plasmique. Ainsi, l'activation du récepteur d'un facteur de croissance stimule l'échange GDP-GTP sur KRAS, qui est facilité par une famille de facteurs d'échange de nucléotides de guanine (GEF), tel que SOS1/2 (Son of sevenless 1/2), qui sont recrutés par le biais de protéines adaptatrices liées au récepteur, telle que GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2). KRAS lié au GTP subit un changement de conformation qui permet à ses régions de commutation I et II d'interagir avec un certain nombre de protéines effectrices en aval et de les activer. Ensuite, l'hydrolyse du GTP par KRAS le ramène à son état inactif. Cette hydrolyse est une réaction intrinsèque qui est grandement accélérée par la liaison de KRAS à des protéines activatrices de la GTPase (GAP). Les mutations activatrices de KRAS altèrent soit la liaison aux GAP (mutations G12 et G13), soit l'activité GTPase intrinsèque (mutations Q61) du KRAS. Ces mutations font que KRAS est principalement lié à la GTP, conduisant à une activation constitutive des voies effectrices situées en aval de KRAS⁶¹.

L'une des principales raisons pour lesquelles les mutations du gène KRAS sont fréquemment sélectionnées dans le cancer est que le gène KRAS envoie des signaux à de multiples voies de

signalisation qui favorisent la transformation oncogénique. Ces voies comprennent notamment la voie mitogen-activated protein kinase (MAPK), la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT, les petites GTPases Rho, Rac et Ral, et la phospholipase C.

La voie PI3K/AKT inclut différents phospholipides et protéines, notamment PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1), AKT mechanistic target of rapamycin complex (mTORC), afin d'activer mTOR et AKT⁶². Une fois activées, mTOR et AKT phosphorylent plusieurs cibles protéiques.

KRAS active également la cascade des MAPK, avec tout d'abord une MAPK kinase kinase (MAPKKK), qui elle-même active une MAPK kinase (MAPKK) qui finalement active une MAPK spécifique induisant une réponse biologique. Cette voie s'active donc par des phosphorylations séquentielles⁶³. Il existe trois grandes familles de MAPK : la voie RAF-MEK-ERK, les JNK et les p38/SAP.

Ensemble, ces voies régulent la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la survie cellulaire, le métabolisme cellulaire, la motilité cellulaire et un grand nombre de programmes de transcription de gènes. En activant ces voies de manière constitutive, l'oncoprotéine KRAS confère à la cellule cancéreuse des avantages en termes de croissance, de survie, et de migration cellulaire.

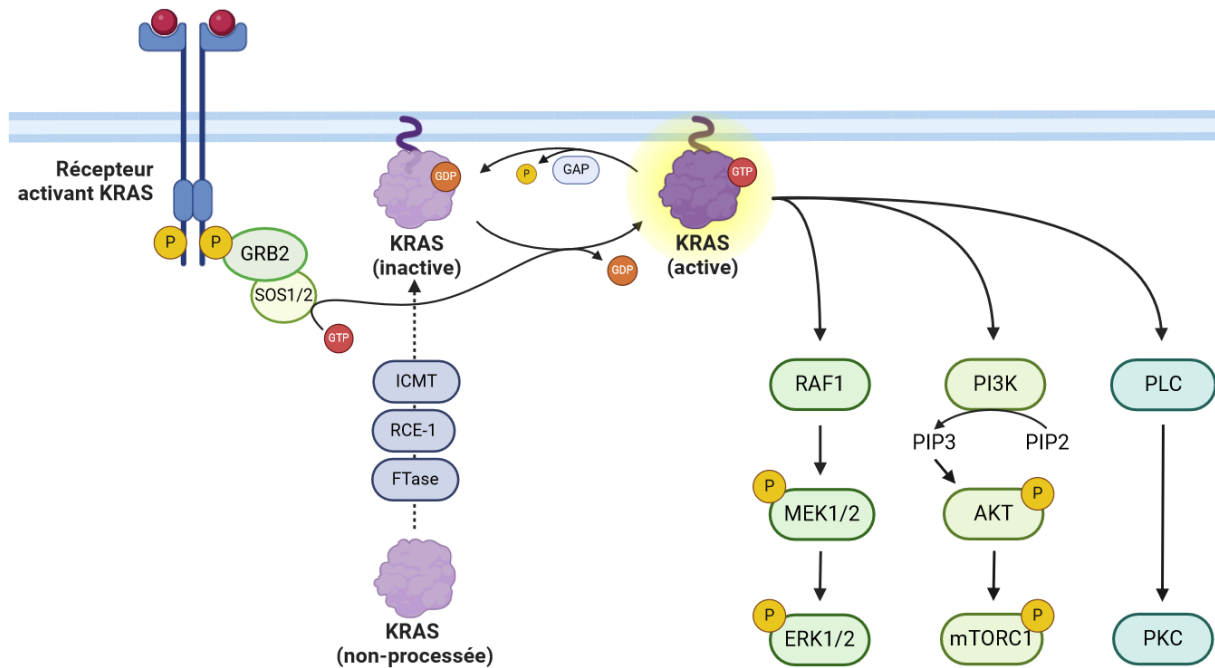


Figure 4. Protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles et les voies de signalisation de KRAS. ERK1/2 = Extracellular signal regulated kinase 1/2 ; GAP = GTPase ; GDP = guanosine diphosphate ; GTP = guanosine triphosphate ; ICMT = Isoprénylcystéine carboxyl-méthyltransférase ; KRAS = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog ; MEK1/2 = Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 ; mTORC1 = Complexe 1 de mTOR, mammalian target of rapamycin ; P = Phosphorylation ; PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase ; PIP2 = Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP3 = Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; PLC = Phospholipase C ; RAF1 = Rapidly accelerated fibrosarcoma 1 ; RCE1 = RAS converting enzyme 1 ; SOS1/2 = Son of sevenless 1/2.

Par rapport à des tumeurs ne présentant pas de mutation de KRAS, les tumeurs présentant des mutations KRAS^{G12D} sont plus fréquemment peu différenciées⁶⁴. En outre, la mutation KRAS^{G12R} est associée à une incidence accrue de tumeurs bien ou modérément différenciées. Il a été démontré que tous les sous-types de mutation du gène KRAS sont associés à un pronostic plus défavorable qu'en présence d'une absence de mutation de KRAS⁶⁵. Les patients présentant des tumeurs KRAS non-muté et des tumeurs KRAS^{G12R} survivent plus longtemps que les patients présentant des tumeurs KRAS^{G12D} ou KRAS^{Q61}. Un enrichissement des mutations KRAS^{G12D} est présent chez les patients atteints d'une maladie métastatique. De plus, la présence d'autres mutations peut contribuer aux résultats cliniques spécifiques à l'allèle KRAS. Ainsi, une survie diminuée est observée chez les patients qui combinent une mutation ARID1A et une mutation de KRAS ; par ailleurs, une mutation ARID1A est moins présente

chez les patients ayant la mutation KRAS^{G12R}. Ainsi, les différentes mutations KRAS et les co-mutations impactent le bilan clinique des patients⁶⁶. Finalement, les mutations KRAS^{G12D/V}, au contraire de KRAS^{G12R}, entraînent la macropinocytose. Cette observation est liée à l'absence d'interaction du mutant KRAS^{G12R} avec p110α PI3K (PI3Kα)⁶⁷.

D. Modèles murins de PanIN et de PDAC

Afin de comprendre le processus oncogénique induit par une mutation KRAS, des modèles murins génétiquement modifiés exprimant une forme mutée de KRAS ont été générés⁶⁸. Ces modèles comportent généralement une mutation *Kras* associée à une cassette LoxP-stop-LoxP (LSL) et insérée dans le locus endogène de *Kras*. La cassette LSL est constituée d'une séquence de terminaison de la transcription flanquée de deux sites LoxP, ce qui permet son excision après recombinaison par la Cre recombinase (Cre) ou par sa version inducible, la CreER. Cette dernière version est une protéine de fusion formée de la Cre et du domaine de liaison au ligand du récepteur aux estrogènes, dont le transfert dans le noyau, et de là son activité de recombinaison, est induit par l'injection de tamoxifène, un estrogène de synthèse⁶⁹.

Les souris LSL *Kras* muté sont croisées avec des souris exprimant la Cre ou la CreER sous la régulation d'un promoteur spécifique du type cellulaire ou de l'organe à étudier. Par exemple, le modèle Elastase (Ela)-CreER ; LSL *Kras*^{G12D/+} est un modèle où la forme mutée de *Kras* est exprimée dans les cellules acinaires pancréatiques et est utilisé pour les études sur la formation du PDAC⁷⁰. Globalement, les recherches sur le rôle de KRAS dans la tumorigenèse ont mis en lumière le rôle initiateur de la protéine mutée dans le développement tumoral. Ce rôle a été observé, par exemple, dans des études où *Kras* muté est exprimé dans le poumon (après instillation d'une Cre dans les voies respiratoires)⁷¹ ou dans le pancréas (par croisement avec des souris Pdx1-Cre ou p48-Cre où la Cre est sous la régulation transcriptionnelle de Pdx1 ou p48, gènes exprimés spécifiquement dans les progéniteurs pancréatiques)^{72 73}.

Dans ces modèles, les souris développent rarement une tumeur maligne, suggérant que les cellules acinaires matures ne peuvent pas générer de cancer suite à l'expression de KRAS mutée. La sensibilité des cellules acinaires pancréatiques à une mutation oncogénique de Kras diminue avec leur stade de différenciation, mais augmente fortement à l'âge adulte en présence d'un stimulus inflammatoire comme la pancréatite⁷⁰. En effet, la pancréatite augmente l'expression de KRAS et de ses effecteurs, expliquant son rôle dans la progression de la tumorigenèse pancréatique⁷⁴. La sensibilité à une mutation oncogène de *Kras* est également augmentée lorsque cette mutation est combinée avec une autre mutation oncogénique ou avec une mutation dans un suppresseur de tumeur, tel que *Tp53*^{70 75}.

Dans ces modèles, après induction d'une pancréatite, des lésions de type PanIN se développent en grand nombre⁷⁰. Cependant, aucun de ces oncogènes seuls ne peut induire le développement du PDAC ; l'ajout d'une mutation dans un suppresseur de tumeur conduit au PDAC⁷³. Ces observations montrent qu'une mutation survenant dans Kras conduit au développement du PDAC, si elle est associée à un contexte inflammatoire et à une autre mutation.

Chez l'humain, un contexte d'inflammation du pancréas est souvent évoqué comme un facteur de risque du cancer du pancréas ; c'est le cas dans le cadre de la pancréatite. Chez la souris, le contexte d'une inflammation du pancréas est lié au développement du PDAC, pour autant que les mutations dans les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs soient induites chez l'adulte ; cette inflammation est fréquemment générée par des injections répétées de céruléine. La céruléine est un analogue de la cholécystokinine (CCK), hormone peptidique gastro-intestinale qui augmente la sécrétion des enzymes pancréatiques. Ainsi, dans des conditions physiologiques, l'ingestion alimentaire déclenche la libération de la CCK qui va se lier à son récepteur présent notamment sur les cellules acinaires^{76 77}. Cela induit une cascade de signalisation impliquant une activation de la phospholipase C (PLC) qui induit l'activation de la protéine kinase C (PKC), stimulant ainsi des voies impliquées dans la libération des enzymes digestives.

Chez la souris, la répétition des injections entraîne une hyperstimulation des cellules acinaires qui est générée suite à l'activation d'un mécanisme de signalisation distinct de celui induit lors d'une stimulation physiologique. En effet, cette hyperstimulation entraîne la sécrétion basolatérale des granules de zymogènes, qui engendre une activation inadéquate de la trypsine, et d'autres enzymes digestives en cascade, ce qui conduit finalement à l'inflammation^{78 79}. D'un point de vue mécanistique, la PKC activée par la céruléine est la protéine responsable du changement de la sécrétion apicale à basolatérale des granules de zymogènes et module l'activation des zymogènes. De plus, l'activation de la PKC induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), IL-6 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α)), de molécules d'adhésion, et de facteurs de croissance. Les cytokines pro-inflammatoires recrutent des macrophages sur le site inflammatoire qui, une fois activés, produisent également des cytokines et des chimiokines. Cela entraîne donc un recrutement accru de cellules inflammatoires. La céruléine induit également le recrutement de neutrophiles aggravant l'inflammation⁸⁰. Ainsi, la pancréatite induite par la céruléine provoque une perturbation de la production et de la sécrétion des enzymes digestives, la vacuolisation du cytoplasme acinaire, la mort des cellules acinaires, une augmentation de la perméabilité paracellulaire, un œdème, et l'infiltration de cellules inflammatoires ; toutes ces manifestations sont également observées dans la pancréatite humaine⁸¹.

E. Traitements du PDAC

De nos jours, près de 3 patients sur 4 atteints de PDAC subissent une récurrence de la maladie dans les 2 ans, ce qui suggère que les patients qui subissent une résection sont porteurs d'une maladie micro-métastatique^{82 83}. Le mauvais pronostic du PDAC est aussi lié à un diagnostic tardif, à un stade avancé où la maladie est non résécable et métastatique⁸⁴. Peu de patients atteints de PDAC sont diagnostiqués à un stade précoce, où le cancer est potentiellement résécable, alors qu'il est bien établi qu'une détection plus précoce se traduit par une amélioration du pronostic⁸⁵.

Les options thérapeutiques dépendent de l'étendue de la maladie au moment du diagnostic. Alors que les patients présentant des tumeurs résécables au moment de la consultation subissaient traditionnellement une chirurgie, un changement de paradigme s'est récemment opéré en faveur d'une chimiothérapie néoadjuvante. Il s'agit d'un traitement systémique préopératoire, afin de réduire la masse cancéreuse et d'ainsi favoriser la résection de l'entière du PDAC⁸⁶.

Pour les patients atteints d'une maladie localement avancée ou métastatique, une chimiothérapie par FOLFIRINOX est réalisée. Il s'agit d'une combinaison de 5-fluorouracile (5-FU), de leucovorine, d'irinotécan et d'oxaliplatine. Si les patients répondent suffisamment bien, une résection peut alors être envisagée⁸⁷.

Nous sommes actuellement entrés dans une ère de médecine personnalisée, avec la sélection de biomarqueurs particuliers pour différents sous-groupes de patients. Néanmoins, il existe toujours le besoin d'améliorer les biomarqueurs prédictifs et pronostiques afin d'éclairer les décisions thérapeutiques. On prévoit que le pronostic du PDAC s'améliorera dans la prochaine décennie grâce à l'adoption plus généralisée de la chimiothérapie cytotoxique, des thérapies ciblées, et des immunothérapies sélectionnées su base de la présence de biomarqueurs spécifiques.

Les développements thérapeutiques actuels s'intéressent notamment aux mécanismes de réparation des lésions de l'ADN, à l'oncogène KRAS^{58 88}, à l'épigénétique, au microenvironnement tumoral, au métabolisme, aux cellules souches cancéreuses, à l'immunothérapie, à la thérapie cellulaire, à la vaccination, et au microbiome.

Les approches pour cibler thérapeutiquement les voies de signalisation impliquant KRAS consistent à bloquer l'activité du KRAS dans son état inactif, à entraver le trafic de KRAS vers la membrane, à bloquer l'activation des récepteurs tyrosine kinase activant KRAS, et à inhiber la signalisation des effecteurs situés en aval. Par exemple, de nombreux inhibiteurs de KRAS^{G12C}, tels que le sotorasib et l'adagrasib, ont été mis au point. Les progrès réalisés dans le ciblage de KRAS^{G12C} ont ouvert des perspectives pour le développement d'inhibiteurs à petites molécules ciblant directement d'autres

mutations de KRAS, comme le montre le développement de l'inhibiteur de KRAS^{G12D} nommé MRTX1133⁸⁹. Malgré les récents progrès réalisés dans le domaine des inhibiteurs de KRAS muté, l'émergence rapide de mécanismes de résistance empêche encore d'augmenter significativement l'espérance de vie des patients. Néanmoins, il est encourageant de constater que les thérapies combinées ont fait des progrès considérables pour surmonter cette résistance, en associant les inhibiteurs de KRAS à d'autres inhibiteurs des voies de signalisation en amont ou en aval, telles que mTOR, CDK4/6⁹⁰, EGFR⁹¹, PI3K et MEK⁹².

Les récents progrès dans la recherche de nouveaux traitements pour les cancers RAS-dépendants ont souligné le potentiel thérapeutique de chimères ciblant la protéolyse, appelées PROTAC. Elles sont conçues pour dégrader spécifiquement des protéines cibles. Ainsi, les PROTAC sont constitués de trois parties : la région de liaison à la protéine d'intérêt (POI), un linker et la région de liaison à l'ubiquitine ligase E3⁹³. Les PROTAC se lient simultanément à la ligase E3 et à la protéine cible pour former un complexe POI-PROTAC-E3 ligase, amenant la POI et la ligase E3 à proximité spatiale^{94 95}. Le détournement du système d'ubiquitine-protéase (UPS) entraîne ensuite la polyubiquitination de la protéine cible, suivie de la dégradation protéasomique de la protéine⁹⁶. En raison de l'absence d'une poche de liaison bien définie, KRAS a été considérée pendant de nombreuses années comme une protéine impossible à cibler thérapeutiquement. En revanche, les PROTAC élargissent l'horizon de la future découverte de médicaments ciblant KRAS, car ils constituent une approche intéressante pour les cibles protéiques difficiles à cibler par des inhibiteurs de petites molécules⁹⁷. Ainsi, un PROTAC appelé LC-2 qui cible KRAS^{G12C} a été mis au point. Il est composé de MRTX849 lié à un peptide recruteur. Le MRTX849 se lie de manière covalente au KRAS mutant, puis la ligase E3 est recrutée et KRAS^{G12C} est ainsi détruit par dégradation protéasomique médiée par l'ubiquitine. LC-2 entraîne ainsi une dégradation soutenue de KRAS et une inhibition de la signalisation MAPK⁹⁸. Par conséquent, ces composés représentent une approche thérapeutique prometteuse pour les cancers liés à KRAS, tels que le PDAC⁹⁹.

Une avancée thérapeutique récente des cancers porteurs de mutations dans le gène *KRAS*, tel que les cancers pancréatiques et colorectaux, est apportée par le développement du vaccin ELI-002 2P. Ce vaccin utilise une modification amphiphile des peptides mutants G12D et G12R de *KRAS* associée à un adjuvant se basant sur des oligonucléotides CpG. Une étude clinique de phase 1 a été entreprise afin d'évaluer sa toxicité et son efficacité sur un nombre réduit de patients. Aucune toxicité n'a été rapportée et une réponse immunitaire liée aux cellules T a été observée chez 21 des 25 patients ; cette réponse est associée à une augmentation de la survie des patients traités¹⁰⁰.

III. Synthèse protéique

La synthèse des protéines joue un rôle central dans la production des enzymes digestives pancréatiques et dans le maintien de l'homéostasie pancréatique. Les profils transcriptionnels et traductionnels des cellules acinaires sont dominés par la production d'enzymes digestives. En effet, environ 90% de la synthèse protéique dans le pancréas mature est consacré à la production d'une vingtaine de ces enzymes^{101 102}.

Il n'est pas clair si la cellule acinaire peut réguler la synthèse des enzymes digestives indépendamment de la synthèse des protéines structurales cellulaires. Il est cependant bien connu que la synthèse des enzymes digestives est ajustée aux besoins alimentaires. Bien que l'identité des protéines synthétisées individuellement et la régulation à long terme soient principalement déterminées par la régulation transcriptionnelle, les modifications du taux de synthèse des protéines, est régulée au niveau de la traduction¹⁰³, car ces modifications doivent pouvoir être rapides, et finement régulées¹⁰⁴.

A. Traduction

La traduction de l'ARNm en protéines peut être divisée en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison^{105 106}.

Initiation

Au cours de l'initiation, les facteurs d'initiation (eIF) 1, 2 et 3 et le méthionyl-ARNt initiateur s'associent à la sous-unité ribosomique 40S pour former le complexe de préinitiation 43S (PIC) (**Figure 5**). Ce complexe s'associe au complexe eIF4F composé d'eIF4A, eIF4E et eIF4G pour se lier à l'ARNm, et migre vers le codon d'initiation AUG correct. Une fois le codon initiateur atteint, la sous-unité ribosomique 60S et eIF5 se fixent alors au PIC pour former le complexe d'initiation 80S¹⁰⁷. Les principaux facteurs d'initiation dont l'activité peut être régulée lors ce processus sont le facteur d'échange de nucléotides guaninés eIF2B qui active eIF2, la protéine ribosomale S6 (S6), et eIF4E.

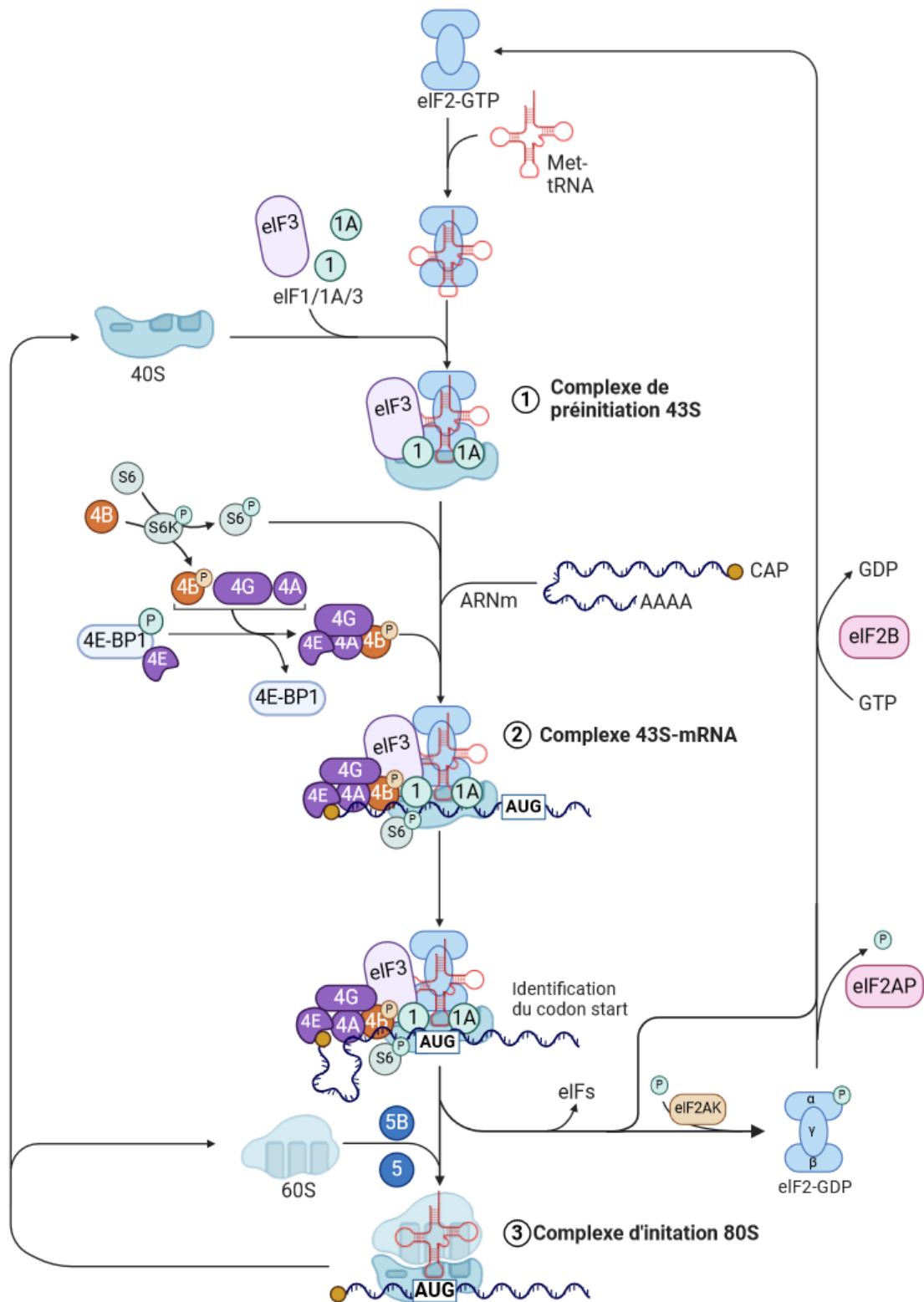


Figure 5. Principales étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. 40S = petite sous-unité ribosomale eucaryote ; 60S = grande sous-unité ribosomale eucaryote ; 80S = ribosome complet eucaryote ; eIF = eukaryotic initiation factor ; 1 = eIF1 ; 1A = eIF1A ; eIF2AK = HRI, PKR, PERK et GCN2 ; eIF2AP = phosphatase d'eIF2α GADD34-PP1 ; 4A = eIF4A ; 4B = eIF4B ; 4E = eIF4E ; 4G = eIF4G ; 5 = eIF5 ; 5B = eIF5B ; GDP = guanosine diphosphate ; GTP = guanosine triphosphate ; S6 = protéine ribosomale S6 ; S6K = kinase de S6.

eIF2 est un complexe hétérotrimérique composé de trois protéines : eIF2 α , eIF2 β et eIF2 γ [2]. L'ARNt ne peut interagir avec eIF2 que lorsque sa sous-unité eIF2 γ est liée à une molécule de GTP. Cette liaison est régulée par eIF2B, un facteur d'initiation de la traduction qui possède une activité d'échange de guanine-nucléotides (GEF). Lors de la phosphorylation de la sous-unité eIF2 α , le facteur GEF, eIF2B, a une affinité plus élevée pour le GDP et est séquestré par la sous-unité eIF2 γ . Étant donné que l'interaction entre l'ARNt et eIF2 est une condition préalable à l'assemblage de l'ARNt-ARNr, l'inhibition de l'interaction de l'ARNt avec eIF2 due à la phosphorylation de la sous-unité eIF2 α bloque la synthèse des protéines. À l'inverse, la déphosphorylation d'eIF2 α favorise l'initiation de la traduction. Quatre protéines kinases peuvent phosphoryler eIF2 α chez les mammifères : HRI (heme-regulated inhibitor kinase), PKR (protein kinase RNA-activated), PERK (RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase) et GCN2 (general control nonrepressed 2).¹⁰⁸ Un complexe protéique déphosphoryle eIF2 α : GADD34 (Growth Arrest and DNA-damaged protein 34) lié à PP1 (serine/threonine protein phosphatase 1)¹⁰⁹.

Le complexe mTORC1 (Complexe 1 de mTOR, mammalian target of rapamycin), composé de mTOR, Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8), Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) et PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40-kDa), régule l'activité de protéines impliquées dans la traduction des protéines 4E-BP1/2, eIF4B, S6, et des protéine-kinases de S6 (S6K1/2) par phosphorylation. Ainsi, d'un côté, l'activation de mTOR induit la phosphorylation de S6K1, conduisant à son activation. eIF4B et S6 sont alors phosphorylées par S6K1/2 et s'associent au complexe d'initiation de la traduction afin d'induire ce processus^{110 111 112}. D'un autre côté, l'activation de mTOR conduit à la reconnaissance de la coiffe 5' (^{m7}G) de l'ARNm par eIF4E pour favoriser également l'initiation de la traduction. Plus précisément, la fonction d'eIF4E est inhibée par la liaison avec 4E-BP1/2. Cependant, eIF4E est libérée lorsque 4E-BP1/2 est phosphorylée sur plusieurs sites, notamment par mTOR. eIF4E interagit avec la protéine d'échafaudage eIF4G et eIF4A pour former le complexe eIF4F. eIF4F peut alors se lier à la coiffe ^{m7}G de l'ARNm, (décrire 60S, puis 80S), et (80S) cherche alors le codon de départ pour initier la traduction^{113 114}.

Bien que le processus décrits ci-dessus s'applique à l'initiation de la traduction de la plupart des transcrits, des propriétés propres à certains ARNm peuvent favoriser d'autres mécanismes d'initiation de la traduction telle que ^{115 116} :

- la traduction médiée par l'IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui est un mécanisme de traduction indépendant du codon start AUG, utilisant un site d'entrée interne spécifique. Les séquences IRES permettent notamment la traduction d'ARNm par les cellules cancéreuses dans des conditions de stress environnemental¹¹⁷.
- la traduction médiée par l'uORF (upstream Open Reading Frame), un cadre de lecture situé en amont du cadre de lecture principal, qui est un mécanisme de régulation de la synthèse des protéines face à un stress cellulaire. Ce mécanisme de réponse limite la traduction énergivore des ARNm et favorise celle des ARNm contenant un uORF codant pour des protéines essentielles à la survie¹¹⁸.

Elongation

L'élongation comprend des cycles répétés de 3 processus : la sélection de l'ARN de transfert (ARNt) lié à un acide aminé, la formation de la liaison peptidique, et la translocation (**Figure 6**). Le ribosome compétent pour l'élongation comprend trois sites de liaison pour l'ARNt : un site A (Accepteur) pour l'ARNt lié à un acide aminé, le site P (Peptide) pour l'ARNt lié au peptide en cours de formation, et le site E (Exit) pour l'ARNt libéré de son acide aminé.

La première étape implique la sélection de l'ARNt lié à l'acide aminé correspondant à la séquence de l'ARNm lié au ribosome. Une fois cet ARNt chargé sur le site A, l'acide aminé de l'ARNt forme une liaison peptidique avec l'extrémité C-terminale du polypeptide en cours de formation au niveau du site P. Enfin, au cours de la translocation, le ribosome se déplace d'un codon sur l'ARNm, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Ainsi, l'ARNt lié au peptide en formation est déplacé du site A vers le site P par le facteur d'élongation eEF2. Cette translocation constitue l'étape limitante de l'élongation, la traduction étant donc dépendante de l'activité du facteur d'élongation eEF2¹¹⁹. Le déplacement de l'ARNt lié au

peptide en formation libère le site A pour accueillir un nouvel ARNt lié à un acide aminé. L'ARNt libéré de son acide aminé est alors transféré au site E puis est libéré. Le ribosome 80S se déplace ainsi sur l'ARNm jusqu'au codon de terminaison.

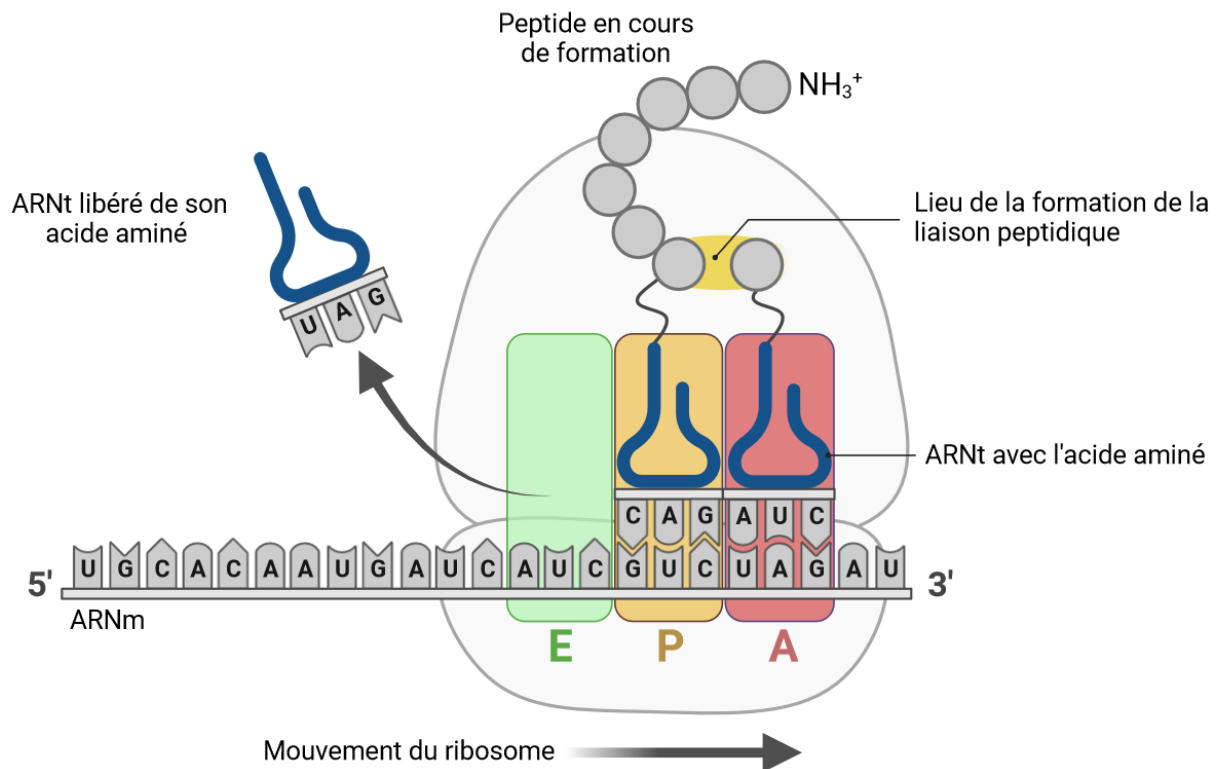


Figure 6. Processus d'élongation lors de la traduction des ARNm.

Terminaison

La terminaison de la traduction de l'ARNm se produit lorsqu'un des trois codons de terminaison (UAA, UGA ou UAG) entre sur le site A du ribosome. Chez les eucaryotes, la terminaison est médiée par les facteurs de libération eRF1 et eRF3, qui forment un complexe ternaire eRF1/eRF3/guanosine triphosphate (GTP). eRF1 reconnaît le codon d'arrêt et, après hydrolyse du GTP par eRF3, médie la libération du polypeptide formé¹²⁰.

B. Ribosomes et leur biogenèse

Composition des ribosomes

Les ribosomes sont des composants essentiels du processus de traduction des ARNm en protéines. Chez les eucaryotes, ils se composent de deux sous-unités, appelées petite (40S) et grande (60S) sous-unités. La sous-unité 40S a pour but de lier, dérouler et scanner les ARNm, tandis que la sous-unité 60S est responsable de la formation des liaisons peptidiques et du contrôle de la qualité des peptides naissants¹²¹. Chez l'homme, la sous-unité 40S comprend un ARN ribosomique (ARNr) appelé 18S, associé à 33 protéines ribosomiques (RPS pour ribosomal protein of the small subunit). La sous-unité 60S est constituée de trois ARNr (5S, 5,8S et 28S) et de 47 protéines (RPL pour ribosomal protein of the large subunit). Les ARNr occupent une position centrale dans l'activité du ribosome, déterminant sa structure globale et soutenant la fonction peptidyl-transférase qui catalyse la formation des liaisons peptidiques¹²².

Synthèse des protéines ribosomales

L'expression coordonnée des gènes codant pour les protéines ribosomales aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel est nécessaire pour garantir une accumulation à peu près équimolaire des protéines ribosomales (**Figure 7**).

La transcription coordonnée de ces gènes est médiée par des séquences spécifiques présentes dans leur locus, tel qu'un promoteur qui contient des sites de liaison conservés pour des facteurs de transcription impliqués dans l'expression des ARNm des protéines ribosomales¹²³. Ces sites de liaison comprennent un motif initiateur composé de plusieurs pyrimidines, une boîte TATA ou riche en A/T, ainsi que des séquences pouvant être liées par des régulateurs de la transcription nommés GABP, Sp1, et YY1. Ces sites facilitent le recrutement et la liaison de la protéine UBF (Upstream Binding transcription Factor), et du complexe SL1 (Selective Factor 1)¹²⁴ composé de TBP (TATA-box-binding protein) et de cinq TAF (facteurs associés à la boîte de TATA). Ce complexe recrute à son tour le facteur

d'initiation spécifique de la Pol I (RRN3) qui s'associe à l'ADN topoisomérase II α (TOPII α) et à l'ARN polymérase I pour achever l'assemblage d'un complexe Pol I compétent pour la transcription¹²⁵.

D'un point de vue traductionnel, la coordination de la synthèse des protéines ribosomales est orchestrée par un motif localisé à leur extrémité 5', nommé 5' terminal oligopyrimidine (5'TOP). Le motif 5'TOP, composé de 4 à 14 pyrimidines suivies d'une région riche en GC, permet une traduction coordonnée des ARNm contenant cette séquence. Il permet aux cellules de s'adapter rapidement aux changements de l'environnement, en modulant spécifiquement le taux de traduction des ARNm codant pour la machinerie de traduction.

mTORC1 et LARP1 (La-related protein 1) sont apparus comme les principaux facteurs impliqués dans la régulation de la traduction des ARNm avec un 5'TOP. LARP1 est un membre de la famille des LARPs caractérisée par un motif La du côté N-terminal de la protéine, suivi d'un motif de reconnaissance de l'ARN. Deux des membres de cette famille, LARP1 et LARP1B, possèdent une région DM15 ; cette dernière se lie à la séquence 5'TOP présente dans les ARNm codant les protéines ribosomales¹²⁶.

Lorsque mTORC1 est activé, par exemple dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 phosphoryle à la fois 4E-BP1/2 et LARP1. Comme expliqué plus haut, le complexe EIF4F (composé de 4E, 4G et 4A) peut alors lier la coiffe ^{m7}G et recruter le complexe de préinitiation 43S spécifiquement sur les ARNm codant pour les protéines ribosomales afin de promouvoir leur stabilité et leur traduction. En cas de privation de nutriments, mTORC1 est inactif, et 4E-BP1/2 et LARP1 sont déphosphorylés. 4E-BP1/2 séquestre EIF4E, bloquant ainsi l'initiation de la traduction de l'ARNm codant pour les protéines ribosomales^{127 128}.

Les ARNm des protéines ribosomales sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) dans le noyau et sont exportés vers le cytoplasme pour y être traduits. Les protéines ribosomales produites sont ensuite importées dans le nucléole afin de participer à la formation des ribosomes, en association avec les ARNr.

Synthèse et processus de maturation des ARNr

La majorité des étapes de la biogenèse des ribosomes se déroulent dans le nucléole. D'un côté, l'ADN ribosomique (ADNr), représentant l'ensemble des séquences génomiques transcrites en ARNr, est transcrit par l'ARN polymérase I (Pol I) dans le nucléole pour former l'ARNr précurseur 47S (pré-ARNr 47S) ; il donnera après clivages les ARNr 18S, 5,8S et 28S. D'un autre côté, l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase III (Pol III) dans le nucléoplasme. Le pré-ARNr 47S, l'ARNr 5S et les protéines ribosomales s'assemblent pour former le processome (pré-ribosome) 90S. Ce dernier est ensuite modifié par des mécanismes qui impliquent environ 200 petits ARN nucléolaires (snoRNA), pour produire les sous-unités ribosomiques pré-40S et pré-60S. Par après, une maturation dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme est réalisée (**Figure 7**). Le processus complet de la biogénèse des ribosomes implique plusieurs centaines de facteurs accessoires, donnant finalement naissance au ribosome 80S mature^{122 129 130}.

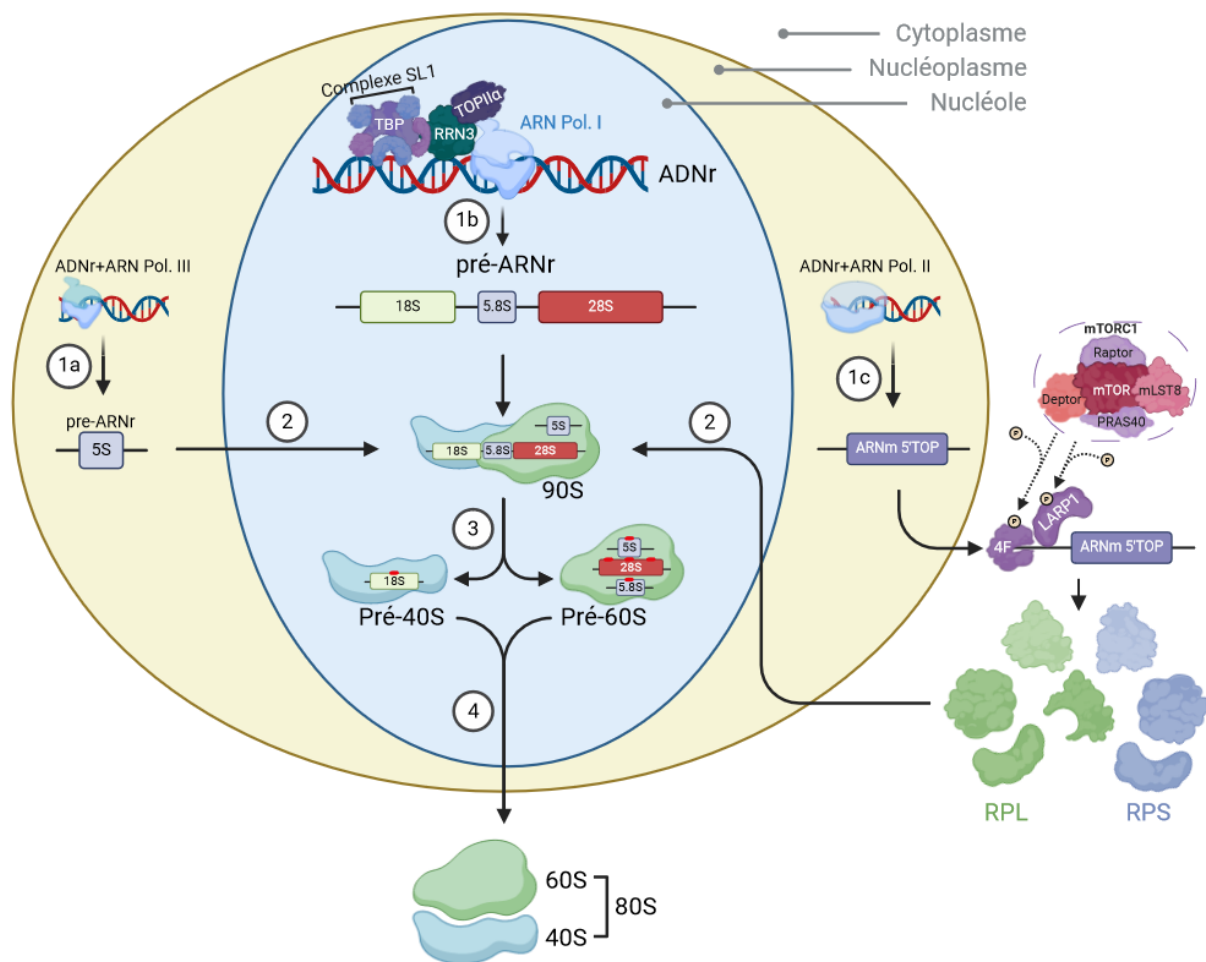


Figure 7. Biogenèse des ribosomes. 1a : Transcription de l'ARNr 5S par l'ARN polymérase III (ARN Pol. III) dans le nucléoplasme. 1b : Transcription du pré-ARNr 47S par l'ARN polymérase I (ARN Pol. I) dans le nucléole. 1c : Transcription des ARNm 5'TOP par l'ARN polymérase II (ARN Pol. II) dans le nucléoplasme. 2 : Transport des composants du processome 90S dans le nucléole. 3 : Modification des ARNr représentés par des ovales rouge et formation des ribosomes pré-40S et pré-60S. 4. Maturation et transport du ribosome dans le cytoplasme. RPL, protéines ribosomales de la grande sous-unité ; RPS, protéines ribosomales de la petite sous-unité ; 4F = eIF4F ; LARP1 = La-related protein 1 ; mTORC1 (Complexe 1 de mTOR, mammalian target of rapamycin), composé de mTOR, Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8), Deaptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) et PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40-kDa).

C. Synthèse des protéines transmembranaires et sécrétées

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organe exceptionnellement important dans la cellule acinaire et constitue le site de la synthèse, du repliement et du transport des protéines, de la synthèse des lipides et des stéroïdes, du métabolisme des hydrates de carbone, et du stockage du calcium¹³¹.

Le RE est constitué d'un réseau membranaire étendu. La membrane sépare la lumière du RE du cytosol. Une partie du RE, appelée RE rugueux, est couverte de ribosomes responsables de la synthèse des protéines destinées aux membranes et à la sécrétion. L'autre partie, dénommée RE lisse, participe à la synthèse des lipides, la glycosylation, et le stockage de calcium, dont la concentration régule la sécrétion des protéines.

Repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique, UPR et ERAD

Lors de sa synthèse, une protéine subit un repliement et des modifications appropriés, grâce à l'intervention de protéines chaperonnes et d'enzymes de repliement, telles que les protéines disulfure isomérase (PDI) et la protéine de liaison de la chaîne lourde des immunoglobulines (GRP78). Ces interactions se produisent après la synthèse de la protéine naissante et sa translocation de la membrane du RER vers sa lumière. Malgré tous ces mécanismes de contrôle spécifiques et sophistiqués, une fraction des protéines n'atteint pas la forme mature et fonctionnelle car elle est soit mal repliée, soit agrégée¹³². Cependant, il est important que des protéines mal repliées n'entrent pas par inadvertance dans la voie sécrétoire¹³³. C'est pourquoi, la rétention de protéines mal repliées dans le RE induit un stress du RE^{134 135} et un programme adaptatif coordonné, appelé réponse aux protéines non repliées (UPR)^{136 137}. L'UPR active des mécanismes spécifiques visant à maintenir l'équilibre et le bon fonctionnement du RE et de la cellule (1) en inhibant la synthèse des protéines, (2) en régulant à la hausse le repliement des protéines par l'augmentation de la traduction des chaperonnes du RE et des enzymes de repliement, et (3) en activant, si nécessaire, la voie de dégradation associée au RE (ERAD)¹³⁸. Cette dernière réduit la charge de protéines mal repliées dans le RE en les ciblant pour la dégradation médiée par le protéasome. Cette voie intervient dans la reconnaissance des protéines

malformées, leur transport vers le protéasome à l'aide notamment de la protéine SEL1L (Protein sel-1 homolog 1), et leur ubiquitination en vue de leur dégradation par le protéasome.

Trois protéines transmembranaires résidant dans le RE ont été identifiées comme capteurs proximaux du stress du RE : la kinase et endoribonucléase inositol-requiring element 1 α (IRE1 α)¹³⁹, la PKR-like ER kinase (PERK)¹⁴⁰, et le facteur de transcription 6 (ATF6)¹⁴¹. La phosphorylation de l'eIF2 α par PERK inhibe la traduction des protéines génériques mais permet la traduction préférentielle de différents ARNm, comme l'ARNm codant pour le facteur de transcription activateur 4 (ATF4). La dimérisation de l'IRE1 α suivie d'une autophosphorylation déclenche son activité RNase, qui traite l'ARNm codant pour la protéine 1 de liaison à la boîte X non épissée (XBP1u) pour produire un facteur de transcription actif, épissé (XBP1s), qui contrôle la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans le repliement des protéines¹⁴². Dans des conditions de stress du RE, ATF6 transite pour sa part vers le Golgi où il est clivé par les protéases du site 1 (S1) et du site 2 (S2), S1P et S2P, générant un facteur de transcription actif¹⁴³. Cette forme clivée de l'ATF6 se déplace vers le noyau pour activer la transcription de gènes impliqués dans le repliement, le traitement et la dégradation des protéines^{141 144}.

L'activation de l'UPR peut conduire soit à la survie de la cellule, en déclenchant la synthèse de protéines chaperonnes du RE telles que GRP78 et les protéines disulfure isomérase (PDI), ainsi qu'une diminution de la traduction générale des protéines, soit à la mort de la cellule. Cette dernière se produit par l'activation de signaux de mort cellulaire programmée (apoptose)^{136 142}.

Glycosylation des protéines

La grande majorité des protéines qui traversent le RE possèdent une séquence signal N-terminale qui est clivée à la fin de sa translocation dans le RE. Une caractéristique fondamentale de toutes les protéines passant par le RE est leur glycosylation. Les glycoprotéines résultent de l'ajout de groupements oligosaccharidiques, soit sur le groupement NH₂ de certains résidus d'asparagine (appelés oligosaccharides N-liés), soit sur le groupement OH de certains résidus de sérine, thréonine, ou hydroxylysine (appelés oligosaccharides O-liés). Les N-glycosylations débutent dans le RE et se

complètent dans l'appareil de Golgi, tandis que les O-glycosylations se produisent exclusivement dans l'appareil de Golgi.

Indépendamment du type de protéine considéré et de sa composition oligosaccharidique finale, les étapes de N-glycosylation qui ont lieu dans le réticulum restent similaires (**Figure 8**). La première étape implique toujours l'addition d'un groupement oligosaccharidique composé de 14 résidus de glucides, comprenant 2 résidus de N-acétylglucosamine, 9 mannoses et 3 glucoses^{145 146}. Ce groupement oligosaccharidique est construit sur un lipide particulier appelé dolichol, du côté cytosolique de la membrane du RE. Une fois le squelette complet, le dolichol bascule du côté luminal avec l'ensemble du squelette, puis est transféré en bloc vers un résidu asparagine spécifique de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse¹⁴⁷.

Ce transfert est facilité par des enzymes spécifiques appelées glycosyltransférases. Les résidus asparagine sont reconnus lorsque la séquence cible est exposée dans la lumière du RE, c'est-à-dire lorsque la chaîne traverse la membrane. Cette première étape de glycosylation intervient donc avant le processus de repliement et influence considérablement la structure tertiaire adoptée par la protéine. La deuxième étape implique des modifications du squelette oligosaccharidique à l'intérieur du RE, avant que la protéine ne soit exportée vers le Golgi. Ces modifications consistent principalement au clivage des 3 résidus glucose et de 1 à 3 résidus mannose, effectué par des glucosidases et des mannosidases¹⁴⁸.

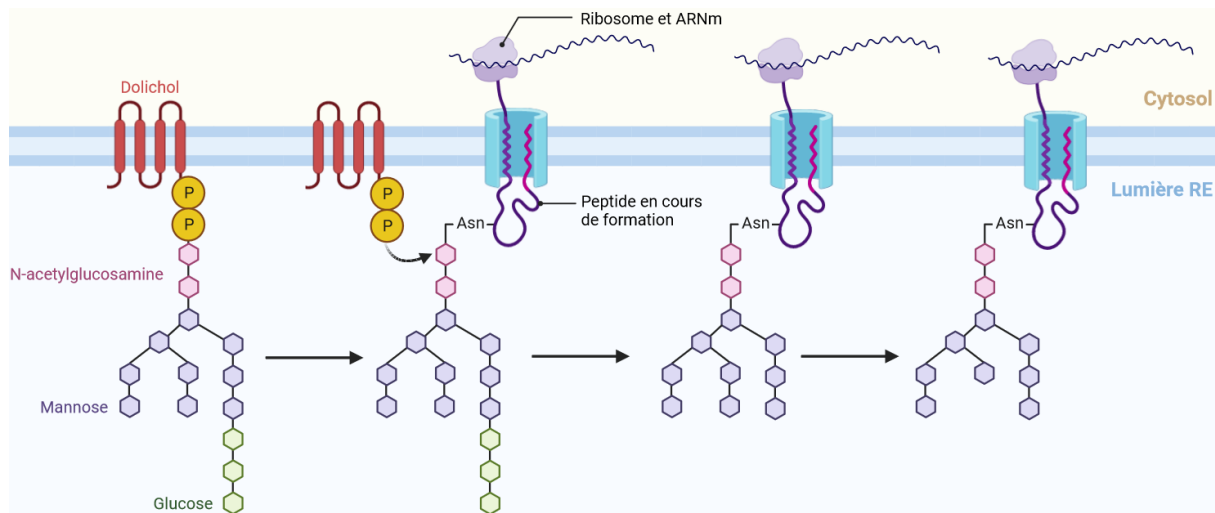


Figure 8. Processus de N-glycosylation. La N-glycosylation des protéines est initiée à partir de résidus d'asparagine, dans le réticulum endoplasmique (RE). L'oligosaccharide, composé de N-acétylglucosamine, de mannose et de glucose, est transféré du dolichol à l'asparagine (Asn). Ensuite, trois résidus de glucose et un résidu de mannose sont éliminés.

D. Mécanismes de contrôle de la traduction

Le profil des protéines produites par une cellule dépend notamment de la sélectivité avec laquelle les ARNm produits vont être traduits. En effet, au même titre que la transcription régulée par la liaison de protéines (appelées facteurs de transcription) à l'ADN, la traduction dépend de la liaison de protéines, appelées RBP (RNA binding-protein), à l'ARNm.

Les RBP présentent une capacité sélective à se lier à certains ARNm plutôt qu'à d'autres. Cette sélectivité est régulée par des séquences des ARNm qui sont reconnues par les domaines de liaison à l'ARN des RBP, tels que le domaine RRM (RNA-recognition motif). La régulation de la traduction par les RBP est médiée par leur capacité à modifier, localiser, stabiliser et initier la traduction des ARNm.

Une grande partie des domaines de liaison à l'ARN des RBP sont associés à des régions intrinsèquement désordonnées (IDR)¹⁴⁹. Contrairement aux parties des protéines qui adoptent des structures spécifiques telles que l'hélice α ou le feuillet β , les IDR sont des séquences protéiques qui ne forment pas de structure tridimensionnelle définie¹⁵⁰ et peuvent exister sous plusieurs formes. En effet, elles n'ont pas suffisamment de résidus hydrophobes pour se replier correctement par elles-mêmes, et

n'ont donc pas de conformation fixe. Ces régions flexibles offrent une grande plasticité et permettent aux protéines d'accomplir une variété de fonctions en interagissant avec différents partenaires moléculaires, dans des conditions variées¹⁵¹.

Un exemple pertinent de la sélectivité de traduction est représenté par le cas de PABPC1 (Polyadenylate-binding protein 1), une protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm, qui traduit spécifiquement certains ARNm. D'un point de vue mécanistique, PABPC1 se lie à la queue poly(A) et facilite alors l'interaction de la queue poly(A) avec le complexe eIF4F lié au 5' des ARNm. Cette interaction favorise alors une organisation spatiale propice à l'initiation de la traduction. La liaison de PABPC1 à la queue poly(A) des ARNm protège aussi les ARN de leur dégradation et favorise ainsi leur stabilité¹⁵².

IV. Protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2

A. Introduction

L'origine du nom G3BP (Ras-GAP SH3-binding protein) vient de sa liaison au domaine SH3 de la protéine activatrice de la Ras-GTPase (p120 Ras-GAP) dans les cellules stimulées par le sérum, comme l'a rapporté pour la première fois Parker en 1996¹⁵³. La famille G3BP se compose de trois protéines, à savoir G3BP1, G3BP2a et G3BP2b. Les protéines G3BP1 et G3BP2 sont codées par des gènes différents sur les chromosomes humains 5 et 4 et les chromosomes de souris 11 et 5, respectivement. G3BP2b est une isoforme épissée de G3BP2a à laquelle il manque 33 acides aminés dans sa région centrale¹⁵⁴.

Les protéines G3BP présentent une expression ubiquitaire avec une intensité variable en fonction des tissus^{154 155}. Elles sont principalement exprimées dans le cytoplasme, mais ont également la capacité d'entrer dans le noyau¹⁵⁶. Les protéines G3BP sont étroitement liées à la formation et à l'activité des granules de stress (SG)¹⁵⁷. En outre, G3BP1 peut renforcer la liaison entre la GMP-AMP synthase cyclique (cGAS) et l'ADN en favorisant la formation d'un grand complexe cGAS¹⁵⁸. Enfin, certains virus ont développé différents mécanismes d'action en coopérant avec G3BP pour faciliter leur réplication et échapper à l'immunité cellulaire de l'hôte. En conclusion, G3BP est impliquée dans divers processus pathologiques, notamment l'invasion du cancer, les métastases, ainsi que la survie du virus dans l'hôte. Actuellement, différentes études suggèrent que le ciblage de G3BP est une stratégie thérapeutique potentielle pour le cancer.

B. Structure

G3BP contient cinq motifs distincts, le domaine facteur de transport nucléaire 2-like (domaine NTF2-like), la région riche en acide, le motif riche en proline (PxxP), le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM), et le domaine RGG (riche en arginine-glycine)¹⁵⁹ (**Figure 9**).

Le domaine NTF2-like intervient dans la dimérisation de G3BP1, l'assemblage des SG¹⁶⁰ et l'interaction avec plusieurs protéines, telles qu'USP10 et CAPRIN1¹⁶¹. Le domaine NTF2-like est associé au transport

nucléaire et à la localisation cellulaire^{162 163}. La présence du domaine NTF2-like joue également un rôle important dans la réplication virale, car il peut se lier aux motifs viraux et être recruté par le complexe de réplication virale¹⁶⁴.

Le domaine PxxP des protéines G3BP est nécessaire à l'activation de la protéine kinase (PKR), à l'activité antivirale de G3BP1 et à la nucléation des SG^{161 165}. G3BP1 et G3BP2 se distinguent principalement par le nombre de motifs PxxP qu'elles possèdent. G3BP1 ne possède qu'un seul motif PxxP, ce qui peut limiter sa capacité à interagir avec d'autres protéines, tandis que G3BP2a et G3BP2b possèdent respectivement quatre et cinq motifs PxxP^{154 155}.

Le domaine RRM comprend deux courtes séquences, RNP1 et RNP2, composées d'acides aminés hydrophobes conservés, qui sont essentiels pour la liaison à l'ARN¹⁵⁹.

Le domaine RGG est composé de répétitions arginine-glycine-glycine, d'où son nom. Le domaine riche en RGG de G3BP1 augmente son affinité de liaison à l'ARN et assure des interactions protéine-protéine, stabilisant ainsi le complexe G3BP1-ARN¹⁶⁶. Le domaine RGG des protéines G3BP est essentiel pour le recrutement de la machinerie de traduction de l'hôte. Par exemple, la réplication du virus de la forêt de Semliki (SFV) est réduite dans les cellules présentant des mutants G3BP dépourvus du domaine RGG¹⁶⁷.

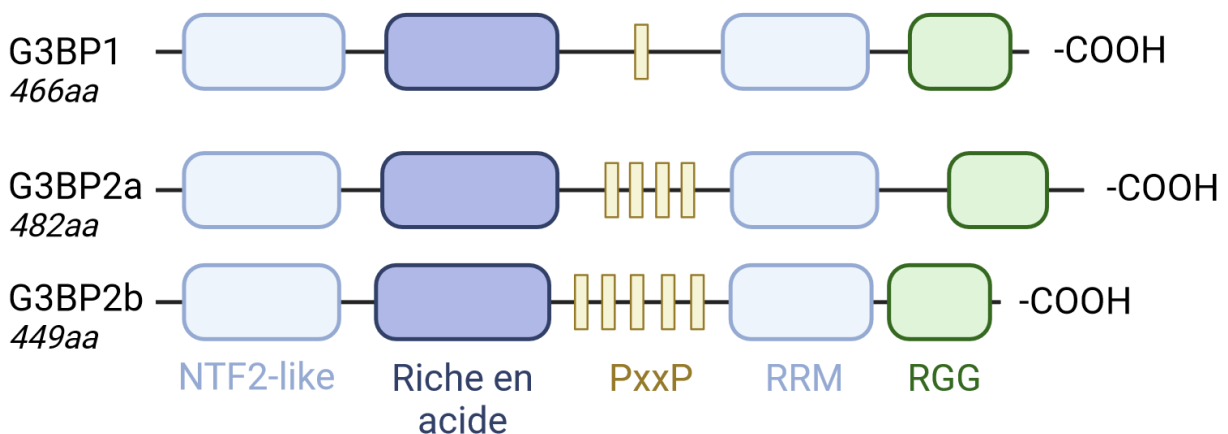


Figure 9. Structure des protéines G3BP. G3BP1 contient cinq motifs distincts, le domaine du facteur de transport nucléaire 2-like (NTF2-like), la région riche en acide, le motif riche en proline (PxxP), le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) et le domaine RGG (riches en arginine et en glycine), au niveau de l'extrémité C-terminale. G3BP1 et G3BP2 se distinguent par le nombre de motifs PxxP : G3BP1 a un motif PxxP, tandis que G3BP2a et G3BP2b ont respectivement quatre et cinq motifs PxxP^{154 159 168}.

C. Rôles physiologiques

Les rôles de G3BP1 et de G3BP2 ont principalement été décrits dans le cancer et dans la formation de granules de stress dans des cellules en culture. Cependant, quelques études montrent également un rôle de ces protéines dans un contexte physiologique.

Ainsi, la protéine de liaison à l'ARN Rasputin, homologue de G3BP chez la drosophile, renforce la stabilité et la traduction de ses ARNm cibles. Dans les embryons précoces de drosophile, Rasputin est associée aux polysomes ; les polysomes sont des complexes d'ARNm et de ribosomes qui agissent pour traduire l'ARNm en protéine. Rasputin se lie à plus de 550 ARNm, qui sont courts, stables et fortement traduits. Ces ARNm représentent des composants essentiels de la machinerie de transcription, d'épissage et de traduction¹⁶⁹.

D. Rôles dans le cancer

G3BP est liée au processus de développement des tumeurs. Ainsi, G3BP favorise l'entrée des cellules cancéreuses en phase S¹⁷⁰. De plus, elle joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules en régulant la traduction ou les voies de signalisation telles que NF-κB, ERK, p53 et Ras^{168 171}.

La famille de protéines G3BP est surexprimée dans diverses tumeurs humaines, et G3BP2 est surexprimée dans une plus large mesure que G3BP1¹⁷².

D.1 Rôles en lien avec la traduction

Les protéines G3BP1 et G3BP2 affectent la croissance tumorale en régulant la traduction et la stabilité de l'ARNm¹⁷³. De nombreux facteurs affectent la stabilité de l'ARNm, tels que la coiffe 5', la queue 3'

poly (A), la région 5' non-traduite (5' UTR), et la région 3' non-traduite (3' UTR). G3BP1 et G3BP2 se lient à un ARN spécifique par l'intermédiaire de son domaine RRM pour réguler la stabilité de l'ARNm, contrôlant ainsi de multiples voies de signalisation. Quelques exemples de rôles de G3BP1/2 dans la traduction sont donnés dans la suite de cette section.

G3BP1 associée à la déubiquitinase USP10 joue un rôle crucial dans la fonctionnalité des ribosomes en protégeant les sous-unités 40S bloquées et monoubiquitinées de la dégradation lysosomale programmée¹⁷⁴.

G3BP1 a deux effets différents sur la stabilité d'ARNm spécifiques : la stabilisation, comme pour l'ARNm de *TAU*¹⁷⁵, et la dégradation, comme pour les ARNm *CTNNB1*¹⁷⁶, *ATP5B*¹⁷⁷, *PMP2* (codant pour la protéine 22 de la myéline périphérique)¹⁷⁸, *IGF-II* et *GAS5*¹⁷⁹. Par exemple, *PMP22* est un gène spécifique de l'arrêt de croissance, et la répression de l'expression de *PMP22* par G3BP1 favorise la prolifération des cellules du cancer du sein¹⁸⁰. Winslow et al. ont découvert que G3BP1 supprime l'expression de l'ARNm de *PMP22*, stimulant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses du sein¹⁷⁸.

Par ailleurs, G3BP1 associé à UPF1 régule la dégradation d'ARNm présentant un 3'UTR hautement structurées¹⁸¹. De plus, G3BP2 régulé par l'ARN non codant LINC01554 facilite la métastase du carcinome épidermoïde de l'œsophage en stabilisant la transcription de *HDGF* (hepatoma-derived growth factor)¹⁸².

En outre, G3BP2 régule l'initiation des tumeurs mammaires en stabilisant l'ARN messager de l'antigène du carcinome épidermoïde reconnu par les cellules T 3 (*SART3*), ce qui entraîne une augmentation de l'expression des facteurs de transcription de la pluripotence Octamer-binding protein 4 (*OCT-4*) et Nanog Homeobox (*Nanog*)¹⁸³.

La liaison du cluster de différenciation 24 (CD24) à G3BP inhibe l'activité de G3BP1 sur l'ARNm codant pour le facteur Binder of Arl Two (*BART*), ce qui accroît l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses du pancréas¹⁸⁴.

D.2. Rôles dans les voies de signalisation

Les protéines G3BP1 et G3BP2 sont impliquées dans la croissance tumorale via la régulation de l'activité de cascade de signalisation (**Figure 10**). En voici quelques exemples :

- G3BP1 induit la prolifération, la migration, et l'invasion des cellules cancéreuses de l'œsophage et du colon via les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et PI3K/AKT^{185 186}.
- G3BP1 est essentielle pour l'activation du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) en facilitant l'association de cGAS avec la chromatine cytosolique pendant la sénescence. Cela active les voies NF- κ B et STAT3¹⁵⁸.
- L'association entre USP10 et G3BP2 stimule la progression du cancer de la prostate en entravant les fonctions de p53. En effet, le complexe G3BP2-USP10 bloque p53 dans le cytoplasme et l'empêche de jouer son rôle de facteur de transcription¹⁸⁷. De plus, G3BP2 interagit également avec murine double minute 2 (MDM2) pour inhiber p53 en la ciblant pour la dégradation via le protéasome¹⁸⁸. En outre, la protéine 25 contenant des motifs tripartites (TRIM25) interagit aussi avec G3BP2 et la protéine de liaison 2 de RAN (RanBP2) pour séquestrer p53 dans le cytoplasme^{189 190}.
- G3BP1 favorise la croissance, la migration et l'invasion des cellules du carcinome pulmonaire en supprimant la voie de signalisation associée à Src/FAK¹⁹¹.
- Le domaine NTF2-like de G3BP2 est reconnu par la séquence de rétention cytoplasmique (CRS) d'I κ B α , qui interagit avec le complexe I κ B α /NF- κ B. La surexpression de G3BP2 favorise la rétention d'I κ B α dans le cytoplasme¹⁹².

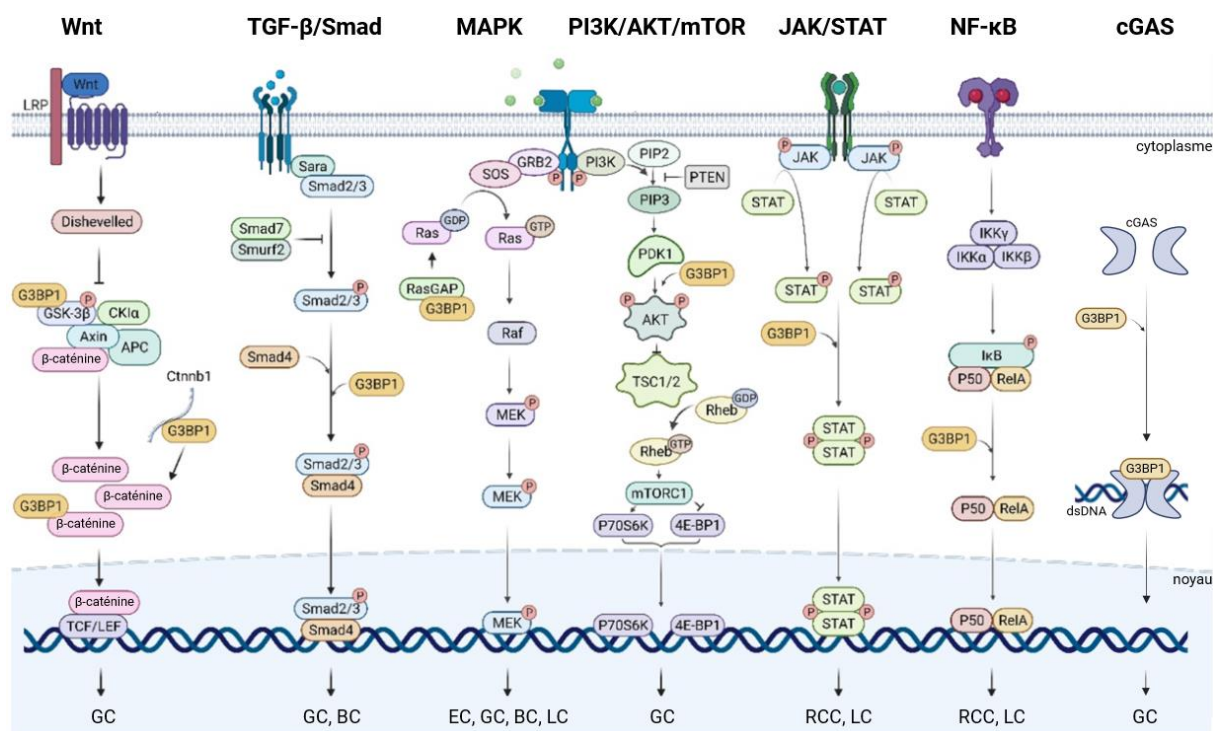


Figure 10. Voies de signalisation impliquant G3BP1. G3BP1 est impliqué dans les voies de signalisation Wnt, TGF- β /Smad, PI3K/AKT/mTOR, MAPK, JAK/STAT et NF- κ B afin de favoriser la prolifération, l'invasion et la métastase de diverses tumeurs. BC : cancer du sein ; CC : cancer du côlon ; EC, carcinome œsophagien ; GC : cancer gastrique ; LC : cancer du poumon ; PCa : cancer de la prostate ; RCC : carcinome à cellules rénales¹⁹³.

E. Rôle dans les granules de stress

Les SG sont des particules découvertes dans le cytoplasme de cellules eucaryotes en culture soumises à un stress. Elles sont visibles à l'aide d'un microscope classique. Les SG sont des agrégats ribonucléoprotéiques (mRNP), dynamiques et réversibles, sans membrane ; ils sont associés à une modification du profil de traduction des ARNm.

Lorsque les cellules eucaryotes sont exposées à des stress environnementaux (chaleur, conditions oxydatives, infections virales, hyperosmolarité, ou irradiation UV), des protéines de liaison de l'ARN se condensent pour former des SG en recrutant des ARNm^{194 195}. La voie classique d'assemblage des SG est principalement médiée par la phosphorylation de eIF2 α . Cette phosphorylation d'eIF2 α entraîne une diminution de la traduction et donc une augmentation de concentration intracellulaire d'ARN libres. En réponse, G3BP favorisent la formation des granules de stress^{160 196} pour remodeler le profil

d'ARNm traduits. Ce mécanisme de réponse au stress limite la traduction énergivore des ARNm et favorise la traduction d'ARNm codant des protéines essentielles à la survie^{197 198}. Les composants des SG comprennent principalement les facteurs d'initiation de la traduction (base de données des protéine des SG : <https://rnagranuledb.lunenfeld.ca/>) : le facteur 4G d'initiation de la traduction eucaryote (eIF4G), le facteur 3 d'initiation de la traduction eucaryote (eIF3) et le facteur 5A d'initiation de la traduction eucaryote (eIF5A)¹⁹⁹, les petites sous-unités ribosomiques, et divers agrégats de protéines liant l'ARNm, telles que la protéine cytoplasmique associée à l'activation/la prolifération (CAPRIN1)¹⁵⁷, la protéine associée à l'ubiquitine 2-like (UBAP2L)²⁰⁰, G3BP1, et G3BP2²⁰¹.

G3BP1 et G3BP2 sont essentielles à la formation des SG^{163 201}. Leur assemblage médié par G3BP1 est régulé par la liaison mutuellement exclusive de CAPRIN1 et USP10, c'est-à-dire que CAPRIN1 se lie à G3BP1 pour promouvoir l'assemblage des SG, tandis que USP10 se lie à G3BP1 pour inhiber l'assemblage des SG²⁰². Une caractéristique commune des protéines trouvées dans les SG est qu'elles présentent des régions intrinsèquement désordonnées (IDR), impliquées dans la séparation de phase liquide-liquide des SG¹⁶⁰; G3BP1 compte ainsi trois IDR différentes.

Le niveau d'expression de G3BP contrôle la formation des granules de stress. En effet, l'absence de G3BP1 ou de G3BP2 entraîne une réduction de leur formation, alors qu'une absence des deux protéines empêche leur formation. A l'inverse, une surexpression de G3BP1 augmente la formation des SG¹⁶³.

Objectifs de la thèse

Bien que de nombreuses recherches translationnelles soient menées dans le domaine du cancer du pancréas, ce cancer reste l'un des plus mortels. L'amélioration des traitements du PDAC passe ainsi par une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la tumorigenèse pancréatique. Dans ce contexte, alors que de nombreux mécanismes de contrôle transcriptionnel ont été identifiés au cours de cette tumorigenèse, nous avons cherché à identifier des mécanismes de régulation de la traduction, qui sont encore largement méconnus.

Dans mon travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de mécanismes de traduction en utilisant deux approches différentes.

Ma première étude a cherché à comprendre de quelle façon la traduction était contrôlée lorsque la tumorigenèse est initiée à partir des cellules acinaires du pancréas, un type cellulaire montrant une capacité exceptionnellement élevée du niveau de synthèse protéique, sachant que les cellules cancéreuses présentent des niveaux de synthèse protéiques plus élevés que leurs homologues non cancéreuses. Dans cette optique, cette étude se concentre sur la caractérisation des mécanismes de régulation de la traduction au cours de l'initiation du cancer du pancréas en cherchant à identifier les modifications générales qui façonnent la synthèse des protéines, lorsque les néoplasies intraépithéliales du pancréas (PanIN) se développent à partir des cellules acinaires. Plus précisément, nous avons évalué les modifications d'activité des facteurs d'initiation de la traduction, de la production des ribosomes, du stress du réticulum endoplasmique, et de la N-glycosylation au cours de la tumorigenèse pancréatique.

Ma seconde étude a été consacrée aux rôles de deux protéines de liaison à l'ARN, G3BP1 et G3BP2, impliquées dans le contrôle de la traduction au cours de la tumorigenèse pancréatique. Le but principal était d'identifier si ces protéines contribuent à la formation des PanIN via la régulation de la traduction de certains ARNm qui leur sont associés. De plus, compte tenu de l'importance de G3BP1 et G3BP2

dans la formation des granules de stress et du fait que ces derniers apparaissent comme des cibles thérapeutiques dans le cadre de traitement du cancer, nous avons cherché à identifier la présence de ces granules dans le contexte de tumorigenèse pancréatique.

Résultats

I. Combinaison inattendue d'une augmentation de la traduction des protéines et d'une diminution du stress du réticulum endoplasmique au cours de l'initiation du cancer du pancréas

Ce chapitre est une mise en forme au format de ma thèse d'un manuscrit qui a été soumis le 8 mai 2024 au journal *CMGH (Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology)* : « Unexpected combination of increased protein translation and decreased endoplasmic reticulum stress during pancreatic cancer initiation ».

Dans cet article, j'ai contribué à la conception expérimentale, à l'acquisition des données, à l'analyse, et à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Unexpected combination of increased protein translation and decreased endoplasmic reticulum stress during pancreatic cancer initiation

Maxime Libert¹, Leyre López-Muneta¹, Sophie Quiquempoix¹, Ludivine Wacheul², Sabine Cordi¹, Denis L.J. Lafontaine², Patrick Jacquemin¹#

¹Université catholique de Louvain, de Duve Institute, B-1200 Brussels, Belgium, ²RNA Molecular Biology, Université libre de Bruxelles (ULB), Fonds de la Recherche Scientifique (F.R.S./FNRS), Biopark campus, B-6041 Gosselies, Belgium

#Corresponding author: Patrick Jacquemin - patrick.jacquemin@uclouvain.be - +32 2 764 75 31

Keywords: Pancreatic tumorigenesis; ER stress; Ribosome; Translation initiation

Short Title: Translational regulation in PDAC initiation

Supplementary tables 1 and 2 are available on:

https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing

Abbreviations used in this paper: ADM, Acinar-to-Ductal Metaplasia; ATF6, Activating Transcription Factor 6; DDOST, Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit; EIF, Eukaryotic Initiation Factor; Ela-K, Elastase Cre recombinase estrogen receptor-LSL KrasG12D; ER, Endoplasmic Reticulum; ERAD, ER-associated Degradation; GANAB, Neutral alpha-glucosidase AB; GRP78, Glucose-Regulated Protein 78; HSPA, Heat Shock Protein A; IRE1 α , Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; MAN1A1, Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA; MAN1A2, Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB; MAN1B1, Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB; N-glycosylation, N-linked glycosylation; PanIN, Pancreatic Intraepithelial Neoplasia; PDAC, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PDIA1, Protein Disulfide Isomerase A1; PIC, Pre-Initiation complex; RPN1, Regulatory Particle Non-ATPase 1; RPL11, Ribosomal Protein L11; RPS12, Ribosomal Protein S12; rRNA, Ribosomal RNA; STT3B, Dolichyl-

diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3B; TUSC3, Tumor suppressor candidate 3; UGGT1, UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase 1; UPR, Unfolded Protein Response; XBP1, X-Box Binding Protein 1

Synopsis: Acinar cells are characterized by high protein synthesis. Upon their transformation, protein synthesis further increases in parallel with increased ribosomal activity and translation initiation factor expression. In contrast to tumorigenesis in other tissues, endoplasmic reticulum stress is decreased.

A. Abstract

Background & Aims: Tumorigenesis is usually associated with increased protein synthesis rates coupled with increased endoplasmic reticulum (ER) stress. In the pancreas, acinar cells already exhibit a very high protein synthesis rate in normal conditions, which raises the question as to how this cell type adapts during pancreatic tumor formation. Here, we characterize how acinar cells modulate their protein synthesis rate in metaplastic lesions, which are precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

Methods: We evaluated protein synthesis by puromycin incorporation assays and investigated the control of translation and ER stress by transcriptomic analyses and phenotyping of a mouse model of PDAC initiation.

Results: During pancreatic tumorigenesis, protein synthesis levels in acinar-to-ductal metaplasia exhibited a significant increase as compared to normal acinar cells. This was associated with enhanced expression and activity of translation initiation factors and with increased production of ribosomal components. Surprisingly, ER stress was reduced. This decrease was associated with the overall reduction in the level of N-glycosylation resulting from the reorganization of the gene expression program.

Conclusions: Our work provides evidence for pancreas-specific adaptation of translational regulation during tumorigenesis, which is characterized by the unexpected combination of increased protein synthesis rate and decreased ER stress. This highlights the diversity of adaptive protein translation in transforming tissues.

B. Introduction

Acinar cells are the major cell type in the pancreas. They are organized in packed acinar glands, called acini, with a narrow central lumen connected to a ductal tree. They synthesize and secrete a high amount of proteins, mainly digestive enzymes such as trypsin and amylase, exhibiting an exceptionally high level of translational capacity to accommodate the need for this high rate of protein synthesis (1). Under these conditions, acinar proteostasis is mediated by endoplasmic reticulum (ER) stress, an adaptive mechanism that helps cells facing with elevated protein synthesis by attenuating this synthesis, increasing the capacity of the ER to fold proteins, and clearing the unfolded/misfolded proteins (2).

It has been established using mouse models that in the presence of oncogenic mutations and inflammation, acinar cells can give rise to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). In these conditions, the acinar morphology changes, the lumen enlarges and the acinar cells adopt a flattened cuboidal shape. The process, called acinar-to-ductal metaplasia (ADM), progresses to generate duct-like structures, which can further evolve to pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and eventually to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) (3).

Cancer cells must adapt to a faster rate of cell division than normal cells, and consequently, must translate proteins at a higher rate. This adaptative mechanism involves an essential step in protein synthesis, namely translation initiation which is hijacked by the cancer cell to increase bulk protein synthesis, but also production of specific cancer-related proteins. This increased protein synthesis is associated with increased endoplasmic reticulum (ER) stress (4,5). In this context, the question arises as to how acinar cells adapt these processes during pancreatic cancer initiation. While several transcriptional control mechanisms have been identified during pancreatic tumorigenesis, our knowledge on translational control is lagging behind.

This study characterizes the control of protein synthesis rates and ER stress during pancreatic tumorigenesis. Using a mouse model that recapitulates pancreatic cancer initiation, we found that, at

the onset of tumor formation, precancerous lesions derived from acinar cells can increase their level of protein synthesis. Like in other tumorigenic processes, this is associated with increased ribosomal activity and increased expression of several eukaryotic initiation factors (EIF). Unlike in other cancers, we observed decreased ER stress in developing pancreatic cancer. Our work highlights the diversity of adaptive protein translation in tumor formation and uncovers a pancreas-specific process of translational regulation. This indicates that specific cell types implement intrinsic mechanisms that allow them to adapt their translation to the context of tumor initiation.

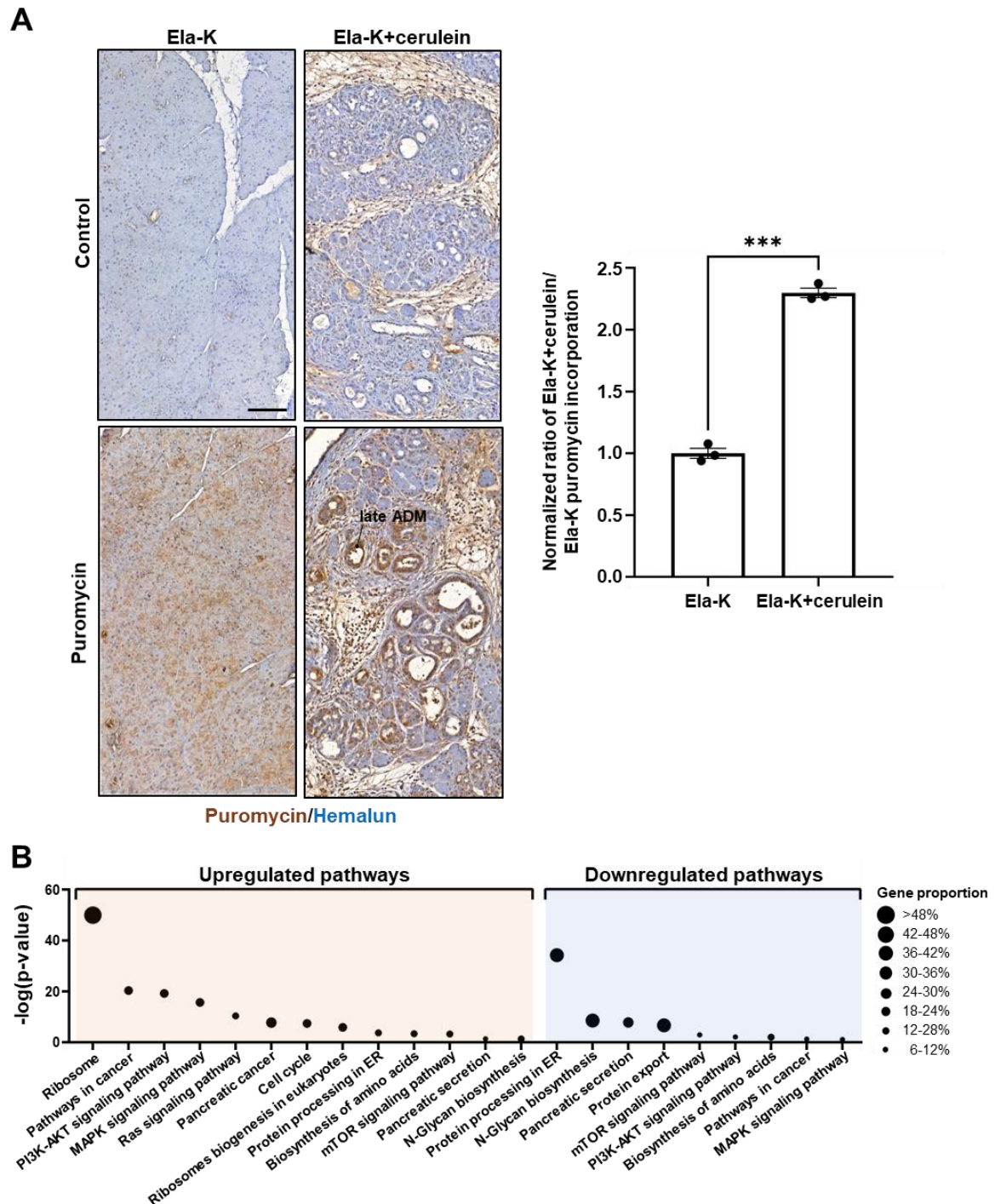
C. Results

Protein synthesis is increased upon initiation of pancreatic tumorigenesis

To characterize protein translation during pancreatic tumorigenesis, we used tamoxifen-treated *Elastase-Cre^{ER}/loxP-stop-loxP Kras^{G12D}* mice (Ela-K) in which a *Kras^{G12D}* mutation is induced specifically in acinar cells at the adult stage; in this model, tumor initiation is triggered by an inflammatory stimulus caused by the injections of cerulein (6). The first histological sign of this transformation is the modification of the shape of the acini (early ADM). Their lumen widens while the acinar cells flatten and begin to lose amylase expression. The process then amplifies to generate duct-like structures (late ADM).

To assess protein synthesis levels, we performed puromycin incorporation assays in which administration of puromycin results in incorporation into the C-terminus of elongating nascent proteins, resulting in premature termination of translation. Immunohistochemical analyses performed on pancreas sections revealed that cerulein treatment resulted in 2.3-fold higher puromycin incorporation in late ADM lesions of cerulein-treated Ela-K mice than in acinar cells of untreated Ela-K mice (Figure 1A). These findings reveal increased protein synthesis during the initiation step of pancreatic tumorigenesis.

To search for mechanisms driving increased protein synthesis, we examined our earlier data comparing the transcriptome of acinar cells sorted from the pancreas of untreated Ela-K mice and metaplastic acinar cells sorted from the pancreas of cerulein-treated Ela-K mice (7). This first showed that tumor initiation is associated with a strong upregulation of the genes belonging to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway “Ribosome”. Next, since tumorigenesis is usually associated with increased ER stress, we surprisingly found that genes of the KEGG pathway “protein processing in ER” were downregulated during pancreatic tumor initiation (Figure 1B). These results suggest that the control of protein translation during tumorigenesis in pancreatic acinar cells differs from other tissues.



Ela-K mice. The size of the black circles indicates the proportion of genes whose expression is modified in the corresponding pathway.

Increased EIF expression and activity are consistent with increased protein synthesis during pancreatic tumorigenesis

EIF are key regulators of protein translation as they determine the translation start site and facilitate the assembly of the pre-initiation complex (PIC) (8). Our transcriptomic data revealed an increased expression of 22 genes encoding EIF during pancreatic tumorigenesis. Conversely, transcripts encoding EIF known to negatively impact translation, namely EIF2AK3 (PERK), EIF2B1, EIF2AK1 (HRI), and EIF4EBP2, showed reduced expression (Supplementary Table 1: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_lMoZ?usp=sharing). These data fitted well with the above described increase in protein translation.

As a first attempt to validate our transcriptomic data, we immunolabeled pancreata from control and cerulein-treated Ela-K mice with antibodies against EIF2 β (EIF2S2), a subunit of EIF2 important for its recycling. This revealed weak and uniform acinar labeling in the absence of inflammation, while in the presence of inflammation, high expression of EIF2 β was observed in late ADM (Figure 2A). To further analyze the expression and activity of EIF, we focused on the phosphorylation status of EIF2 α (EIF2S1), EIF2B ϵ (EIF2B5) and RPS6, which are critical for assembling a fully functional PIC. The phosphorylation of EIF2 α and EIF2B ϵ is known to reduce translational activity, whereas phosphorylation of RPS6 stimulates translation. Western blot analyses showed a significant decrease in the phosphorylation of EIF2 α and EIF2B ϵ , while conversely, the P-RPS6/RPS6 ratio strongly increased (Figure 2B-C). Immunolabeling of pancreatic tissue to detect P-RPS6 was consistent with the latter result, since cerulein treatment of Ela-K mice increased the detection of P-RPS6 in late ADM (Figure 2D). Together, the expression and activity of EIF in pancreatic tumor initiation are consistent with the increased protein translation.

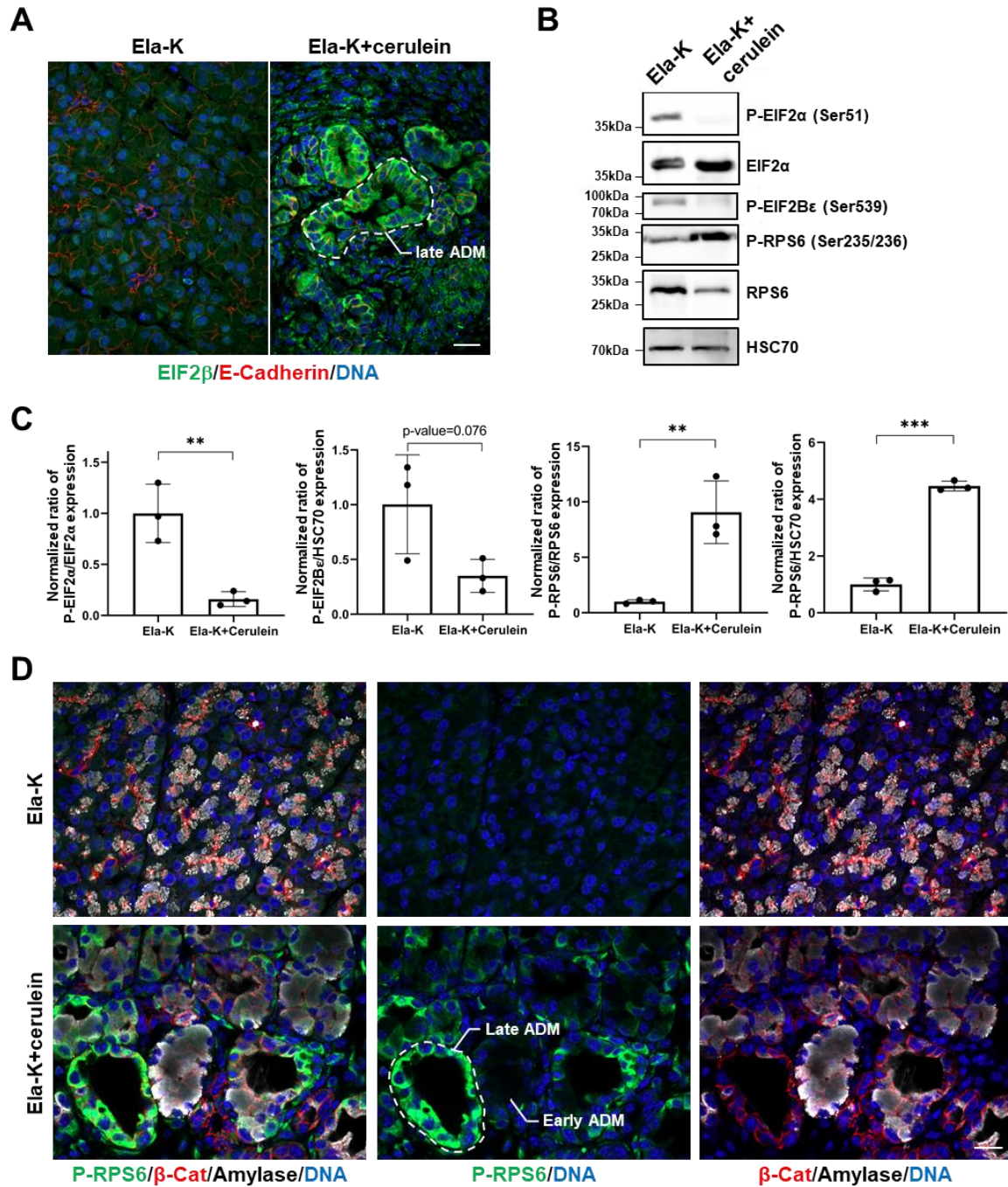


Figure 2. Higher protein translation during pancreatic tumor initiation is associated with increased EIF expression and/or activity. (A) Immunolabeling performed with EIF2β and E-Cadherin antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. n=3. (B) Western blotting carried out with the indicated antibodies on protein extracts from pancreas of Ela-K mice treated or not with cerulein. HSC70 protein was used as a loading control. (C) Graphs showing the normalized expression levels of the different proteins detected by Western blotting. (D). Immunolabeling carried out with P-RPS6, β-Catenin, and Amylase antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Late ADM is characterized by a sharp reduction in amylase expression, whereas this is maintained in early ADM. Scale bar: 20 μm. n=3.

Ribosome biogenesis is increased during pancreatic tumorigenesis

Alongside the increased expression of EIF, the transcription of 60 out of 79 genes encoding non-mitochondrial ribosomal proteins exhibited a significant upregulation during pancreatic tumorigenesis (Supplementary Table 1: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing). Using immunofluorescence labeling, we confirmed the increased expression in late ADM of RPL11 and RPS12, which are representative of the large and small ribosomal subunits, respectively (Figure 3A).

Next, we measured the expression of rRNA as an indicator of ribosome production. Northern Blot analyses detecting 28S and 18S RNA precursors from untreated and cerulein-treated total Ela-K pancreas revealed an increase ranging from approximately 2-fold for 18S-E rRNA to 8-fold for 46S/45S precursors in cerulein-treated pancreas (Figure 3B). These results support that more ribosomes are produced and suggest that an increased number of ribosomes can contribute to the increased protein synthesis observed during pancreatic tumor initiation.

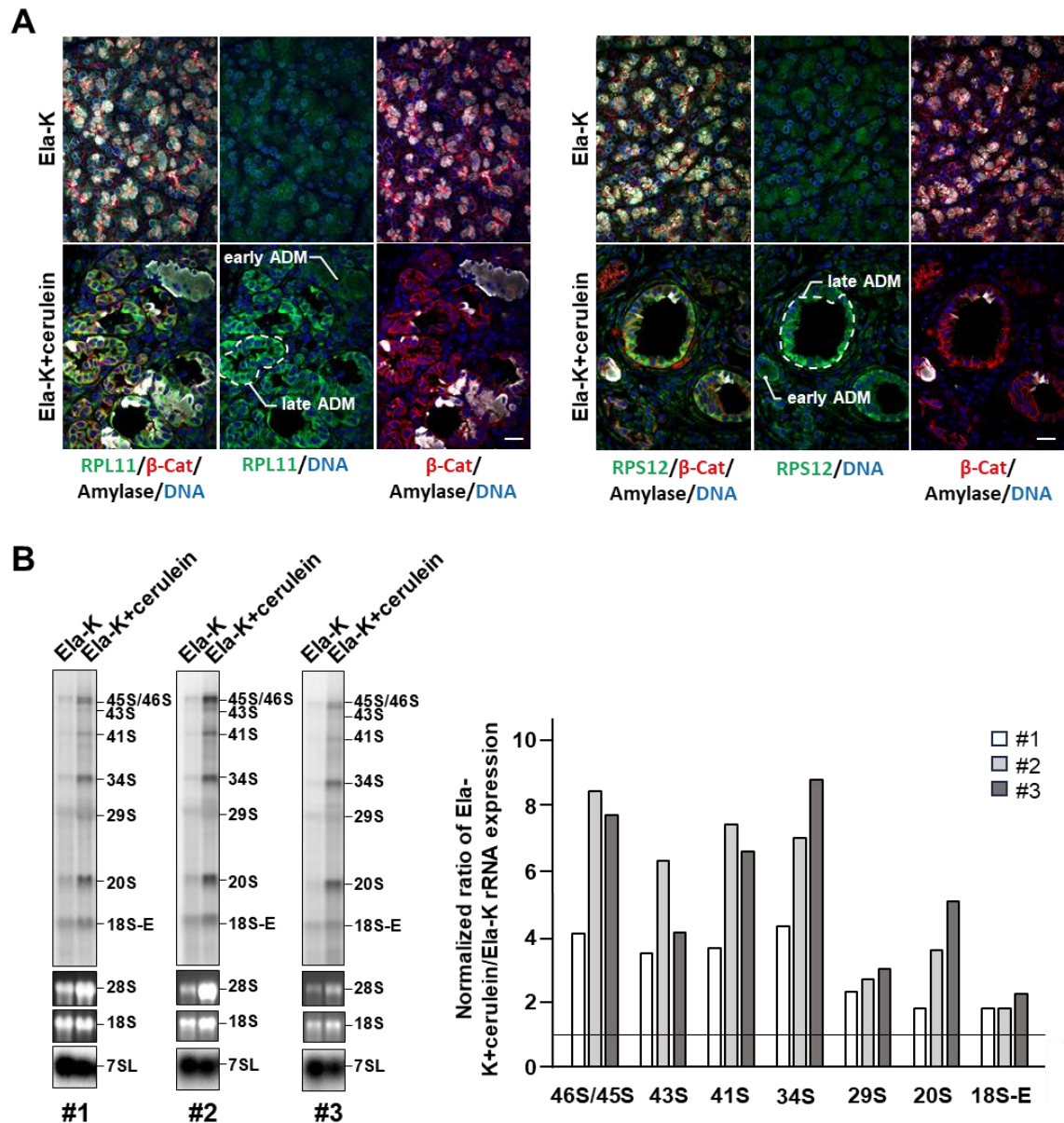


Figure 3. Increased production of ribosomal proteins and rRNA is observed during the initiation of pancreatic tumorigenesis. (A) Immunolabeling carried out with RPL11 (left panels), RPS12 (right panels), β -Catenin, and Amylase antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Scale bar: 20 μ m. n=3. (B) Northern blotting carried out with a probe specific to 28S and 18S rRNA on RNA samples extracted from pancreas of Ela-K mice treated or not with cerulein. Images of the 28S and 18S bands from the corresponding agarose gel (before transfer) are shown. 7SL RNA transcribed by RNA polymerase III was taken as loading control for normalization. The experiment was performed three times and the same trend, namely increased expression of rRNA precursors in cerulein-treated pancreas, was observed in each experiment. The graph displays the ratios of rRNA precursors, normalized to 7SL, in the pancreas of three cerulein-treated Ela-K mice compared to three untreated Ela-K mice. A value of 1 was taken for rRNA precursors in the pancreas of untreated Ela-K mice.

ER stress is reduced in late ADM

Increased protein synthesis, EIF expression and ribosomal biogenesis frequently co-occur during cancer initiation and lead to increased ER activity, resulting in increased protein folding capacities and, possibly, ER stress. ER function relies on different pathways, which include the unfolded protein response (UPR) and ER-associated degradation (ERAD) pathways. Strikingly, our transcriptomic analysis of cerulein-treated Ela-K pancreas revealed that the most downregulated pathway was “Protein processing in the ER”, which suggests reduced ER stress (Figure 1C; Supplementary Tables 1 and 2: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing).

To address this possibility, we first looked at the expression of UPR-related factors. The UPR depends on the transcription factors ATF6 and XBP1 which control the expression of several proteins involved in the UPR, including chaperones. In the absence of ER stress, ATF6 is preferentially localized to the ER membrane, and ER stress induces its cleavage and its translocation to the nucleus. We found that acinar cells from control pancreas display nuclear ATF6, consistent with ER stress being present (10). In striking contrast, ATF6 was undetectable in late ADM (Figure 4A). Like *Atf6*, *Xbp1* showed decreased expression during tumor initiation (Supplementary Table 1: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing). We confirmed these results by RT-PCR, for both *Xbp1* and its spliced form, *sXbp1* (Figure 4B).

Decreased expression of ATF6 and XBP1 should lead to decreased expression of chaperone proteins. Our RNAseq data indicated that this was indeed the case (Supplementary Table 1: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing). We confirmed this result for the GRP78 and PDIA1 chaperones, both by Western blotting and immunolabeling (Figure 4C-D). Interestingly, we also observed increased expression of members of the HSPA chaperone family, HSPA1b and HSPA8 (Supplementary Table 1). As chaperones appear to show specificity towards particular proteins, our data not only suggest a reduced protein folding capacity in PanIN, but also potentially a redirection of folding capacities towards other client proteins.

Next, we turned to the ERAD pathway which allows the degradation and elimination of misfolded or damaged proteins within the ER. ERAD encompasses a series of specialized proteins and enzymes that recognize defective proteins, unfold them when necessary, and tag them for degradation. Analysis of our RNA-seq data (Supplementary Table 1: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing) revealed decreased expression of various mRNA encoding proteins involved in this pathway, like ERAD-associated *Se11l*. Western Blot and immunolabeling corroborated this finding, with reduced levels of SEL1L seen in PanIN (Figure 4E-F). Collectively, these results indicate that different components of the ER stress pathway, namely transcription factors, UPR, and ERAD, exhibit reduced activity (Supplementary Table 2).

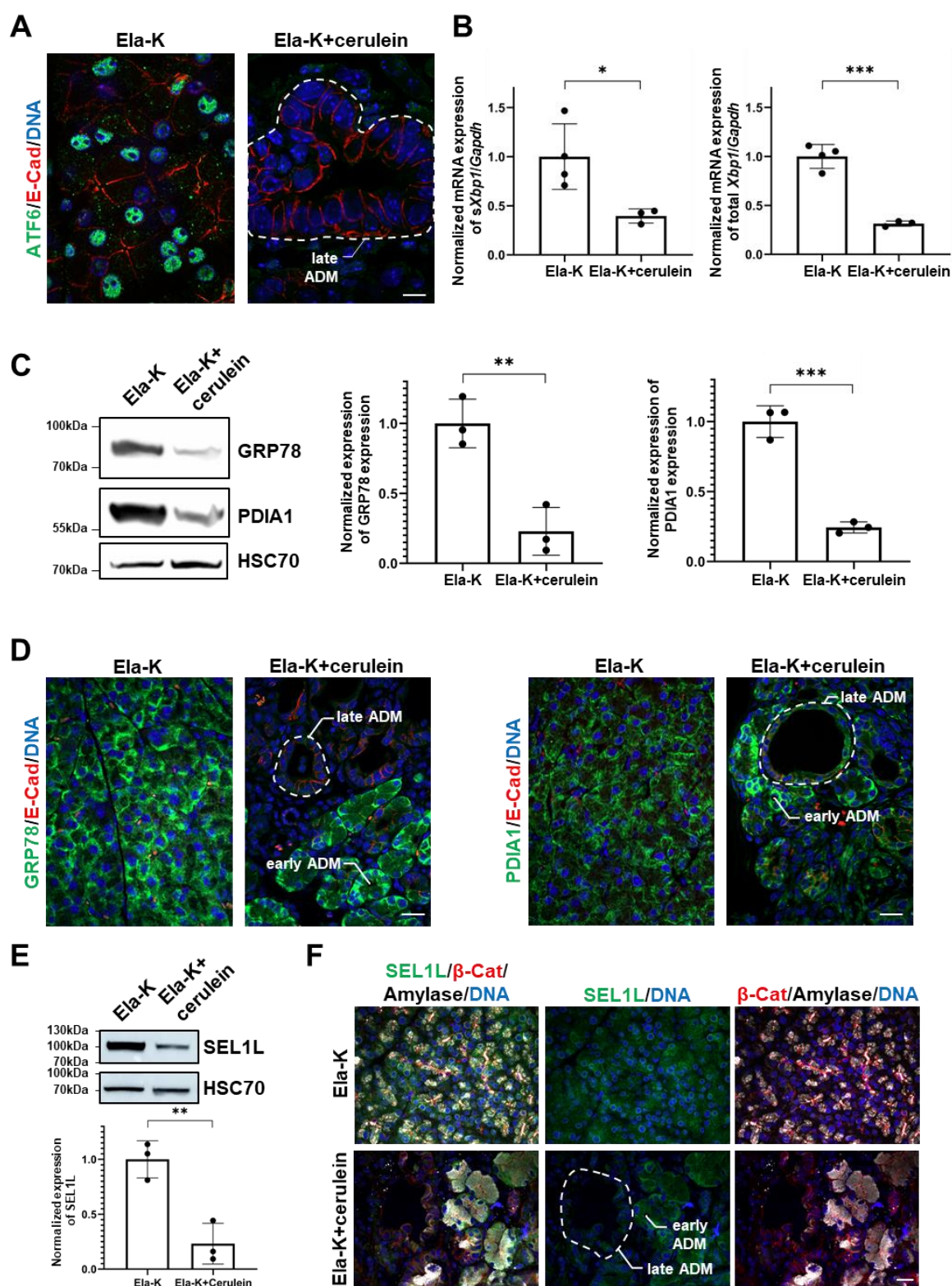


Figure 4. Initiation of pancreatic tumorigenesis is associated with reduced ER stress. (A) Immunolabeling performed with ATF6 and E-cadherin antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Scale bar: 10 μ m. n=3. (B) Graphs summarizing RT-qPCR data showing the relative expression of *Xbp1* and *sXbp1* in RNA samples from YFP-sorted cells of pancreas of Ela-K ROSA26^{YFP} mice treated or not with cerulein. *gapdh*

was used as internal control. Total *Xbp1* corresponds to the sum of *Xbp1* and *sXbp1* expression. (C) Western blotting performed with GRP78 and PDIA1 antibodies on protein extracts from pancreas of Ela-K mice treated or not with cerulein. HSC70 protein was used as a loading control for normalization. The graphs show the normalized expression of GRP78 and PDIA1, the expression in the pancreas of untreated Ela-K mice being set arbitrarily at 1. (D) Immunolabeling carried out with GRP78 (left panels), PDIA1 (right panels), and E-Cadherin antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Scale bar: 20 μ m. n=4. (E) Western blotting performed with SEL1L antibodies on protein extracts from pancreas of Ela-K mice treated or not with cerulein. HSC70 protein was used as a loading control for normalization. The graphs show the normalized expression of SEL1L, the expression in the pancreas of untreated Ela-K mice having been fixed arbitrarily at 1. (F). Immunolabeling carried out with SEL1L, β -Catenin, and Amylase antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Scale bar: 20 μ m. n=3.

Reduced ER stress is associated with decreased N-glycosylation

N-glycosylation of proteins is a complex error-prone process that takes place in the ER. It must therefore verify that N-glycosylation has been carried out correctly, which implies a high level of ER stress. The KEGG pathway "N-glycan biosynthesis" was the second most downregulated pathway in our RNAseq data (Figure 1A) and this involved genes of the oligosaccharyltransferase complex (*Rpn1*, *Stt3b*, and *Ddost*), and genes encoding a subunit of glucosidase II (*Ganab*), or mannosidases (*Man1a1* and *Man1a2*;

Supplementary

Table

1:

https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing).

Interestingly, the mannosidase MAN1B1, which produces a proteoglycan slightly different from that produced by MAN1A, showed increased expression.

This suggests that pancreatic tumor initiation is associated not only with a decrease in the N-glycosylation process, but also with a reorientation of this process towards glycosylation of new proteins. To confirm this decrease, we tested the expression of DDOST and UGGT1, which reglucosylates glycoproteins with minor folding defects, and found decreased expression of both proteins in late ADM (Figure 5A-B). Collectively, these findings suggest a reduction in N-glycosylation activity during pancreatic tumorigenesis.

To confirm this result, we used lectins which are proteins binding to specific carbohydrate residues of other molecules. The lectins Ricinus Communis Agglutinin 1 (RCA 1) and Concanavalin A

bind to carbohydrate structures that are linked to N-glycosylation, and not to O-glycosylation. RCA 1 recognizes terminal non-reducing β -D-galactose (Gal β) and neutral and sialylated oligosaccharides, while Concanavalin A binds to D-mannose and D-glucose. On sections of control pancreas, RCA 1 showed preferential labeling of zymogen granules while Concanavalin A showed uniform labeling in the cytoplasm with strong enrichment around the nuclei of acinar cells (Figure 5C). On sections of pancreas from cerulein-treated mice, Concanavalin A revealed uniform labeling similar to untreated mice, with no difference in intensity between early and late ADM. In contrast, RCA 1 labeling was present in early ADM, but absent in late ADM (Figure 5C). These results are in line with our gene expression data, and correlate reduced N-glycosylation activity in late ADM with decreased expression of digestive enzymes during metaplasia.

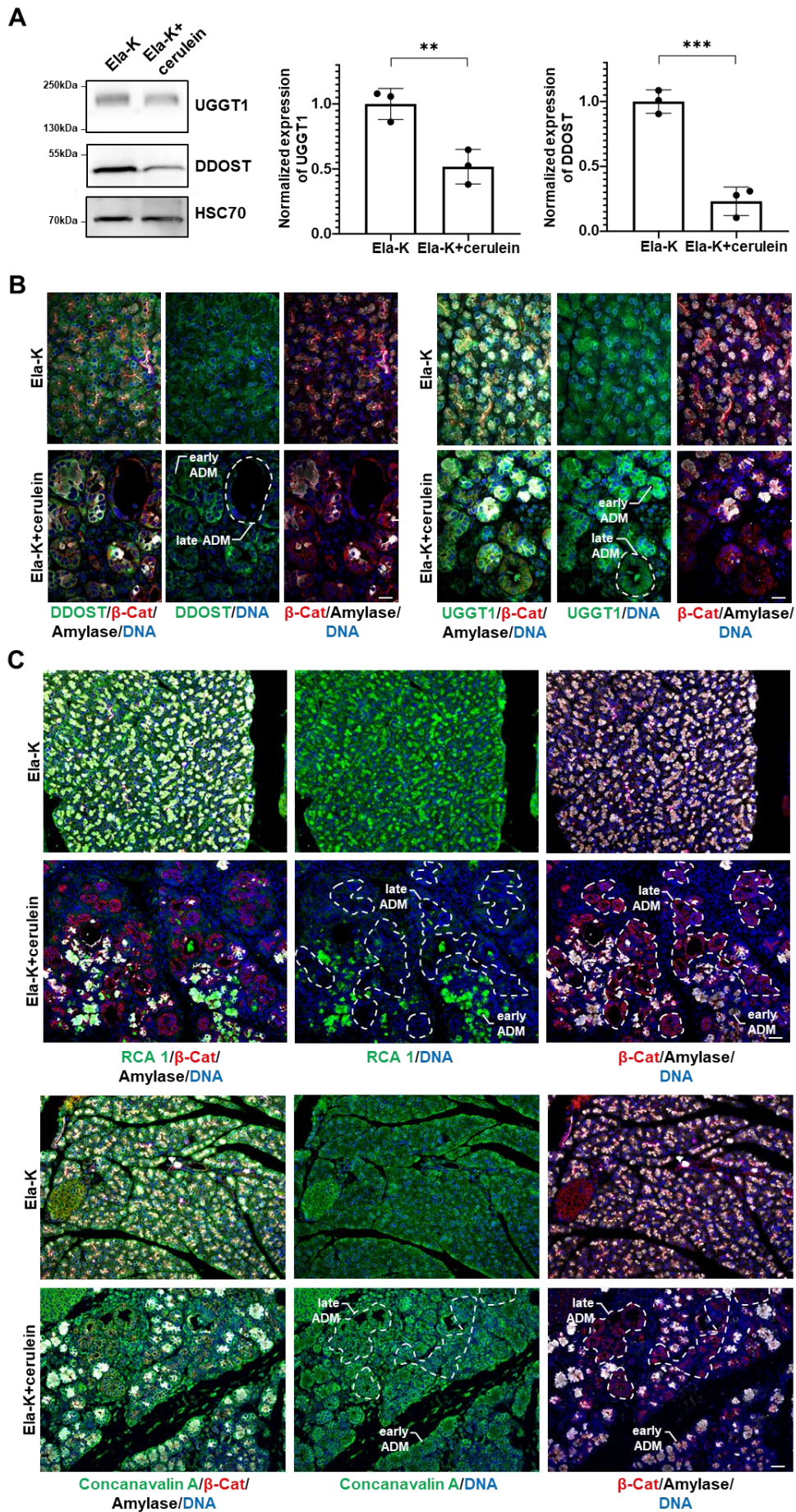


Figure 5. N-glycosylation pathway genes are downregulated during the initiation of pancreatic tumorigenesis. (A) Western blotting performed with UGGT1 and DDOST antibodies on protein extracts from pancreas of Ela-K mice treated or not with cerulein. HSC70 protein was used as a loading control for normalization. The graphs show the normalized expression of UGGT1 and DDOST, the expression in the pancreas of untreated Ela-K mice being set arbitrarily at 1. (B) Immunolabeling carried out with DDOST (left panels), UGGT1 (right panels), β -catenin, and Amylase antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Scale bar: 20 μ m. n=3. (C) Immunolabeling carried out with RCA 1 (top panels), Concavalanin A (bottom panels), β -catenin, and Amylase antibodies on pancreas sections from Ela-K mice treated or not with cerulein. Cell nuclei (DNA) were labeled in blue using Hoechst. Scale bar: 20 μ m. n=3.

D. Discussion

Cancer cells have significant proliferation capacities which rely on their ability to hijack fundamental cellular processes, including translation. This allows them to increase their level of protein synthesis thanks to a coordinated action on the activity of eIF, the production of ribosomes, and persistent ER stress (4,5). In this context, cancer cells show an higher activity of these pathways, as compared to the normal cells from which they derive. Here we provide evidence that the pancreatic acinar cells might deviate from this rule.

To ensure production of digestive enzyme, acinar cells have the highest rate of protein synthesis of all cell types. These cells possess a highly developed ER and mechanisms capable of modifying and transporting newly synthesized proteins, mostly glycosylated, through the secretion pathway (11). When exposed to chronic inflammation, acinar cells undergo ductal metaplasia and produce fewer digestive enzymes. The presence of a *KRAS* mutation amplifies the metaplastic process, leading to the formation of PanIN and possibly to PDAC (12). In the present study, we sought to clarify how the acinar cell adapts its translation machinery when initiating an oncogenic process.

Consistent with the view that tumorigenesis is associated with increased protein synthesis, we found that the inflamed pancreas still has the capacity to increase its level of protein synthesis, as compared to a normal pancreas. This increase is supported both by our puromycin incorporation experiment and by our observation of decreased phosphorylation of EIF2 α , following decreased expression of *Perk* and *Hri*, which encode kinases inhibiting its activity. This increased protein synthesis was stronger in late ADM. This similarity extends to increased EIF activity. Thus, in addition to the increase in many transcripts encoding EIF subunits, EIF2 activity is certainly increased following decreased EIF2A phosphorylation coupled with increased GTP binding. Furthermore, the activity of EIF4E is most likely increased following decreased expression of 4EBP1, as well as that of EIF4B following phosphorylation induced by RPS6 kinase. Decreased expression of 4EBP1 in neoplasia has previously been described, both in mice and humans (13). Ribosomal proteins and rRNAs are also

increased in the inflamed pancreas. This is also most pronounced in late ADM and is expected to allow the production of more ribosomes, in order to support the increased demand for protein synthesis.

As opposed to tumorigenesis in other tissues, and in line with another study (14), the reduced expression of ATF6, XBP1, and, chaperones, including GRP78, provides evidence that the induction of pancreatic tumorigenesis is associated with reduced ER stress. This suggests that late ADM do not required protein folding capabilities as high as those of acinar cells. Furthermore, these capabilities are probably also modified, depending on the new needs of late ADM. An illustrative example is provided by changes in the expression of members of the disulfide isomerase (PDI) family. Thus, if the expression of *P4hb*, *Pdia3*, *Pdia4*, *Pdia6*, and *Txndc5* is reduced in the inflamed pancreas (our transcriptomic data), it appears that the expression of the PDI AGR2 is increased in ADM and PanIN (14). Interestingly, through the formation of disulphide bonds, AGR2 is involved in the maturation of Mucin5AC (15), a mucin absent from acinar cells but produced by PanIN.

Although reduced ER stress is surprising in these tumorigenic conditions, our results provide a coherent explanation for such a finding. Indeed, the acinar cell has the function of producing an important quantity of digestive enzymes which are largely glycosylated before being secreted. Glycosylation is a complex error-prone process, which therefore requires significant monitoring by the ER. When metaplasia is initiated, the modification of the gene program in metaplastic acinar cells leads to the production of fewer digestive enzymes. Consistently, glycosylation activity is reduced, thus allowing to reduce ER stress, even if overall protein synthesis is increased. This explanation is supported by the reduced expression of enzymes involved in the N-glycosylation process which leads to an overall decreased N-glycosylation. However, metaplasia may be associated with production of new N-glycans. In this context, our RNAseq data show upregulation of *Tusc3*, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex that increases glycosylation efficiency of a subset of glycoproteins (16), and of *Man1b1* which produces a N-glycan slightly different from that synthesized by *Man1a1* and *Man1a* (17), of which we find that the expression decreases. Additional support for our results is

also provided by the downregulation of the “pancreatic secretion” and “protein export” KEGG pathways (Figure 1B). In fact, secreted proteins have a signal peptide allowing them to be addressed to the ER. This signal peptide is cleaved during the secretion process by signal peptidases. Interestingly, we observe that pancreatic tumor initiation is associated with a significant decrease in the transcription of genes encoding proteins involved in the transport of precursor polypeptides into the endoplasmic reticulum (*Sec62*, *Sec63*, and *Sec61b*), as well as of that encoding signal peptidases (*Spcs3*, *Spcs2*, and *Sec11c*).

Our work focuses on cancer precursor lesions, not on PDAC. In that context, we must consider that tumor initiation is a stepwise process that includes the dynamic evolution of protein synthesis and related mechanisms. Thus, the literature mentions high UPR activity in PDAC (19). A role for the UPR in PDAC is supported by the fact that the UPR regulator GRP78 is important for PDAC development (20); however, this function is not incompatible with a decreased GRP78 expression in late ADM, as we observe. Regarding pancreatitis, it appears that a high UPR is observed after a few hours of induction of pancreatitis (21), while our data relate to pancreatitis established after a week. Interestingly, when it was possible, our data were supported by the transcriptome of sorted normal and metaplastic acinar cells, and by immunolabeling, allowing the visualization of protein expression in the different cell types; this allows a more detailed analysis of the results, compared to experiments carried out on bulk pancreatic samples of RNA and proteins which represent a mixture of different cell types, with the presence of a strong immune component, in the presence of inflammation. Altogether, this indicates that translation mechanisms rates can be tightly adapted at each stage of tumorigenesis.

In conclusion, our study of protein synthesis during the initiation of pancreatic tumorigenesis uncovered a pancreas-specific regulation of translation, which combines both high protein synthesis and reduced ER stress. These findings provide valuable insights into the complexities of translation control and its role in pancreatic tumor development, offering new avenues for future research and potential therapeutic targets.

E. Materials and methods

Mouse model and cerulein treatments

All procedures described in this study were performed with the approval of the animal welfare committee of the UCLouvain Health Sciences Sector (Brussels, Belgium, ethic number: 2021/UCL/MD/054). ElastaseCre^{ER} LSLKras^{G12D} (Ela-K) mice were maintained in a CD1-enriched background; this mouse model allows the expression of a mutated Kras^{G12D} allele specifically in acinar cells. Six-week-old Ela-K mice were treated with tamoxifen (T5648-1G, Sigma-Aldrich. 30 mg/ml in corn oil) by oral gavage and 4-hydroxytamoxifen (H7904-25mg, Sigma-Aldrich. 0.3 mg/ml in corn oil) by subcutaneous injection. Three sets of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen treatments, each separated by 48 hours, allowed the recombination of the LSL cassette and the expression of Kras^{G12D} from its respective endogenous locus. To induce acute pancreatitis, 8-week-old Ela-K mice previously treated with tamoxifen received 7 hourly intraperitoneal injections of cerulein (AS-24252, Eurogentec. 100-150 µl in phosphate buffered saline-PBS, pH 7.4, 125 µg/kg body weight), every other day, for 5 days. Mice were sacrificed by cervical dislocation and pancreases were collected for subsequent analyses.

Western blotting

Tissues were lysed using an Ultra Turrax® T10 homogenizer in a buffer composed of 50 mM Tris-Cl, 150 mM sodium chloride, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and a protease inhibitor cocktail (11836153001, Sigma-Aldrich). Lysates were maintained on ice during the procedure. Then, cell debris were pelleted by centrifugation (14,000 *g*, 10 minutes, 4°C). Proteins were quantified using a Bradford assay (23200, Thermo Fisher Scientific). Fifty µg total proteins from the lysates were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels before to be transferred to polyvinylidene difluoride membranes (ISEQ00010, Millipore). Membranes were blocked with a solution of 5% low-fat milk, or 5% bovine serum albumin (9048-46-8, MP Biomedicals), diluted in Tris buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20 (P2287, Sigma-Aldrich), for 1 hour at room temperature

(RT), and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (List 1) diluted in blocking buffer. For normalization, HSC70, as loading control, or Ponceau S (P7170, Sigma-Aldrich) was used. Then, membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with secondary antibodies for 1 hour at RT. After incubation, membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20, and signals were revealed using SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34577, Thermo Fisher). Pictures were taken with the Amersham ImageQuant 800 imaging system (Cytiva). Densitometry was conducted using FIJI software (ImageJ), and the ratio of protein of interest to HSC70 was computed.

Immunofluorescence

Tissues were fixed for 4 hours with 4% paraformaldehyde at 4°C. Six-µm paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed by heating the slides for 20 minutes in Tris-EDTA buffer (pH 9) using Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific) or for 10 minutes in Citrate buffer (pH 6) using microwave (800W). Sections were rinsed 5 minutes in PBS, and permeabilized in PBS, 0.3% Triton X-100 (3051.3, Carl Roth) for 5 minutes at RT. After permeabilization, samples were blocked in PBS/3% low-fat milk/10% bovine serum albumin (A906-100G, Sigma-Aldrich)/0.3% Triton X-100 (blocking buffer) for 45 minutes at RT. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and incubated overnight with the samples at 4° C. Primary antibodies and antibody dilutions are listed in List 1. Then, samples were washed with 0.1% Triton X-100 in PBS. Secondary antibodies were diluted in PBS, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100, and incubated for 1 hour at 37°C. Nuclei were counterstained with Hoechst (B2261, Sigma-Aldrich. 3.2 µM). Finally, samples were washed with 0.1% Triton X-100 in PBS, and the slides were mounted in fluorescence mounting medium (S302380-2, Agilent). For lectin labeling, Alexa Fluor 488-conjugated Concanavalin A (C11252, ThermoFisher, 50 µg/ml) and Fluorescein-conjugated RCA 1 (FL-1081-1, Vector Laboratories, 100 µg/ml), diluted in PBS, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100, were used. Pancreatic glycoproteins recognized by these lectins are not known. Imaging was performed with Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software. Laser power and exposure times were similar for images from each data sets.

List 1. Antibodies used.

Antibody	Origin	Dilution IF/IHC	Dilution WB	Reference
UGGT1	Rabbit	4.0 µg/ml	0.8 µg/ml	ProteinTech (14170-1-AP)
DDOST	Rabbit	3.6 µg/ml	0.36 µg/ml	ProteinTech (14916-1-AP)
SEL1L	Rabbit	10 µg/ml	1.0 µg/ml	Abcam (ab78298)
ATF6	Rabbit	13 µg/ml	0.65 µg/ml	ProteinTech (24169-1-AP)
PDIA1	Rabbit	1.13 µg/ml	113 ng/ml	Cell Signaling (3501)
GRP78	Rabbit	0.98 µg/ml	98 ng/ml	Cell Signaling (3177)
RPL11	Rabbit	2.1 µg/ml	0.21 µg/ml	ProteinTech (16277-1-AP)
RPS12	Rabbit	5.07 µg/ml	0.25 µg/ml	ProteinTech (16490-AP)
EIF2S2	Rabbit	5.07 µg/ml	0.25 µg/ml	ProteinTech (10227-1-AP)
S6 ribosomal protein	Rabbit	0.18 µg/ml	37 µg/ml	Cell Signaling (2217)
P-S6 ribosomal protein (Ser235/236)	Rabbit	0.14 µg/ml	28 ng/ml	Cell Signaling (2211)
EIF2α	Mouse	1.86 µg/ml	93 ng/ml	Cell Signaling (2103)
P-EIF2α	Rabbit	0.37 µg/ml	37 ng/ml	Cell Signaling (3398)
P-EIF2Bε (Ser539)	-	-	0.5 µg/ml	Abcam (ab4775)
Puromycin	Mouse	1.0 µg/ml	1.0 µg/ml	Merck Millipore (MABE343)
E-Cadherin	Mouse	1.25 µg/ml	-	BD Biosciences (610182)
β-Catenin	Mouse	0.25 µg/ml	-	BD Biosciences (610154)
Amylase	Mouse	0.4 µg/ml	-	Santa Cruz (sc-46657)
HSC70	Mouse	-	40 ng/ml	Santa Cruz (sc-7298)
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Horse	-	36.8 ng/ml	Cell Signaling (7076)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Goat	-	0.16 µg/ml	Enzo Life Sciences (ADI-SAB-300-J)
Anti-Mouse IgG1, Alexa Fluor™ 594	Goat	2.0 µg/ml	-	Thermo Fisher Scientific (A21125)
Anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488	Donkey	2.0 µg/ml	-	Thermo Fisher Scientific (A21206)
Anti-Mouse IgG2a, Alexa Fluor™ 647	Goat	2.0 µg/ml	-	Thermo Fisher Scientific (A21241)

Puromycin incorporation assay

Puromycin (P8833, Sigma-Aldrich. 40 nmol/g body weight in PBS) was injected intravenously 50 minutes prior to mouse euthanasia. Immunohistochemistry with anti-puromycin antibody was performed on paraffin-embedded tissue section, as described in the “Immunofluorescence” section, with the following changes adapted from reference 21. The slides were placed in blocking buffer for 20 minutes and subsequently incubated for 1 hour in a blocking solution that included anti-mouse IgG Fab (1:10 - Jackson ImmunoResearch). Following three 5-minute washes with 0.1% Triton X-100 in PBS, the samples were then incubated overnight in blocking buffer that included anti-puromycin antibody.

DAB Substrate Kit (ab64238, Abcam) was applied for 10 minutes, and the reaction was stopped by rinsing tissue sections with distilled water. Sections were counterstained with Mayer's hemalun solution (1.09249.1000, Sigma-Aldrich). Images of four tissue sections per mouse were acquired with a Zeiss Mirax Midi digital microscope. The Halo software (Indica Labs, Area quantification v.2.2.1) was employed for quantification of puromycin incorporation. For Ela-K mice (3 mice, 4 slides/mice), the entire surface of the pancreas was considered, with the exception of the islets of Langerhans and the large ducts. The mean value of the quantifications performed on Ela-K mice was arbitrarily set to 1. For cerulein-treated Ela-K mice (3 mice, 4 slides/mice), quantification was performed on 30 late ADM lesions per mouse. Late ADM lesion is defined by a metaplastic acinar structure whose lumen measures at least 3 times the length of a cell of that lesion. Early ADM lesion is defined as a metaplastic acinus whose lumen does not measure more than once the length of a cell of this lesion.

RNA extraction, Northern Blot, and RT-qPCR

Biopsies were obtained from mouse pancreas, incubated in RNALater (Thermo Fisher Scientific) overnight at 4°C, and frozen in liquid nitrogen. Tissue homogenization was performed by grinding the biopsies in liquid nitrogen with a plastic pestle. Total RNA was extracted using the TRI Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Northern blot was then performed for steady-state pre-rRNA analysis (23). Briefly, 3-4 µg of total RNA were resolved on agarose denaturing gels (6% formaldehyde/1.2% agarose in 50 mM HEPES/1mM EDTA). Electrophoresis was carried out for 16 hours at 65 V. RNA were transferred from agarose gels to nylon membranes (GE Healthcare) by capillarity in 10x saline sodium citrate (SSC). Membranes were prehybridized for 1 hour at 65°C in 50% formamide, 5x SSPE, 5x Denhardt's solution, 1% w/v SDS, 200 µg/ml fish sperm DNA solution (Roche). The ³²P-labeled oligonucleotide probe was added and incubated with the membrane for 1 hour at 65°C and then overnight at 37°C. Then, the membranes were washed 3 times for 3 minutes in 2x SSC and exposed to Fuji imaging plates (Fujifilm). After 48 or 72 hours, signals were acquired with a Phosphorimager (FLA-7000, Fujifilm) and quantified with the native Multi Gauge Software (Fujifilm, v 3.1). 7SL RNA was used as loading control. Sequences of the probes are:

LD4099 (ITS1-1a): ACGCCGCCGCTCCTCCACAGTCTCCCGTT

LD2133 (7SL): GCTCCGTTTCCGACCTGGGCC

RT-qPCR were performed on RNA extracted of YFP-sorted cells from Ela-K Rosa26^{YFP} mice treated or not with cerulein (7). Primers used were the following ones:

Spliced *Xbp1*: Forward CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG; Reverse GTCCATGGGAAGATGTTCTGG

Unspliced *Xbp1*: Forward CAGCACTCAGACTATGTGCA ; Reverse GTCCATGGGAAGATGTTCTGG

Total *Xbp1*: Forward TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG; Reverse GTCCATGGGAAGATGTTCTGG

Gapdh: Forward AAAGGTCGGTGTGAACGGATTGG; Reverse CGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAG

Statistical analysis

Data were presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Single comparisons between two experimental groups were done using a paired Student's t test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with GraphPad 8.0.2 Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant.

Acknowledgments

We would like to thank Frédéric Lemaigre, Yvan Martineau, and members of the laboratory of Patrick Jacquemin and Frédéric Lemaigre for help and discussions, Jean-Nicolas Lodewyckx and Hajar Dahou for mouse genotyping, and Mourad El Kaddouri and Bruno Maricq for their help in mouse care.

Funding

This work was supported by grants from FRS-FNRS (J.0096.21 and J.0097.23 to P. Jacquemin, and T.0115.22 to D. Lafontaine and P. Jacquemin) and Télémie (7.4553.19 and 7.6524.21 to P. Jacquemin). Research in the Lafontaine Lab was supported by the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique

(F.R.S./FNRS), Université libre de Bruxelles (ULB), EOS [CD-INFLADIS, 40007512], Région Wallonne (SPW EER) Win4SpinOff [RIBOGENESIS], the COST action TRANSLACORE (CA21154) on Translation & Cancer, and the European Joint Programme on Rare Diseases (EJP-RD) RiboEurope and DBAGeneCure. Maxime Libert holds a Télévie fellowship (7.4553.19 and 7.6524.21). P. Jacquemin and D. Lafontaine are Research Director at FRS-FNRS, Belgium.

Authors

All authors had access to the study data and had reviewed and approved the final manuscript.

Data availability

Data, analytic methods, and study materials is made available to other researchers.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

F. References

1. Case RM. Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biological Reviews* 1978. 53(2), 211-347.
2. Kubisch CH and Logsdon CD. Endoplasmic reticulum stress and the pancreatic acinar cell. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2008. 2(2), 249-260.
3. Halbrook CJ, Lyssiotis CA, di Magliano MP and Maitra A. Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell* 2023, 186(8), 1729-1754.
4. Smith RC, Kanellos G, Vlahov N, Alexandrou C, Willis AE, Knight JR and Sansom OJ. Translation initiation in cancer at a glance. *Journal of Cell Science* 2021. 134(1), jcs248476.
5. Chen X and Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nature Reviews Cancer* 2021. 21(2), 71-88.
6. Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, Rodríguez-Justo M, Serrano M and Barbacid M. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 2011. 19(6), 728-739.
7. Assi M, Achouri Y, Lorient A, Dauguet N, Dahou H, Baldan J, Libert M, Fain JS, Guerra C, Bouwens L, Barbacid M, Lemaigre FP and Jacquemin P. Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Research* 2021. 81(10), 2679-2689.
8. Querido JB, Díaz-López I and Ramakrishnan V. The molecular basis of translation initiation and its regulation in eukaryotes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2023. 1-19.
9. Blanchet S and Ranjan N. Translation phases in eukaryotes. *Ribosome Biogenesis: Methods and Protocols* 2022, 217-228.
10. Chen X, Shi C, He M, Xiong S and Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023. 8(1), 352.
11. Pandolfi SJ. Pancreatic embryology and development. *The Exocrine Pancreas*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. 2010.
12. Marstrand-Daucé L, Lorenzo D, Chassac A, Nicole P, Couvelard A, and Haumaitre C. Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2023. 24(12), 9946.
13. Martineau Y, Azar R, Müller D, Lasfargues C, El Khawand S, Anesia R, Pelletier J, Bousquet C and Pyronnet S. Pancreatic tumours escape from translational control through 4E-BP1 loss. *Oncogene* 2014. 33(11), 1367-1374.
14. Dumartin L, Alrawashdeh W, Trabulo SM, Radon TP, Steiger K, Feakins RM, di Magliano MP, Heeschen C, Esposito I, Lemoine NR and Crnogorac-Jurcevic T. ER stress protein AGR2 precedes and is involved in the regulation of pancreatic cancer initiation. *Oncogene* 2017. 36(22), 3094-3103.
15. Schroeder BW, Verhaeghe C, Park SW, Nguyenvu LT, Huang X, Zhen G and Erle DJ. AGR2 is induced in asthma and promotes allergen-induced mucin overproduction. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012. 47(2), 178-185.
16. Mohorko E, Owen RL, Malojčić G, Brozzo MS, Aebi M and Glockshuber R. Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation. *Structure* 2014. 22(4), 590-601.
17. Moremen KW and Nairn AV. Mannosidase, Alpha, class 1 (MAN1A1 (Golgi alpha-mannosidase IA), Man1A2 (Golgi alpha-mannosidase IB), MAN1B1 (ER alpha-mannosidase I), MAN1C1 (Golgi alpha-mannosidase IC)). *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* 2014. 1297-1312.

18. Illiano A, Pinto G, Melchiorre C, Carpentieri A, Faraco V and Amoresano A. Protein glycosylation investigated by mass spectrometry: an overview. *Cells* 2020. 9(9), 1986.
19. Borrello MT, Martin MB and Pin CL (2022). The unfolded protein response: An emerging therapeutic target for pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2022. 22(1), 148-159.
20. Shen J, Ha DP, Zhu G, Rangel DF, Kobiela A, Gill PS, Groshen S, Dubeau L and Lee AS. GRP78 haploinsufficiency suppresses acinar-to-ductal metaplasia, signaling, and mutant Kras-driven pancreatic tumorigenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017. 114(20), E4020-E4029.
21. Kubisch CH and Logsdon CD. Secretagogues differentially activate endoplasmic reticulum stress responses in pancreatic acinar cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007. 292(6), G1804-G1812.
22. Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P and Hornberger TA. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *The FASEB Journal* 2011. 25(3), 1028.
23. Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries JL, Mullineux ST, Stamatopoulou V, Mullier R, Wacheul L, Lafontaine DL. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell* 2013. 51(4):539-51

II. Aucune preuve de la présence et du contrôle de la croissance tumorale par les granules de stress dans les cancers porteurs d'une mutation Kras

Notre intérêt pour les granules de stress (SG) est né de l'analyse de données transcriptomiques montrant que l'expression de plusieurs ARNm codant pour des protéines de SG augmente au cours de l'initiation du cancer du pancréas. Nous avons donc posé l'hypothèse que les SG jouent un rôle dans la tumorigénèse pancréatique et avons investigué, dans un premier temps, leur présence dans des lésions précancéreuses à l'aide d'anticorps ciblant des protéines essentielles à leur formation, à savoir G3BP1, G3BP2, et UBAP2L. Nous avons rapidement constaté l'absence de SG dans ces lésions. Néanmoins, l'augmentation de l'expression de G3BP1 et de G3BP2 que nous avons observé au cours de l'initiation tumorale pancréatique a suscité notre intérêt, et nous a poussé à étudier leur rôle pro-oncogénique. Les résultats détaillant ce rôle sont présentés dans la troisième section des Résultats de cette thèse.

Durant cette étude, deux articles provenant d'un même laboratoire ont identifié un rôle des SG dans le cancer pancréatique. Etant donné notre intérêt pour G3BP1/2, il nous a paru essentiel de renforcer notre première donnée relative à l'absence des SG dans le PDAC à travers une étude dédiée à cette question. Les résultats que nous avons obtenus ont été rassemblés au sein d'un manuscrit qui est en cours de révision dans le journal *EMBO Reports*.

Dans cet article, j'ai contribué à la conception expérimentale, à l'acquisition des données, à l'analyse, ainsi qu'à l'interprétation des résultats.

No evidence for the presence and control of tumor growth by stress granules in Kras mutant cancers

Maxime Libert¹, Jean S. Fain¹, Sébastien Pyr dit Ruys¹, Malak Haidar¹, Margaux Wulleman¹, Gaëtan Herinckx¹, Didier Vertommen¹, Christelle Bouchart², Tatjana Arsenijevic³, Jean-Luc Van Laethem³, Patrick Jacquemin^{1#}

¹Université catholique de Louvain, de Duve Institute, 1200 Brussels, Belgium, ²Department of Radiation Oncology, Jules Bordet Institute, Brussels, Belgium, ³Université libre de Bruxelles, Erasme University Hospital, Laboratory of Experimental Gastroenterology, Brussels, Belgium

#Corresponding author: patrick.jacquemin@uclouvain.be

Running title: Absence of stress granules in cancer

Table 3 and 4 are available on:

https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_lMoZ?usp=sharing

Abstract

Stress granules (SG) are membraneless ribonucleoprotein-based cytoplasmic organelles that assemble in response to stress. Their formation is often associated with an almost global suppression of translation, and the aberrant assembly or disassembly of these granules has pathological implications in neurodegeneration and cancer. In cancer, and particularly in the presence of oncogenic KRAS mutations, *in vivo* studies concluded that SG increase the resistance of cancer cells to stress. Hence, SG have recently been considered a promising target for therapy. Here, starting from our observations that genes coding for SG proteins are stimulated during development of pancreatic ductal adenocarcinoma, we analysed the formation of SG during tumorigenesis. We resorted to *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches, using mouse models, human samples and human data. Our analyses did not support that SG are formed during tumorigenesis of KRAS-driven cancers, leading us to propose that caution is required before considering SG as therapeutic targets.

Keywords: cancer/KRAS/PDAC/stress granules

Introduction

Stress granules (SG) are dense membraneless aggregates composed of proteins and RNA found in the cytoplasm of stressed cells. Various stresses, such as heat shock, nutrient deprivation, or the presence of reactive oxygen species (ROS), can induce their formation (Glauninger *et al*, 2022; Ripin *et al*, 2023). The composition of cytoplasmic SG, whether their protein or RNA content, varies according to the conditions of their formation. A compilation of different studies indicates that hundreds of proteins, a significant part of which are defined as RNA binding proteins (RBP), can be integrated into SG (Youn *et al*, 2019). Among these proteins, some are essential for the formation of SG, as in their absence, SG cannot be formed; this is particularly the case for the stress granule assembly factors Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP)1, G3BP2, and ubiquitin-associated protein 2 like (UBAP2L) (Matsuki *et al*, 2013; Markmiller *et al*, 2018).

The function of SG is still subject to discussion, and many hypotheses have been put forward to explain their role. A recurring hypothesis is that they allow transiently protecting transcripts from degradation during stress. This hypothesis stems in part from the observation that the presence of stress granules is associated with an overall inhibition of protein synthesis, with the notable exception of some transcripts encoding proteins directly involved in the management of a stressful stimulus, such as heat shock proteins, which are not integrated into SG and are highly translated during stress (Glauninger *et al*, 2022). These results were largely obtained from cultured cells treated with arsenite, a powerful inducer of SG, generating oxidative stress. *In vivo*, whether in animal models or in humans, pathologies where the presence of SG has been described are less common. Currently, these pathologies are mainly linked to the nervous system or to cancers driven by the KRAS oncogene. In the nervous system, mutations in DEAD-box RNA helicases that induce SG formation and concomitant inhibition of translation are found in neurodevelopmental diseases and brain cancer (Valentin-Vega *et al*, 2016; Lessel *et al*, 2017; Lennox *et al*, 2020). For KRAS-driven cancers, two seminal studies have greatly contributed to popularizing this field (Redding & Grabocka, 2023). A study showed that development of SG is markedly elevated in mutant KRAS cells and tumors. Mechanistically, mutant

KRAS upregulates SG formation by stimulating the production of prostaglandin 15-d-PGJ2 which enables paracrine control of SG, eventually resulting in resistance of cancer cells to stress stimuli (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). Another study stated that obesity, as a stressful condition, is a driver of SG formation in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and that PDAC growth depends on SG (Fonteneau *et al*, 2022). These two studies concluded that SG are key determinants of tumorigenesis and that inhibiting SG formation will block tumor growth.

Our interest in SG arose from the analysis of transcriptomic data showing that the expression of several mRNAs encoding SG proteins is increased during pancreatic cancer initiation. However, our further analyses do not support that SG are formed in KRAS-driven cancers.

Results & Discussion

Pancreatic cancer initiation is associated with an increased expression of mRNA encoding SG components

Cerulein-induced inflammation of pancreas expressing an oncogenic form of KRAS in acinar cells leads to the development of preneoplastic lesions called Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) (Guerra *et al*, 2011). In our previous study (Assi *et al*, 2021), we characterized the transcriptome of purified pancreatic acinar cells expressing oncogenic KRAS^{G12D}, in the absence or presence of inflammation, after repeated injections of cerulein in tamoxifen-treated adult ElastaseCre^{ER} LSLKras^{G12D} (ElaK) mice. Here, we found that out of the 1747 significantly upregulated mRNA (p-value<0.05; log₂ fold change > 0.5) in the presence of inflammation, 97 encode stress granule (SG) proteins. This represents almost 20% of the 488 proteins identified as components of these granules with SG score ≥ 4 (Youn *et al*, 2019). mRNA encoding RBP (<http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca/>) represented a significant part (26%) of the 97 upregulated mRNA (**Fig EV1** and **Table 3**: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_lMoZ?usp=sharing). At this stage, we considered that this increase could be associated with the presence of SG in PanIN (Grabocka & Bar-Sagi, 2016).

SG are not observed in mouse models of Kras mutant tumors

We next sought to detect the presence of proteins essential for the formation of SG, namely G3BP1, G3BP2 and UBAP2L, by immunolabeling of PanIN in cerulein-treated ElaK mice. Prior to conducting these experiments, we validated the specificity of the selected antibodies. Antibodies recognizing human G3BP1, G3BP2, and UBAPL2 were tested on PFA-fixed and paraffin-embedded HeLa cells, after treatment or not with arsenite (**Fig EV2A**). The results showed the expected labelling of cytoplasmic proteins in untreated and arsenite-treated cells. To confirm the specificity of antibodies against mouse G3BP1, a Myc-tagged mouse G3BP1 expression vector was transfected into HeLa cells. Western blotting indicated that 2 of the 3 tested antibodies recognized mouse G3BP1 (**Fig EV2B**).

We then used these antibodies on mouse pancreas sections containing PanIN. We observed increased expression of G3BP1 in PanIN, as compared to metaplastic acini. However, G3BP1 was uniformly distributed in the cytoplasm of PanIN and was not observed in SG (**Fig 1A**). A similar result was obtained for G3BP2 (**Fig 1B**), while UBAP2L was not detected in PanIN (**Fig 1C**). G3BP1 and G3BP2 were detected, but no SG was also observed in PanIN from *ElaCre^{ER} LSL-KRas^{G12D/+} LSL-Trp53^{R172H/+}* (ElaKP) mice (**Fig 1D**) or in tumors arising from orthotopic graft of PDAC cells generated from ElaKP mice (**Fig 1E**). To ensure that our experimental setup could detect the presence of SG, we subjected a mouse pancreas with PanIN to a heat shock. The pancreas was taken out of the abdominal cavity and incubated in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes at 37°C or 43°C, and subsequently immunolabeled. This revealed the presence of SG in the PanIN after heat shock (**Fig 1F**). We concluded that SG are not detectable in mouse PanIN, under the usual induction conditions, namely by injection of cerulein, in the absence of heat shock. Our data are in contrast with published data which illustrated the presence of SG in PanIN (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). We noted that in this study the description of SG in mouse PanIN relied on a monoclonal anti-human G3BP1 antibody which we found incapable of recognizing mouse G3BP1, unlike the two other G3BP1 antibodies tested (**Fig EV2B**).

We also tested the presence of SG in another model of tumorigenesis induced by *KRAS^{G12D}*, namely the induction of lung tumors using intratracheal instillation of adenoviruses expressing Cre recombinase in *LSL-KRas^{G12D/+}* mice (DuPage *et al*, 2009; Jackson *et al*, 2001). Three months after instillation, we analyzed the pulmonary adenomas but did not detect SG using antibodies against G3BP1, G3BP2, and UBAP2L, as well as Caprin 1, another SG protein (**Fig EV3**).

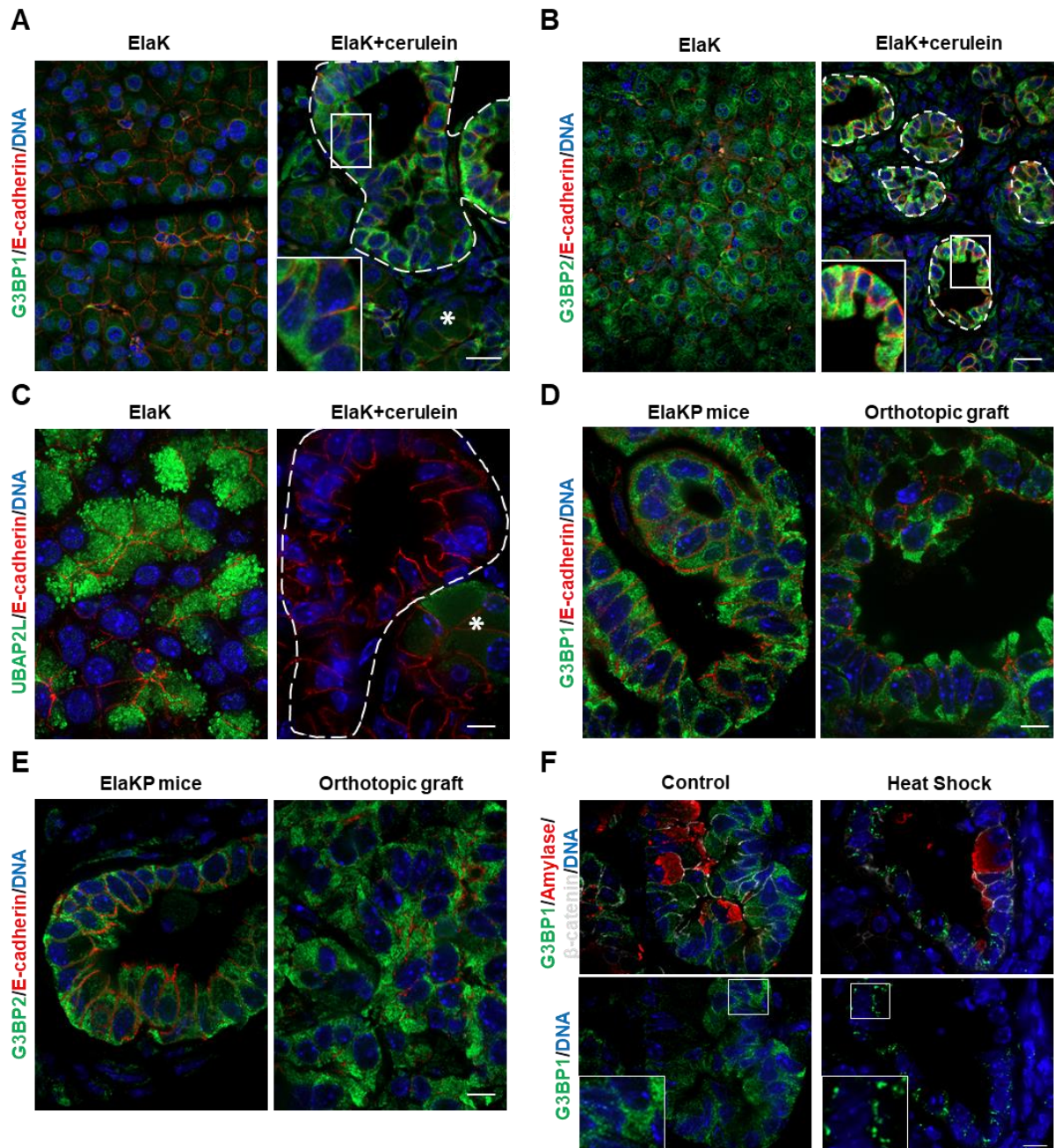


Figure 1. SG are not present in PanIN and PDAC. (A) Sections from pancreas of ElaK mice treated with cerulein or not (control) immunolabelled with G3BP1 and E-cadherin (plasma membrane marker). n=5. (B) Sections from pancreas of ElaK mice treated with cerulein or not (control) immunolabelled with G3BP2 and E-cadherin (plasma membrane marker). n=5. (C) Sections from pancreas of ElaK mice treated with cerulein or not (control) immunolabelled with UBAP2L and E-cadherin. n=3. (D) Sections from pancreas of ElaKP mice and from orthotopic tumors generated with ElaKP-derived PDAC cells immunolabelled with G3BP1 and E-cadherin. n=3. (E) Sections from pancreas of ElaKP mice and from orthotopic tumors generated with ElaKP-derived PDAC cells immunolabelled with G3BP2 and E-cadherin. n=3. (F) Sections from cerulein-treated ElaK pancreas shocked at 37°C (control) or 43°C (heat shock) during 30 minutes in PBS were immunolabelled with G3BP1, amylase (acinar cell marker) and β-catenin (plasma membrane marker). n=2. Nuclei were counterstained with Hoechst. *: metaplastic acinar cell. Dotted lines: PanIN. Scale bar: 20 μm (A, B) and 10 μm (C, D, E, F).

The protein interactome of G3BP in PanIN does not support a role for G3BP linked to SG

To explore the extent to which the protein interactome of G3BP in PanIN differs from that found in SG, we independently immunoprecipitated G3BP1 and G3BP2 from pancreas extracts of control or cerulein-treated ElaK mice and determined the interactomes by mass spectrometry. In the pancreas, whether in the control or cerulein condition, as expected, G3BP1 was found in the corresponding immunoprecipitation (**Fig 2A**), while G3BP1 was found in the G3BP2 interactome and conversely G3BP2 in the G3BP1 interactome (**Table 4**: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_lMoZ?usp=sharing). The interactome of G3BP1 in Hela cells treated with arsenite was also obtained; a comparison of this interactome with published data allowed us to validate our immunoprecipitation protocol: among 106 co-immunoprecipitated proteins, 42 were SG proteins (**Fig 2B**, and **Table 4**). Interestingly, in the control ElaK pancreas, 28 proteins found in SG (Youn *et al*, 2019) were present in the G3BP1 and G3BP2 interactome, while in the cerulein-treated pancreas with PanIN, only 22 SG proteins were present in the G3BP1 and G3BP2 interactome (**Fig 2C** and **Table 4**). As anticipated, UBAP2L was not present in this interactome, consistent with its absence in PanIN. The small proportion of SG proteins (10,8%) found in the G3BP1/2 interactome in the presence of cerulein suggests SG are not present in PanIN. Together, these results do not support that G3BP proteins in PanIN are included in SG.

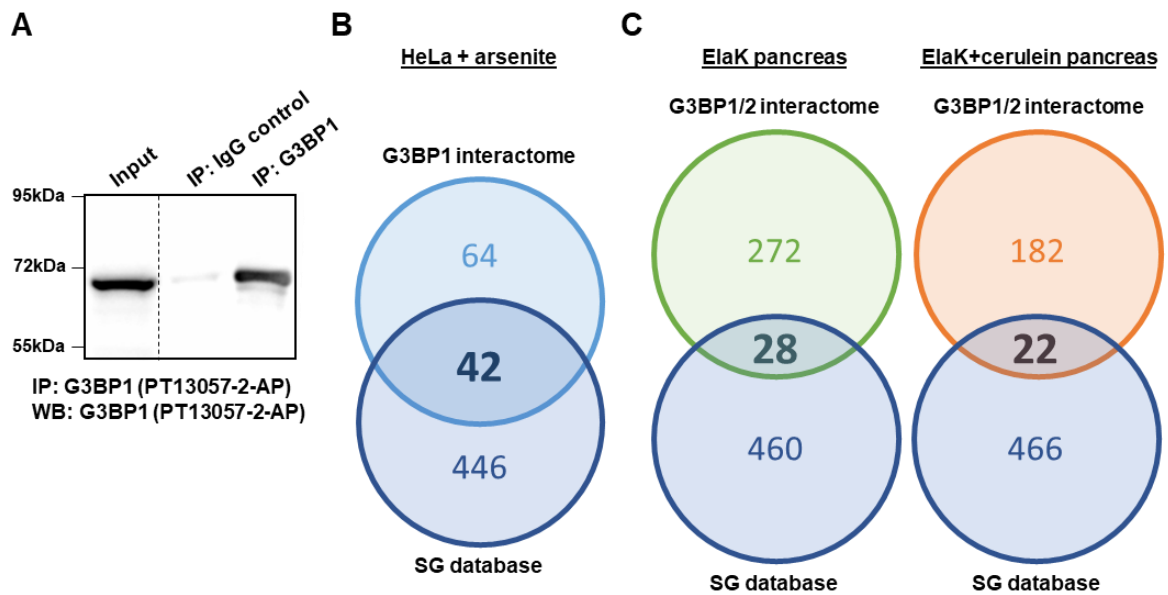


Figure 2. Few SG proteins are present in the proteins interacting with G3BP in PanIN. (A) Western blotting performed with G3BP1 antibody (13057-2-AP) on protein extracts from HeLa cells treated with arsenite. Immunoprecipitation (IP) was performed with the same antibody. (B) Proteins from arsenite-treated HeLa cells that interact with G3BP1/2. The proteins in bold have been previously identified as constituents of SG (<https://rnagranuledb.lunenfeld.ca/>) with a SG score ≥ 4 (as of December 21, 2023). The SG score represents a confidence index that the protein of interest is present in stress granules. (C) Venn diagram showing the number of common proteins among proteins found in the SG database and proteins associated with G3BP1/2 in an ElaK (left) and cerulein-treated ElaK (right) mouse pancreas.

Mutant KRAS does not exert cell non-autonomous control on SG

Previous data (Grabocka & Bar-Sagi, 2016) claim that SG confer cytoprotection against stress stimuli and chemotherapeutic agents in mutant KRAS cancers. This study argues that SG are markedly elevated in arsenite-treated mutant KRAS cell lines compared to arsenite-treated wild-type KRAS cell lines; a SG index, which measures the surface occupied by SG in cells, was thus 12 times higher in the former. To verify this result, we decided to compare several cancer cell lines harboring or not a mutant version of KRAS, and first performed a search on PubMed with "stress granules cell lines" (sorted by Best Matches on 03/14/2023). We reasoned that with such a difference, mutant KRAS cell lines should have been historically selected by SG researchers for their studies. We found that 17 out of 21 cell lines used in the top 10 articles are wild-type KRAS. Since this does not suggest that mutant KRAS cells have larger SG than cells with wild-type KRAS, we subjected wild-type and mutant KRAS cell lines to arsenite

treatment. SG were detected by G3BP1 and CAPRIN1 immunolabelling. The calculated SG index revealed no correlation between the SG index and the presence of KRAS mutations (**Fig 3A**).

It was also stated that mutant KRAS upregulates SG by stimulating the production of prostaglandin 15-d-PGJ2, and that 15-d-PGJ2 obviates the requirement of mutant KRAS for upregulation of SG in wild-type KRAS lines, indicating that mutant KRAS exerts cell non-autonomous control on SG index through 15-d-PGJ2 (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). To verify this conclusion, we transfected vectors expressing for GFP, wild-type KRAS, or mutant KRAS in wild-type HEK293 KRAS cells, and measured the SG index and 15-d-PGJ2 in the culture medium. We observed a 1.5-fold increase in SG index in the presence of mutant KRAS (**Fig 3B**), lower than the 5-fold increase previously described (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). Also, we did not detect any 15-d-PGJ2 increase in the culture medium of cells transfected with mutant KRAS, as compared to that of cells transfected with GFP or wild-type KRAS (**Fig 3C**). Finally, we treated wild-type KRAS cells with 15-d-PGJ2, as previously described (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). We observed no difference in the SG index between untreated and prostaglandin-treated cells (**Fig 3A**).

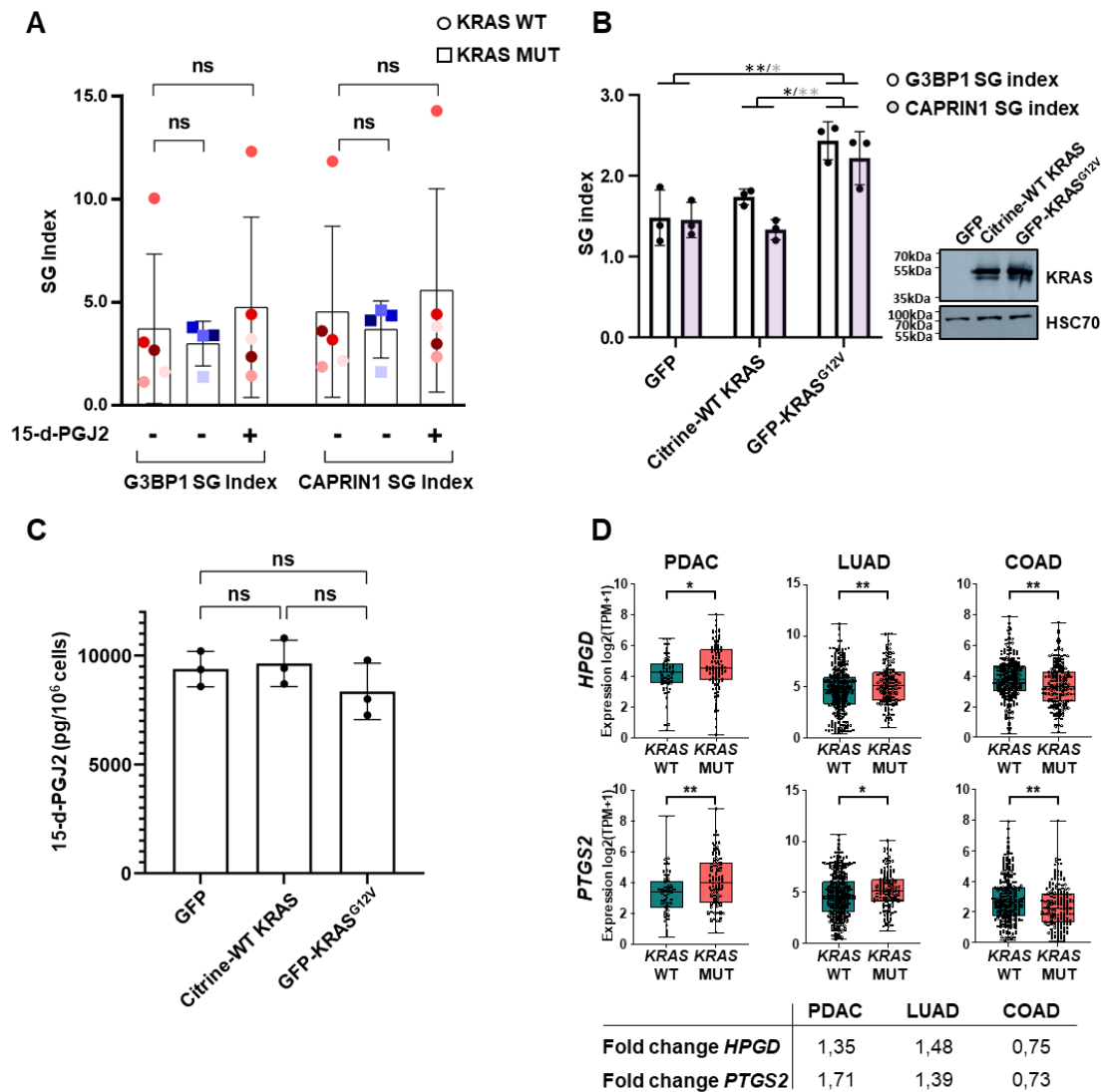


Figure 3. Kras mutation is not associated with SG formation. (A) SG index of five wild-type and four mutant KRAS cell lines subjected to arsenite treatment to induce cytoplasmic SG formation. The cells were cultured in the absence (-) or presence (+) of 15-d-PGJ2. SG were detected by G3BP1 and CAPRIN1 immunolabelling and quantified by calculating the SG index (SG surface divided by cell surface). The data are presented as the percentage of SG surface relative to the total cell surface. (B) SG index of HEK293 cells transfected with plasmids encoding GFP, Citrine-wild-type (WT) KRAS and GFP-KRAS^{G12V}, and treated with arsenite. SG index was calculated as described in Materials and methods. To confirm transfection efficiency, whole cell lysates were collected and subjected to Western blotting with anti-KRAS antibody, HSC70 serving as a loading control. (C) Levels of 15-d-PGJ2 secretion measured in the culture medium of HEK293 cells transfected as described in B. (D) mRNA expression levels of *HPGD* (top) and *PTGS2* (bottom) in three human cancers (colon adenocarcinoma-COAD, lung adenocarcinoma-LUAD, and pancreatic ductal adenocarcinoma-PDAC) categorized by Kras mutation status. Each dot represents one patient. The y-axis represents RNA-Seq by expression log₂(TPM+1). The lower panel shows the fold changes between mean expressions in KRAS WT and KRAS mutant patients. (A, B, C) Data presented are from a representative experiment out of at least 3 independent experiments leading to the same conclusion. The results are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Quantifications were performed on 10 randomly acquired images at 100x magnification for each cell line. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***p < 0.001; ns, not significant.

A connection between mutant KRAS and 15-d-PGJ2 has also been established in human cancer patients. Indeed, mutant KRAS was involved in the metabolism of 15-d-PGJ2 by increasing *PTGS2* mRNA (COX-2, the enzyme producing 15-d-PGJ2) and by decreasing *HPGD* mRNA (the enzyme catabolizing 15-d-PGJ2); it was notably observed a significant enrichment of *PTGS2* in lung adenocarcinoma (LUAD) harboring KRAS mutations, compared to LUAD bearing wild-type KRAS (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). We repeated the same analysis by including a larger number of patients (502 vs 24) and were unable to confirm that KRAS mutations has opposite effects on the expression of these two enzymes in LUAD. Similar conclusions were drawn from our analysis of colon adenocarcinoma (COAD) and PDAC, two other cancers with highly prevalent KRAS mutations (**Fig 3D**). Thus, our results do not support that mutant KRAS is associated with changes in enzyme expression that would lead to increased 15-d-PGJ2 production, and that 15-d-PGJ2 upregulates SG.

We further investigated whether the presence of KRAS mutations was associated with increased expression of mRNA encoding SG proteins. This was not the case in PDAC, LUAD and COAD, as we observed no correlation between the number of upregulated SG mRNA when comparing the total number of upregulated mRNA in cancers with KRAS mutations versus cancers without KRAS mutations (**Figs 4A-D**). In LUAD, the number of downregulated mRNA encoding SG proteins was even much higher than the number of upregulated mRNA encoding SG proteins. All together, these results do not establish any link between a KRAS mutation and the presence of SG.

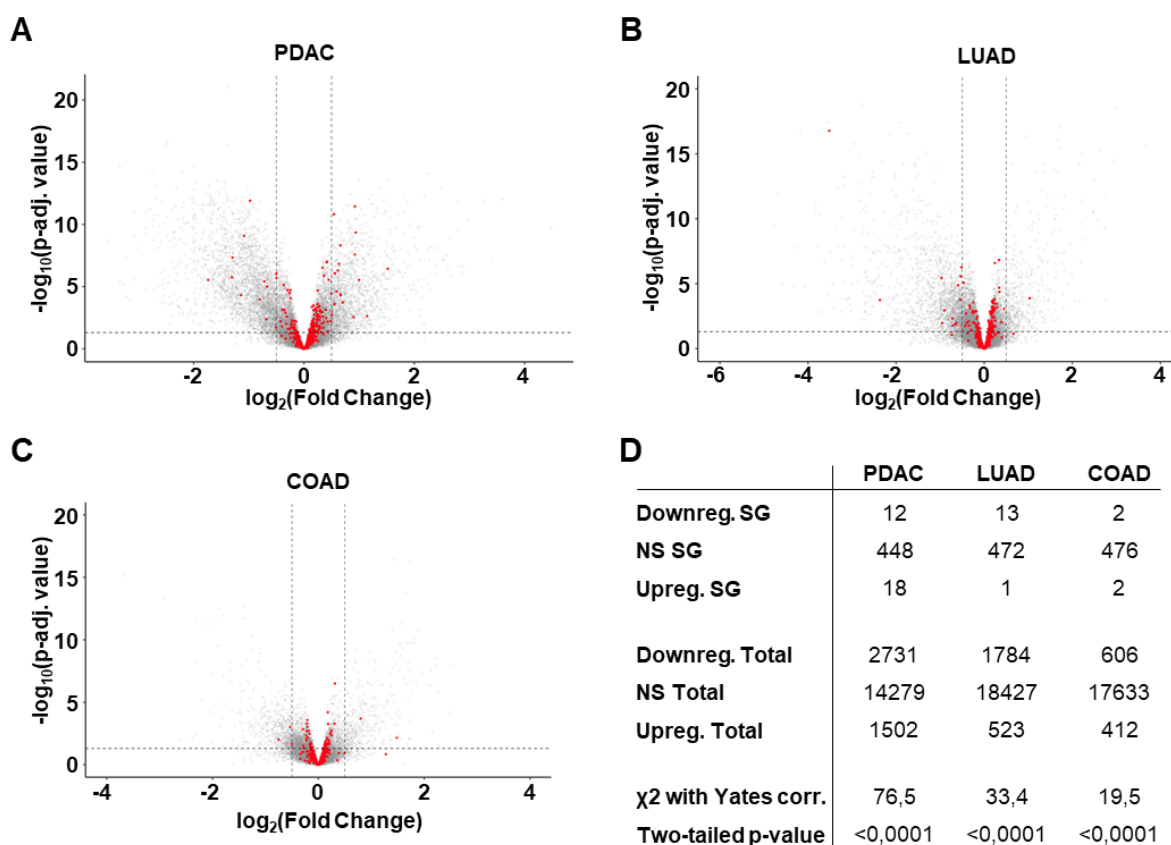


Figure 4. KRAS mutations are not associated with transcription of genes encoding SG protein. Volcano plots of DESeq2 results showing gene expression changes in PDAC (A), LUAD (B) and COAD (C). Gene encoding SG proteins (SG score ≥ 4) are shown as red dots. The logarithms of the fold changes of individual genes to base 2 (x-axis) are plotted against the negative logarithm of their p-value to base 10 (y-axis). (D) Table representing the number of downregulated and upregulated genes encoding SG proteins (SG score ≥ 4) of the volcano plots in A, B, and C. Positive $\log_2(\text{fold change})$ values represent upregulation and negative values represent downregulation. Chi-square with Yates correction was used to calculate two-tailed p-value.

No evidence for SG formation in human PDAC

Besides the presence of SG in animal models of cancer, SG have also been described in human pancreatic cancer specimens (Grabocka & Bar-Sagi, 2016). In addition, a subsequent study claimed that SG are upregulated in obesity-associated PDAC which is dependent on SG for its accelerated growth, compared to PDAC not associated with obesity (Fonteneau *et al*, 2022). To explore this possibility, we performed G3BP1 labelling on PDAC sections from non-obese and obese patients (n=5). We found that, both in non-obese and obese patients, G3BP1 was mainly present in the cytoplasm of human PDAC cells, although in some areas G3BP1 condensates were also present (Fig 5A). In these areas, colabelling

experiments showed that G3BP1 was mainly localized to the inner nuclear membrane and the plasma membrane of PDAC cells, cellular localizations that do not correspond to the presence of G3BP1 in cytoplasmic SG (**Fig 5B**). Strikingly we observed that the nuclei with G3BP1 condensates displayed irregular nuclear contours, characteristic of nuclear atypia. Referring to published data (Fonteneau *et al*, 2022), we noted that G3BP1 labelling was also concentrated in the cell nuclei, which does not fit with cytoplasmic SG, and between the PDAC cells, which may correspond to a location at the cell membranes separating the PDAC cells. Together, these observations do not support that cytoplasmic SG are present in pancreatic tumor cells.

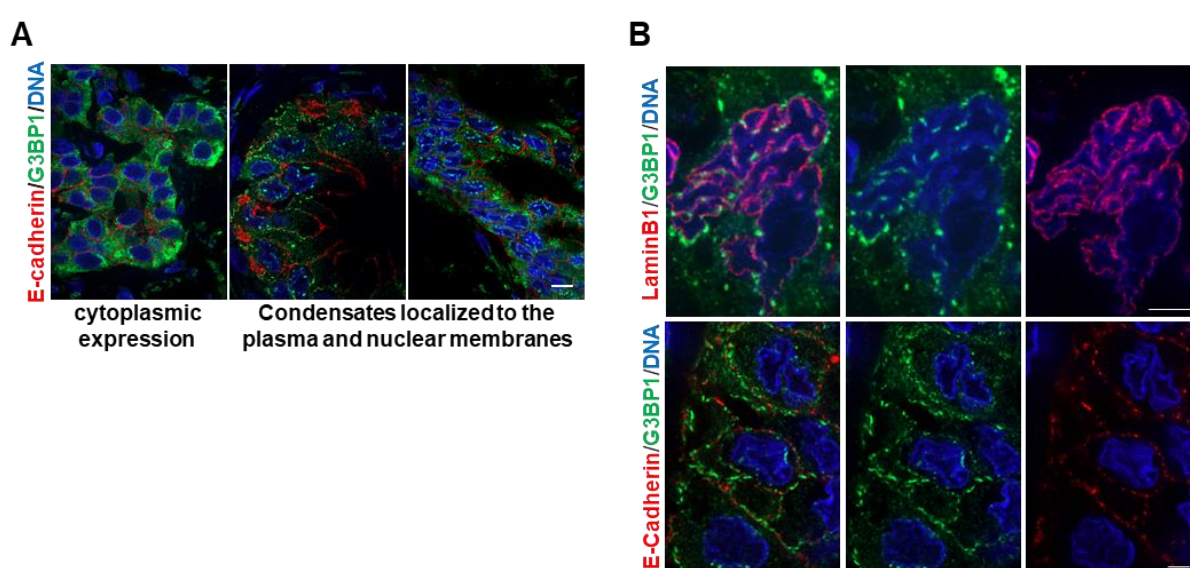


Figure 5. Cytoplasmic SG are not detected in human PDAC. (A) Immunolabeling for G3BP1 and E-cadherin (plasma membrane marker) performed on human PDAC sections. Left panel: cytoplasmic expression of G3BP1. Middle and right panels: G3BP1 condensates. Nuclei were counterstained with Hoechst. Scale bar: 10 μ m. n=10. (B) Sections from human PDAC immunolabelled with G3BP1, LaminB1 (nuclear lamina marker) and E-cadherin. No correlation was found between the presence of these G3BP1 condensates and obesity. Nuclei were counterstained with Hoechst. n=3 and n=10. Scale bar: 5 μ m.

In conclusion, our results do not support that SG are present and impact cancer progression in cancers harboring KRAS mutations. To the best of our knowledge, the presence of SG has rarely been described in tumors, essentially in a form of medulloblastoma with a mutation in a protein that promotes SG assembly (Somasekharan *et al*, 2015; Valentin-Vega *et al*, 2016). Also, the presence of SG in samples from patients (or mouse models) treated with chemotherapy, regardless of the drug used,

has not been described. In this context, we conclude that caution is required before considering SG as therapeutic targets.

Supplemental Figures

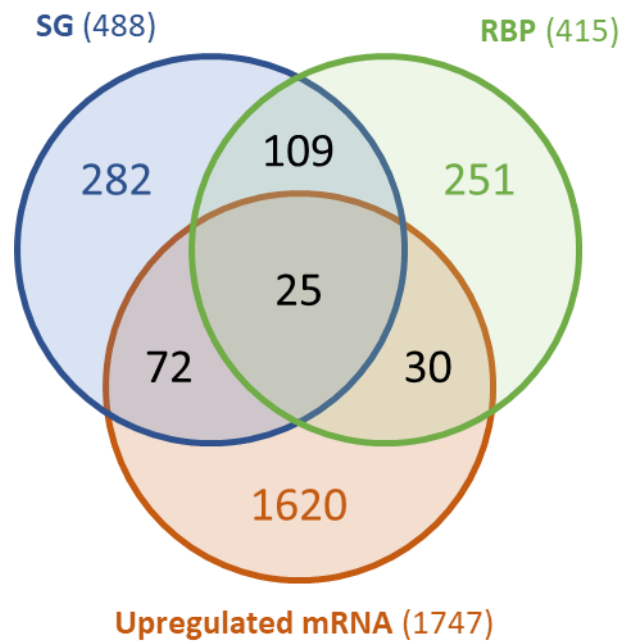


Figure EV1. Several mRNA coding for RBP and found in SG are present among the mRNA upregulated during pancreatic inflammation. Venn diagram developed from transcriptomic data that we collected (Assi *et al*, 2021), the RBP databank (<http://rbpdb.ccb.utoronto.ca/>), and the SG databank (<https://rnagranuledb.lunenfeld.ca/>).

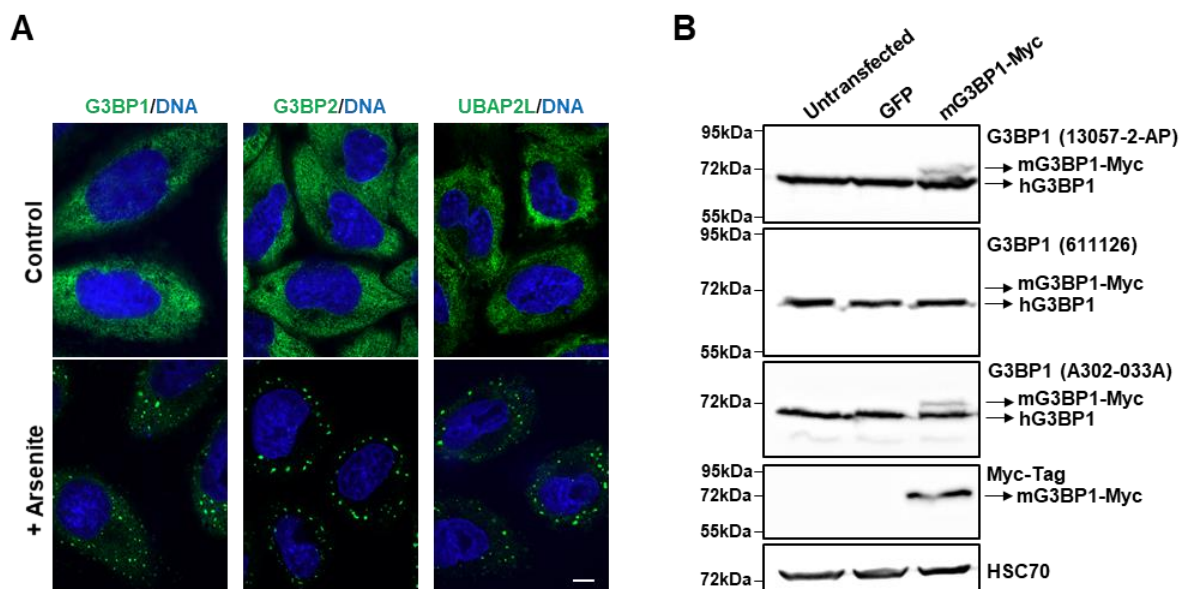


Figure EV2. Selected antibodies specifically recognize SG proteins. (A) Immunolabelling performed with G3BP1 (13057-2-AP), G3BP2, and UBAP2L antibodies on untreated (top panels) or arsenite-treated (bottom panels) HeLa cells. $n=3$. Scale bar: 10 μ m. (B) Western blotting performed on protein extracts from untransfected, GFP-transfected, and mouse (m) G3BP1-transfected HeLa cells with G3BP1 (13057-2-AP), G3BP1 (611126), G3BP1 (A302-033A), and Myc-Tag antibodies. Human (h) G3BP1 was detected by the 3 G3BP1 antibodies, whereas mG3BP1 was recognized by G3BP1 (13057-2-AP) and G3BP1 (A302-033A) antibodies, but not by G3BP1 (611126) antibody.

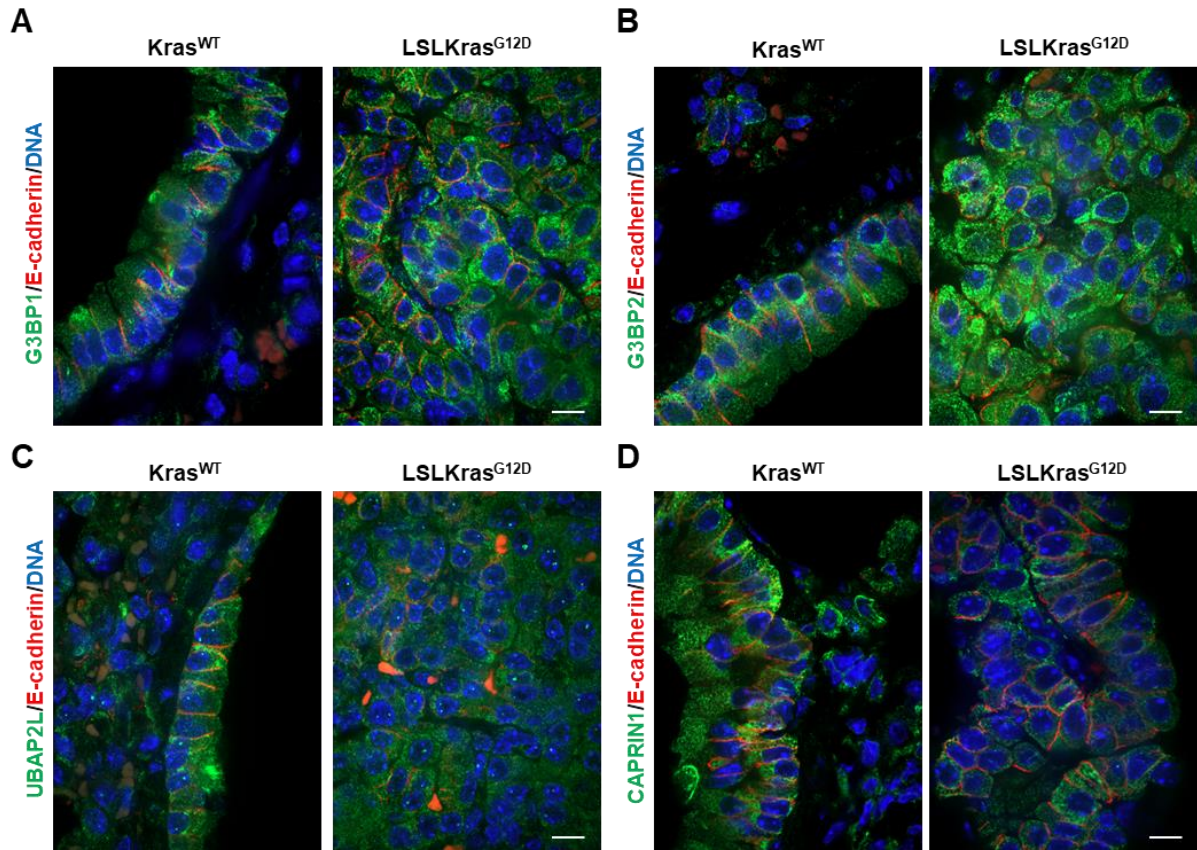


Figure EV3. SG are not observed in lung adenomas. Immunolabeling for E-cadherin and G3BP1 (A), G3BP2 (B), UBAP2L (C) and CAPRIN1 (D) performed on lung sections of Kras^{WT} and LSLKras^{G12D} mice infected by intratracheal instillation with Cre adenovirus. Bronchial epithelium is shown for Kras^{WT} lung sections while adenoma is exemplified for LSLKras^{G12D} lung sections. Nuclei were counterstained with Hoechst. n=5. Scale bar: 10 μ m.

Materials and methods

Mouse model and treatments

All procedures described in this study were performed with the approval of the animal welfare committee of the UCLouvain Health Sciences Sector (Brussels, Belgium; ethic number: 2021/UCL/MD/054). ElastaseCre^{ER} LSLKras^{G12D} (ElaK) and ElastaseCre^{ER} LSLKras^{G12D} LSLp53^{R172H} (ElaKP) mice (Desai *et al*, 2007; Hingorani *et al*, 2003; Hingorani *et al*, 2005) were maintained in a CD1-enriched background. These mouse models allow the expression of mutated Kras^{G12D} and p53^{R172H} alleles specifically in acinar cells. Six- to eight-week-old ElaK and ElaKP mice were treated with 100 µl tamoxifen (T5648-1G, Sigma Aldrich. 3 mg in 100 µl of corn oil) by oral gavage, and 100 µl 4-hydroxytamoxifen (H7904-25mg, Sigma Aldrich. 30 µg in 100 µL of corn oil) by subcutaneous injection. Three sets of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen treatments, each separated by 48 hours, allowed the recombination of the LSL cassettes and the expression of Kras^{G12D} and p53^{R172H} from their respective endogenous locus. To induce acute pancreatitis, tamoxifen-treated ElaK and ElaKP mice received 7 hourly intraperitoneal injections of cerulein (AS-24252, Eurogentec. 100-150 µl in phosphate buffered saline-PBS, pH 7.4, 125 µg/kg), every other day, for 5 days. ElaKP mice were subjected to chronic inflammation by additional cerulein treatment consisting of one injection a day, three times a week, during four weeks. To allow PDAC development, the ElaKP mice were then kept alive until they reached 32 weeks.

Orthotopic tumor development was carried out by injection of ElaKP-derived cells in the pancreas of six-week-old CD1 mice (Qui W and Su GH, 2013). Before surgery, mice were anesthetized by intraperitoneal administration of 10 µl PBS/10% Domitor (Vetoquinol)/7.5% Nimatek (Dechra) per g body weight. A total of 5.10⁵ ElaKP-derived tumor cells resuspended in 50 µl PBS were injected in the head of the pancreas. Postoperative awakening was mediated by subcutaneous injection of Vetergesic (Ecuphar. 16.7µL/g) and Antisedan, (Vetoquinol. 10µL/g). After orthotopic implantation, mice were

regularly monitored by visual observation for tumor growth and general signs of morbidity. Twenty-one days after implantation, the mice were sacrificed.

To induce lung tumors, adenoviral vectors expressing the Cre recombinase protein under the control of the CMV promoter (Ad5CMVCre, University of Iowa, USA), were introduced via intratracheal instillation in LSLKras^{G12D} LSLRosa^{YFP} mice (DuPage *et al*, 2009).

Mice were sacrificed by cervical dislocation and pancreas or lungs were collected for subsequent analyses.

Heat shock

For heat shock, mice were anesthetized and their pancreas was carefully taken out of the abdominal cavity. The exposed pancreas was then incubated in PBS at 37°C or 43°C, for 30 minutes. After sacrifice, the pancreas was fixed in 4% paraformaldehyde (HT501128, Sigma Aldrich) at 4°C for 4 hours, before embedding in paraffin.

Cell lines

Cells were cultured in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C in the conditions described below. ElaKP cells were derived from a tumour induced in ElaKP mice. In the table below, the first 5 cell lines do not have KRAS mutations, while the last 4 lines bear a KRAS mutation.

Cell line	Medium	Antibiotic	Supplement
HeLa	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS
SkChA1	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS; 1mM Sodium pyruvate; 2 mM L-Glutamine
BXPC3	RPMI	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS
U2OS	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS
HEK293	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS
EGI-1	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS; MEM NEAA, 2 mM L-Glutamine
Panc1	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS; 1mM Sodium pyruvate; 2 mM L-Glutamine
HPAC	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS
KPE	DMEM	50 U/ml Pen. and 50 µg/ml Strep.	10% FBS

DMEM = Dulbecco's modified Eagle medium (61965026, Life Technologies)

RPMI = Roswell Park Memorial Institute (21875034, Life Technologies)

MEM NEAA = Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (11140-035, Life Technologies)

FBS = Fetal bovine serum (F9665-500ML, Sigma Aldrich)

Pen. Strep. = Penicillin-Streptomycin (15070063, Life Technologies)

Sodium Pyruvate (11360070, Life Technologies, Belgium)

L-Glutamine (25030081, Thermo Fisher Scientific)

Arsenite and 15-d-PGJ2 treatments

Formation of SG was induced by incubating cells with 0.1 mM sodium arsenite for 30 minutes. Cells were treated with 50 μ M 15-d-PGJ2 for 60 minutes.

Transfection

30,000 cells were seeded in a 24-well plate for SG quantification or 10^6 cells in 10-cm diameter dish for validation of transfection efficiency by Western blot. Calcium phosphate transfection (Chen *et al*, 2012) was performed with 0.21 μ g DNA/cm². The plasmids used for transfection were pEGFP, Citrine-KRAS (Chandra *et al*, 2012) and GFP-KRAS^{G12V} (Fish *et al*, 2020). To validate the anti-G3BP1 antibodies, 1.5×10^5 HeLa cells were seeded in 10-cm diameter plate and transfected with 1 μ g of mouse G3BP1 expression vector (MR207441, ORIGENE) as previously described (Episkopou *et al*, 2019). Plasmids were amplified in competent *Escherichia Coli* (L2005, Promega) following the manufacturer's instructions. The plasmids were purified using Pure Yield™ Plasmid Midiprep system (A2495, Promega) and their concentration were determined using NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific).

SG quantification

SG quantifications were performed on 10 randomly acquired images at 100x magnification per replicate for each cell line. The Halo software (Indica Labs, v.3.3.2541) was employed for SG quantification. Using an algorithm (Indica Labs – Object colocalization FL v1.0), a threshold was set to distinguish SG from background noise, and the software automatically detected and quantified

individual granules based on size, intensity, and shape parameters. Using another algorithm (Indica Labs – Area quantification FL v2.1.7), a second threshold was set to determine the cytoplasmic area of the cells. The SG index was calculated by dividing the total surface occupied by SG by the total surface of the cells for each image. This calculation was performed for every image, and the average value was obtained by combining the results from all images.

Western blotting

10⁶ cells were seeded in 10-cm diameter dish. Cells were lysed by vortexing and repetitive pipetting in a buffer composed of 50 mM Tris-Cl, 150 mM sodium chloride, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), containing a protease inhibitor cocktail (11836153001, Sigma Aldrich). Lysates were maintained on ice during the procedure. Then, cell debris were pelleted by centrifugation (14,000 *g*, 10 minutes, 4°C). Proteins were quantified using a Bradford assay (23200, Thermo Fisher Scientific). Lysates containing 50 µg total proteins were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels. Polyvinylidene difluoride membranes (ISEQ00010, Millipore) were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20 (P2287, Sigma-Aldrich) for 1 hour at room temperature (RT). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against KRAS4B (WH0003845M1, Sigma Aldrich. 1 µg/ml), anti-G3BP1 (13057-2-AP, ProteinTech. 0.3 µg/ml), anti-G3BP1 (611126, BD Biosciences. 0.25 µg/ml), anti-G3BP1 (A302-033A, Bethyl. 0.04 µg/ml), anti-Myc Tag (2276 Cell Signalling Technology. 0.08 µg/ml), or HSC70 (sc-7298, Santa Cruz. 40 ng/ml) used as loading control, diluted in blocking buffer. Then, membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with secondary antibodies for 1 hour at RT. After incubation, membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20 and signals were revealed using SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34577, Thermo Fisher). Pictures were taken with the Amersham ImageQuant 800 imaging system (Cytiva).

Human pancreas specimens

The use of human tissue with histologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma and without neoadjuvant treatment was approved by the Committee of Medical Ethics—Erasmus Hospital (P2021/382). BMI data were obtained for each patient.

Immunofluorescence

60,000 cells were seeded on a coated-polylysine (P2636, Sigma Aldrich. 50 µg/ml in PBS, 25 min, 37°C) coverslip in 24-well plate. One day later, cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C. Six-µm paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed by heating the slides for 20 minutes in Tris-EDTA buffer (pH 9) using Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific). Sections and coverslips were rinsed 5 minutes in PBS, and permeabilized in PBS, 0.3% Triton X-100 (3051.3, Carl Roth) for 5 minutes at RT. After permeabilization, samples were blocked in PBS/3% low-fat milk/10% bovine serum albumin (A906-100G, Sigma Aldrich)/0.3% Triton X-100 (blocking buffer) for 45 minutes at RT. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and incubated with the samples overnight at 4° C. Primary antibodies and antibody dilutions are listed below. Then, samples were washed with 0.1% Triton X-100 in PBS. Secondary antibodies were diluted in PBS, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100, applied at dilution listed below, and incubated for 1 hour at 37°C. Nuclei were counterstained with Hoechst (B2261, Sigma Aldrich. 3.2 µM). Then, samples were washed with 0.1% Triton X-100 in PBS and the slides were mounted in fluorescence mounting medium (S302380-2, Agilent). Imaging was performed with Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software. Laser power and exposure times were similar for images from each data sets.

Antibodies	Origin	Dilutions		Reference
		Cultured cells	Tissue sections	
AMYLASE	Mouse	/	0.4 µg/ml	Santa Cruz (sc-46657)
CAPRIN1	Rabbit	3.0 µg/ml	/	ProteinTech (15112-1-AP)
E-CADHERIN	Mouse	/	1.25 µg/ml	BD Biosciences (610182)
G3BP1	Mouse	2.5 µg/ml	/	BD Biosciences (611126)
G3BP1	Rabbit		0.1 µg/ml	Bethyl (A302-033A)
G3BP1	Rabbit	1.5 µg/ml	4.0 µg/ml	ProteinTech (13057-2-AP)
G3BP2	Rabbit	1.0 µg/ml	5.0 µg/ml	Abcam (ab86135)
LAMIN B1	Mouse	/	1.0 µg/ml	ProteinTech (66095-1-Ig)
UBAP2L	Rabbit	/	5.0 µg/ml	Bethyl (A300-534A)
β-CATENIN	Mouse	/	0.25 µg/ml	BD Biosciences (610154)
Anti-Mouse IgG1, Alexa Fluor™ 594	Goat	2.0 µg/ml	2.0 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (A21125)
Anti-Mouse IgG2a, Alexa Fluor™ 647	Goat	2.0 µg/ml	2.0 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (A21241)
Anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488	Donkey	2.0 µg/ml	2.0 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (A21206)

Immunoprecipitation and mass spectrometry

Minced pancreas was washed in HBSS (14025-050, Life Technologies) and digested in Collagenase P (11213865001, Sigma Aldrich. 0.2 mg/ml in HBSS) during 15 minutes at 37°C at 225 rpm. Enzymatic activity was inhibited with cold 2.5% FBS. Tissue fragments were washed twice with PBS at 4°C and crosslinked by incubation at RT in freshly prepared DSP (13303-100, CovaChem. 2 mM in PBS/DMSO 5% (D4540, Sigma Aldrich)). Crosslinking reaction was then quenched by adding Tris (04819638, MP Biomedicals. 20 mM, pH 7.5) during 15 minutes. Proteins were extracted from centrifuged cell pellet using RIPA lysis buffer (10 µl/mg of tissue) composed of Tris (50 mM, pH 7.5), NaCl (P029.3, Carl Roth. 100 mM), Igepal® (I8896, Sigma Aldrich. 0.5%), glycerol (800688, MP Biomedicals. 10%), EDTA (04800683, MP Biomedicals. 125 µM), MgCl₂ (1058330250, Sigma Aldrich. 0.5 mM) and protease inhibitor (11836153001, Sigma Aldrich). The lysate was clarified by centrifugation. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay. Pre-washed protein A/G magnetic beads (88802, Life Technologies. 50 µl per sample) were coupled with 10 µg of the specific antibody against the target protein in a total volume of 200 µl RIPA buffer. IgG anti-rabbit antibody (KCC003,

Rockland) was used as isotype control antibody. The washed antibody-conjugated beads were then incubated with the pre-cleared cell lysate overnight at 4°C, with gentle agitation. Following immunoprecipitation, the beads were washed extensively with RIPA buffer to remove nonspecifically bound proteins. The immunoprecipitated proteins were eluted from the beads using 4x Laemmli Sample Buffer (1610747, Bio-Rad) with 2-mercaptoethanol (31350010, Life Technologies) supplemented with RIPA buffer to a final volume of 50 µl. Immunoprecipitated products were subjected to Western Blot to verify immunoprecipitation of the protein of interest. 50 µg of protein of whole cell lysate was used as input. In parallel, proteins were separated in a 10% acrylamide gel with a short 15-minute run at 120V. Protein bands were visualized by colloidal Coomassie Blue staining and in-gel digested with trypsin. Peptides were extracted with 0.1% TFA in 65% acetonitrile (ACN) and dried in a speedvac.

Peptides were dissolved in solvent A (0.1% TFA in 2% ACN), directly loaded onto reversed-phase pre-column (Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific) and eluted in backflush mode. Peptide separation was performed using a reversed-phase analytical column (Acclaim PepMap RSLC, 0.075 x 250 mm, Thermo Fisher Scientific) with a linear gradient of 4%-27.5% solvent B (0.1% FA in 98% ACN) for 40 minutes, 27.5%-50% solvent B for 20 minutes, 50%-95% solvent B for 10 minutes, and holding at 95% for the last 10 minutes at a constant flow rate of 300 nl/min on an Ultimate 3000 RSLC system. The peptides were analyzed by an Orbitrap Fusion Lumos tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). The peptides were subjected to NSI source followed by tandem mass spectrometry (MS/MS) in Fusion Lumos coupled online to the nano-LC. Intact peptides were detected in the Orbitrap at a resolution of 120,000. Peptides were selected for MS/MS using HCD setting at 30, and ion fragments were detected in the Orbitrap at a resolution of 30,000. A data-dependent procedure that alternated between one MS scan followed by MS/MS scans was applied for 3 seconds for ions above a threshold ion count of 2.0E4 in the MS survey scan with 40.0s dynamic exclusion. The electrospray voltage applied was 2.1 kV. MS1 spectra were obtained with an AGC target of 4E5 ions and a maximum injection time of 50 ms, and MS2 spectra were acquired with an AGC target of 5E4 ions and a maximum

injection set to dynamic. For MS scans, the m/z scan range was 375 to 1800. The resulting MS/MS data was processed using Sequest HT search engine within Proteome Discoverer 2.5 SP1 against a *Mus Musculus* protein database obtained from Uniprot. Trypsin was specified as cleavage enzyme allowing up to 2 missed cleavages, 4 modifications per peptide and up to 5 charges. Mass error was set to 10 ppm for precursor ions and 0.1 Da for fragment ions. Oxidation on Met (+15.995 Da), conversion of Gln (-17.027 Da) or Glu (- 18.011 Da) to pyro-Glu at the N-term peptide were considered as variable modifications. False discovery rate (FDR) was assessed using Percolator and thresholds for protein, peptide, and modification site were specified at 1%. For abundance comparison, abundance ratios were calculated by Label Free Quantification (LFQ) of the precursor intensities within Proteome Discoverer 2.5 SP1. Proteins were considered as immunoprecipitated with G3BP1 or with G3BP2 if abundance ratio ≥ 2 , adjusted p-value ≤ 0.05 , Sum PEP score ≥ 3 and FDR discovery = high.

ELISA

15-d-PGJ2 levels were measured using an ELISA kit (ADI-900-023, Enzo Life Sciences) following the manufacturer's instructions. The measurements were carried out in conditioned medium, 72 hours after seeding 30,000 cells in a 24-well plate.

Analysis of human patient data

Raw STAR counts, transcriptomic data normalized in transcripts per kilobase million (TPM) and the Single Nucleotide Variant (SNV) datasets for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), lung adenocarcinoma (LUAD) and colon adenocarcinoma (COAD) were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortium (Grossman *et al*, 2016), using TCGAbiolinks v2.14.1 R-package (Colaprico *et al*, 2016). Only unique primary (01A) tumor samples with available RNA-seq and SNV data were included in the analysis. Pancreatic neuroendocrine carcinoma samples (n=8) were excluded for the PDAC analysis. The tumor samples were categorized on the possible presence of a *KRAS* missense mutation, either in wild-type (*KRAS* WT) or in mutant (*KRAS* MUT). For PDAC: *KRAS* WT=58; *KRAS* MUT=99. For LUAD: *KRAS* WT=364; *KRAS* MUT=138. For COAD: *KRAS* WT=241; *KRAS* MUT=180.

Statistical analysis

Data were presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Single comparisons between two experimental groups were done using a unpaired Student's t test. To identify significant differences between multiple groups, statistical analyses were performed using a one-way ANOVA followed by Tukey test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with GraphPad 8.0.2 Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant.

DESeq2 analysis were used for read counting and differential gene expression between the KRAS WT and KRAS MUT samples and to generate volcano plots (Love *et al*, 2014). Differentially expressed genes are highlighted with significant adjusted p-values < 0.05 and $\log_2$ Fold Change > 0.5 or < -0.5 .

Acknowledgments

We thank members of the laboratory of Patrick Jacquemin and Frédéric Lemaigre for help and discussions, Frédéric Lemaigre for comments, Jean-Nicolas Lodewyckx and Hajar Dahou for mouse genotyping, and Mourad El Kaddouri and Bruno Maricq for their help in mouse care. We also would like to thank Craig B. Wilen for providing mouse G3BP1 expression (ORIGENE, MR207441). Funding: this work was supported by grants from FRS-FNRS (J.0096.21 and J.0097.23 to P. Jacquemin) and Télévie (7.8503.20 to P. Jacquemin). Maxime Libert held Télévie fellowships (7.4553.19 and 7.6524.21). P. Jacquemin is Research Director at FRS-FNRS, Belgium.

Disclosure and competing interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contribution

Maxime Libert: conceptualization; data curation; investigation; validation; methodology; writing - review and editing. **Jean Fain:** conceptualization; data curation; investigation; validation; methodology; writing - review and editing. **Sébastien Pyr dit Ruys:** validation; methodology; writing - review and editing. **Malak Haidar:** methodology; writing - review and editing. **Margaux Wulluman:** methodology; writing - review and editing. **Gaëtan Herinckx:** methodology; writing - review and editing. **Didier Vertommen:** validation; methodology; writing - review and editing. **Christelle Bouchart:** methodology; writing - review and editing. **Tatjana Arsenijevic:** methodology; writing - review and editing. **Jean-Luc Van Laethem:** methodology; writing - review and editing. **Patrick Jacquemin:** conceptualization; data curation; investigation; validation; methodology; writing - original draft, review, and editing; supervision; funding acquisition.

References

- Assi M, Achouri Y, Lorient A, Dauguet N, Dahou H, Baldan J, Libert M, Fain JS, Guerra C, Bouwens L *et al* (2021) Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Research* 81(10), 2679-2689
- Chandra A, Grecco HE, Pisupati V, Perera D, Cassidy L, Skoulidis F, Ismail SA, Hedberg C, Hanzal-Bayer M, Venkitaraman AR *et al* (2012) The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature cell biology* 14, 148-158
- Chen Y (2012) Calcium phosphate transfection of eukaryotic cells. *Bio-protocol* 2, e86
- Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, Sabedot TS, Malta TM, Pagnotta SM, Castiglioni I *et al* (2016) TCGAAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* 44, e71
- Desai BM, Oliver-Krasinski J, De Leon DD, Farzad C, Hong N, Leach, SD, Stoffers, D. A. (2007) Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration. *The Journal of clinical investigation* 117(4), 971-977
- DuPage M, Dooley AL, Jacks T (2009) Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nature protocols* 4(7), 1064-1072
- Episkopou H, Diman A, Claude E, Viceconte N and Decottignies A (2019) TSPYL5 depletion induces specific death of ALT cells through USP7-dependent proteasomal degradation of POT1. *Molecular cell*, 75(3), 469-482
- Fish JE, Flores Suarez CP, Boudreau E, Herman AM, Gutierrez MC, Gustafson D, Di Stefano, PV, Cui M, Chen Z, De Ruiz KB *et al* (2020) Somatic gain of KRAS function in the endothelium is sufficient to cause vascular malformations that require MEK but not PI3K signaling. *Circulation research* 127, 727-743
- Fonteneau G, Redding A, Hoag-Lee H, Sim, ES, Heinrich S, Gaida MM, Grabocka E (2022) Stress granules determine the development of obesity-associated pancreatic cancer. *Cancer Discovery* 12, 1984-2005
- Glauninger H, Hickernell CJW, Bard JA, Drummond, D. A. (2022) Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules. *Molecular Cell* 82, 2544-2556.
- Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, Rodríguez-Justo M, Serrano M, Barbacid M (2011) Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer cell* 19(6), 728-739
- Grabocka E and Bar-Sagi D (2016) Mutant KRAS enhances tumor cell fitness by upregulating stress granules. *Cell* 167 1803-1813
- Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, Staudt LM (2016) Toward a shared vision for cancer genomic data. *N. Engl. J. Med.* 375, 1109-1112
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development*, 15(24), 3243-3248

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA *et al* (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell* 4(6), 437-450

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgl AK, Chang S, Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell* 7(5), 469-483.

Lennox AL, Hoyer ML, Jiang R, Johnson-Kerner BL, Suit LA, Venkataramanan S, Sheehan JC, Alsina FC, Fregeau B, Aldinger KA *et al* (2020) Pathogenic DDX3X mutations impair RNA metabolism and neurogenesis during fetal cortical development. *Neuron* 106(3), 404-420

Lessel D, Schob C, Küry S, Reijnders MR, Harel T, Eldomery MK, Coban-Akdemir Z, Denecke J, Edvardson S, Colin E *et al* (2017) De novo missense mutations in DHX30 impair global translation and cause a neurodevelopmental disorder. *The American Journal of Human Genetics* 101(5), 716-724

Li T, Zeng Z, Fan C, Xiong W (2023) Role of stress granules in tumorigenesis and cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 189006

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15(12), 1-21

Markmiller S, Soltanieh S, Server KL, Mak R, Jin W, Fang MY, Luo EC, Krach F, Yang D, Sen A *et al* (2018) Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. *Cell* 172(3), 590-604

Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M (2013) Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes to Cells* 18(2), 135-146

Qiu W and Su GH (2013) Development of orthotopic pancreatic tumor mouse models. *Pancreatic Cancer: Methods and Protocols* 215-223

Redding A, Grabocka E. (2023) Stress granules and hormetic adaptation of cancer. *Trends in Cancer* 9(12), 995-1005

Ripin N, Parker R (2023) Formation, function, and pathology of RNP granules. *Cell* 186(22), 4737-4756

Somasekharan SP, El-Naggar A, Leprivier G, Cheng H, Hajee S, Grunewald TG, Zhang F, Ng T, Delattre O, Evdokimova V *et al* (2015) YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1. *Journal of Cell Biology* 208, 913-929

Valentin-Vega YA, Wang YD, Parker M, Patmore DM, Kanagaraj A, Moore J, Rusch M, Finkelstein D, Ellison DW, Gilberston RJ *et al* (2016) Cancer-associated DDX3X mutations drive stress granule assembly and impair global translation. *Scientific reports* 6(1), 25996

Xing F, Qin Y, Xu J, Wang W, Zhang B (2023) Stress granules dynamics and promising functions in pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 188885

Youn JY, Dyakov BJ, Zhang J, Knight JD, Vernon RM, Forman-Kay JD, Gingras AC (2019) Properties of stress granule and P-body proteomes. *Molecular cell* 76(2), 286-294

III. L'inactivation génétique des protéines de liaison à l'ARN G3BP1/2 entrave la tumorigenèse pancréatique

Cette étude est consacrée aux rôles de deux protéines de liaison à l'ARN, G3BP1 et G3BP2, dans la tumorigenèse pancréatique. Afin d'explorer leur rôle dans le cancer du pancréas, nous avons généré un modèle murin avec une inactivation de leur expression dans les cellules acinaires.

Dans cet article, j'ai contribué à la conception expérimentale, à l'acquisition des données, à l'analyse, et à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Suivant mon promoteur, même si la quantité importante de résultats accumulés et de conclusions obtenues pourrait dès à présent faire l'objet d'une publication, celui-ci a choisi de poursuivre cette étude au-delà de ma thèse afin d'en accroître l'impact.

L'inactivation génétique des protéines de liaison à l'ARN G3BP1/2 entrave la tumorigenèse pancréatique

Maxime Libert¹, Ilianna Zoi¹, Younes Achouri¹, Pierre Close², Patrick Jacquemin¹

¹Université catholique de Louvain, Institut de Duve, Brussels, Belgique, ²GIGA Cancer, ULiège, Belgique

Table 5 est disponible via le lien suivant :

https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing

A. Abstract

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est une maladie agressive pour laquelle les mécanismes régulant la traduction sont encore largement méconnus. Dans ce cadre, nous avons initialement découvert une augmentation de l'expression des protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2 dans les néoplasies pancréatiques intraépithéliales (PanIN), qui représentent des lésions précurseurs du PDAC. Afin d'explorer leur rôle dans le cancer du pancréas, nous avons inactivé génétiquement par CRISPR/Cas9 leur expression dans un modèle d'initiation tumorale pancréatique. L'inactivation de l'une des deux isoformes dans les cellules acinaires ne perturbe pas l'initiation tumorale. En revanche, l'absence de G3BP1 et de G3BP2 réduit fortement la formation des lésions précancéreuses PanIN. Cette réduction pourrait être attribuée à une régulation de la traduction de certains ARNm. Cette étude montre la redondance fonctionnelle de G3BP1 et G3BP2, et soutient un rôle pro-oncogénique des deux protéines dans la tumorigenèse pancréatique.

B. Introduction

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), le sous-type de cancer du pancréas le plus répandu, peut se former à partir de lésions pré-cancéreuses appelées néoplasies intraépithéliales pancréatiques (PanIN). Chez la souris, il a été démontré que les PanIN peuvent se développer à partir des cellules acinaires du pancréas.

Pour étudier la tumorigenèse pancréatique, nous avons utilisé un modèle de souris dans lequel l'expression d'une forme oncogénique de *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* ($Kras^{G12D}$) peut être induite dans les cellules acinaires du pancréas adulte. Chez les souris *ElaCreER LSL-Kras^{G12D}* (*ElaK*) correspondantes, l'inflammation induite par la céruléine, un peptide analogue à la cholécystokinine, conduit au développement de PanIN (1).

Alors que de nombreux mécanismes de contrôle transcriptionnel ont été identifiés au cours de la tumorigenèse pancréatique, les mécanismes régulant la traduction sont encore largement méconnus. Les protéines de liaison à l'ARNm (RBP) sont fréquemment impliquées dans les mécanismes d'initiation de la traduction et nombres d'entre elles sont dérégulées dans les cancers humains. Ainsi, les protéines des granules de stress G3BP1 et G3BP2 sont davantage exprimées dans les PDAC humains que dans les tissus normaux, et elles sont impliquées dans la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques. G3BP1 et G3BP2 ont montré un potentiel rôle dans le cancer du pancréas (2, 3). Ces protéines possèdent quatre domaines conservés, dont un domaine NTF2-like (nuclear transport factor 2-like) et deux motifs de reconnaissance de l'ARN. Dans ce contexte, cette étude se focalise sur le rôle joué par ces deux protéines dans l'initiation de la tumorigenèse pancréatique. L'étude souligne que G3BP1 et G3BP2 sont nécessaires à la tumorigenèse pancréatique et suggère l'hypothèse selon laquelle un mécanisme de contrôle traductionnel impliquant G3BP1 et G3BP2 est important pour l'initiation de la tumeur pancréatique.

C. Matériels et méthodes

Modèle de souris et traitements

Toutes les procédures décrites dans cette étude ont été réalisées avec l'approbation du comité de protection des animaux du Secteur des Sciences de la Santé de l'UCLouvain (Bruxelles, Belgique ; numéro d'éthique : 2021/UCL/MD/054). Les souris ElastaseCre^{ER} LSLKras^{G12D} (ElaK) et ElastaseCre^{ER} LSLKras^{G12D} LSLp53^{R172H} (ElaKP) ont été maintenues dans une fond génétique enrichi en CD1. Ces modèles de souris permettent l'expression des allèles mutés Kras^{G12D} et p53^{R172H} spécifiquement dans les cellules acinaires. Des souris ElaK et ElaKP âgées de six à huit semaines ont été traitées avec du tamoxifène (T5648-1G, Sigma Aldrich. 30 mg/ml dans de l'huile de maïs) par gavage oral, et du 4-hydroxytamoxifène (H7904-25mg, Sigma Aldrich. 0,3 mg/ml dans de l'huile de maïs) par injection sous-cutanée. Trois séries de traitements au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène, séparées chacune de 48 heures, ont permis la recombinaison des cassettes LSL et l'expression de Kras^{G12D} et p53^{R172H} à partir de leur locus endogène respectif. Pour induire une pancréatite aiguë, les souris ElaK et ElaKP tamoxifiées ont reçu des injections intrapéritonéales de céruléine (AS-24252, Eurogentec. 100-150 µl dans une solution saline tamponnée au phosphate-PBS, pH 7,4, 125 µg/kg), tous les deux jours, pendant 5 jours. Les souris ElaKP ont été soumises à une inflammation chronique par un traitement supplémentaire consistant en une injection de céruléine par jour, trois fois par semaine, pendant quatre semaines. Pour permettre le développement du PDAC, les souris ElaKP ont été maintenues en vie jusqu'à 32 semaines.

Le développement de tumeurs orthotopiques a été réalisé par injection de cellules dérivées d'ElaKP dans le pancréas de souris CD1 âgées de six semaines (4). Avant la chirurgie, les souris ont été anesthésiées par administration intrapéritonéale de 10 µl de PBS/10% Domitor (Vetoquinol)/7,5% Nimatek (Dechra) par g de poids corporel. Un total de 5x10⁵ cellules tumorales dérivées d'ElaKP remises en suspension dans 50 µl de PBS ont été injectées dans la tête du pancréas. Le réveil postopératoire s'est fait par injection sous-cutanée de Vetergesic (Ecuphar. 16,7 µl/g) et d'Antisedan, (Vetoquinol. 10µl/g). Après l'implantation orthotopique, les souris ont été régulièrement suivies par

observation visuelle de la croissance de la tumeur et de signes généraux de morbidité. Vingt et un jours après l'implantation, les souris ont été sacrifiées. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale ; le pancréas, le foie, l'intestin, un rein, la rate et un poumon ont été prélevés pour des analyses ultérieures.

Génération d'un modèle de souris d'inactivation conditionnelle de G3BP1 et G3BP2

Des souris *G3bp1*^{lox/+} (*G3bp1*^{f/+}) et *G3bp2*^{loxP/+} (*G3bp2*^{f/+}) ont été générées à l'aide du système CRISPR-Cas9 sans clonage (5). Les ARN guides ont été conçus à l'aide de CRISPRdirect (6). Deux ARN guides ciblant les séquences 5' et 3' des exons 2 ont été conçus. Chaque ARN guide était composé d'un ARNcr de 20 nucléotides, correspondant à la séquence cible avec une queue de 16 nucléotides, et d'un ARNtrac de 67 nucléotides (1072534, Integrated DNA Technologies), contenant l'épingle à cheveux reconnue par la protéine Cas9, avec une extrémité complémentaire à la queue de l'ARNcr. Deux longs oligonucléotides simple brin contenant des bras d'homologie et une séquence loxP ont été synthétisés (Integrated DNATechnologies) en tant qu'ADN Ultramer ; ils servent de matrice pour la réparation directe homologue. Les ARNcr et les oligonucléotides d'ADN simple brin étaient les suivants (les lettres minuscules représentent les sites loxP) :

- *G3bp1* ARNcr-1 (5'), 5'-CAGATCCACAGCGCTAGCAT-3'
- *G3bp1* ARNcr-2 (3'), 5'-TTGATTCTGTGTTAGATTGC-3'
- *G3bp1* Ultramer 1 (5'), 5'-
TAGCAAGTTAGTGTGCTTTGGTAAGGTAGATGGAAGCAGGATACAGATCCACAGCGCTAGGCTAGCa
taacttcgtataATGTATGCtatacgaagttatCATGGGCTCTCTTAAGGGTTTATGGAGTTGTCCTTAGATGTC
TTCAGTGGTCTTTGGTTG-3'
- *G3bp1* Ultramer 2 (3'), 5'-
AATTCTTTGGTTTGCTGAACACTCTGTGTGTTGTCAGGTTACTTTGATTCTGTGTTAGATGAATTCataa
cttcgtataATGTATGCtatacgaagttatTGCTGGCTTCAGCAGAAGAGTGCCATGTTTAACTTAAAGGT
GTGTATTCAAGGCACTT -3'

- G3bp2 ARNcr-1 (5'), 5'-TAAGAAGATTGACAACAGAG-3'
- G3bp2 ARNcr-2 (3'), 5'-TGGGAAGAGAGGACGGTAGA-3'
- G3bp2 Ultramer 1 (5'), 5'-

CTAAATATTTAGGATGCACCTGAACTCCTTCTTTCAATTTTAATAAGAAGATTGACAACAGCTAGCataa
cttcgtataATGTATGCtatacgaagttatGAGAGGGAGGCTAGCTCCTTGAGCATGTTCTTGTTACATGGC
TGTCTGAGGGGTCTAT -3'

- G3bp2 Ultramer 2 (3'), 5'-

ATATTTTACATGTTACAGGAATGTATGAAATAACTGATCTTGATGGGAAGAGAGGACGGTGAATTCat
aacttcgtataATGTATGCtatacgaagttatAGAGGGTTTGGGGCTTCAGTTGGACTCCAGGCTTGGTCCTTA
GCAAACAGGAAGAACTG-3'

L'ARNcr/l'ARNtrac (2,4 pmol/μl), la nucléase recombinante Cas9 V3 (Integrated DNA Technologies. 200 ng/μl) et les deux donneurs d'ADN simple brin (5 ng/μl chacun) ont été mélangés dans le tampon IDTE (11-01-02-02, IntegratedDNA Technologies) et injectés dans le pronucléus de zygotes de souris d'un background enrichi en CD1. Les zygotes injectés ont été incubés dans le milieu KSOM à 37°C pendant au moins 2 heures avant d'être transférés dans les oviductes de souris femelles CD1pseudo-gestantes. Les fondateurs positifs avec insertion des deux sites loxP sur un même allèle ont été identifiés par génotypage PCR et confirmés par séquençage de Sanger.

Par la suite, des souris *G3bp1^{ff}* et *G3bp2^{ff}* ont été croisées avec des souris ElaK pour évaluer le rôle des protéines G3BP1 et de G3BP2 dans la tumorigenèse pancréatique. La recombinaison médiée par la protéine Cre^{ER} dans les cellules acinaires induit la délétion de l'exon 2 flanqué de sites loxP, créant un décalage du cadre du lecture et la création d'un codon stop prématuré.

Lignée cellulaire et traitement à l'arsenite

Les cellules HeLa ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂, à 37°C, dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, 61965026, Life Technologies) avec 50 U/ml de pénicilline-streptomycine (15070063, Life Technologies) et 10% de sérum de veau fœtal (FBS, F9665-500ML,

Sigma Aldrich). La formation de granules de stress a été induite en incubant les cellules avec 0,1 mM d'arsénite de sodium pendant 30 minutes.

Western Blot

Les tissus ont été lysés à l'aide d'un homogénéisateur Ultra Turrax® T10 dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl, 150 mM chlorure de sodium, 0,25% désoxycholate de sodium, 1% NP-40, 1 mM orthovanadate de sodium, 2% dodécyl sulfate de sodium (SDS), et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (11836153001, Sigma-Aldrich). Les lysats ont été maintenus sur de la glace pendant la procédure. Ensuite, les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (14.000 g, 10 minutes, 4°C). Les protéines ont été quantifiées à l'aide d'un test de Bradford (23200, Thermo Fisher Scientific). Cinquante µg de protéines issues des lysats totaux ont été séparées sur des gels de polyacrylamide SDS à 12,5% avant d'être transférées sur des membranes de difluorure de polyvinylidène (ISEQ00010, Millipore). Les membranes ont été bloquées avec une solution de lait pauvre en graisse (5 %), ou d'albumine de sérum bovin à 5 % (9048-46-8, MP Biomedicals), diluée dans une solution saline tamponnée Tris (TBS)/0,1% Tween-20 (P2287, Sigma-Aldrich), pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées pendant une nuit à 4 °C avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage ciblant G3BP1 (13057-2-AP, ProteinTech. 0,5 µg/ml) ou G3BP2 (ab86135, Abcam. 0,5 µg/ml). Pour la normalisation, HSC70 (sc-7298, Santa Cruz. 40 ng/ml) ou Ponceau S (P7170, Sigma-Aldrich) ont été utilisés comme contrôle de chargement. Ensuite, les membranes ont été lavées avec du TBS/0,1% Tween-20 et incubées avec des anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante. Après incubation, les membranes ont été lavées avec du TBS/0,1% Tween-20, et les signaux ont été révélés à l'aide du substrat chimiluminescent SuperSignal™ West Pico PLUS (34577, Thermo Fisher). Les images ont été prises avec le système d'imagerie Amersham ImageQuant 800 (Cytiva). La densitométrie a été réalisée à l'aide du logiciel FIJI (ImageJ), et le rapport entre la protéine d'intérêt et HSC70 a été calculé.

Immunofluorescence

D'une part, les tissus ont été fixés pendant 4 heures avec du paraformaldéhyde à 4% à 4°C, puis enrobés en paraffine. Des coupes de tissus de six μm ont été réalisées puis déparaffinées. Après réhydratation des coupes de tissus, el démasquage de l'antigène a été effectué en chauffant les lames pendant 20 minutes dans un tampon Tris-EDTA (pH 9) à l'aide du module PT de Lab Vision (Thermo Fisher Scientific). Par ailleurs, les cellules ont été fixées pendant 30 minutes avec du paraformaldéhyde à 4% à 4°C. Ensuite, les coupes de tissus et les cellules ont été rincées 5 minutes dans du PBS puis perméabilisées dans du PBS, 0,3% de Triton X-100 (3051.3, Carl Roth) pendant 5 minutes à température ambiante. Après perméabilisation, les échantillons ont été bloqués dans du PBS/3% de lait pauvre en graisse/10% d'albumine de sérum bovin (A906-100G, Sigma Aldrich)/0,3% de Triton X-100 (tampon de blocage) pendant 45 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires ont été dilués dans le tampon de blocage et incubés avec les échantillons pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires et les dilutions d'anticorps sont listés ci-dessous. Les échantillons ont ensuite été lavés avec 0,1% de Triton X-100 dans du PBS. Les anticorps secondaires ont été dilués dans du PBS, 10% d'albumine de sérum bovin, 0,3% de Triton X-100, appliqués aux dilutions indiquées ci-dessous et incubés pendant 1 heure à 37°C. Les noyaux ont été contre-colorés avec du Hoechst (B2261, Sigma Aldrich. 3,2 μM). Ensuite, les échantillons ont été lavés avec 0,1% de Triton X-100 dans du PBS. Les lames et les cellules ont ensuite été montées dans un milieu de montage adapté à la détection de la fluorescence (S302380-2, Agilent). L'imagerie a été réalisée avec le microscope confocal à disque rotatif Cell Observer, en utilisant le logiciel ZEN. La puissance du laser et les temps d'exposition étaient similaires pour les images de chaque ensemble de données.

Anticorps	Origine	Dilutions		Référence
		Cultured cells	Tissue sections	
AMYLASE	Souris	/	0,4 µg/ml	Santa Cruz (sc-46657)
CAPRIN1	Lapin	3,0 µg/ml	3,0 µg/ml	ProteinTech (15112-1-AP)
E-CADHERINE	Souris	/	1,25 µg/ml	BD Biosciences (610182)
FgNUP	Souris	/	10 µg/ml	Abcam (ab24609)
G3BP1	Lapin	/	0,1 µg/ml	Bethyl (A302-033A)
G3BP1	Lapin	1,5 µg/ml	4,0 µg/ml	ProteinTech (13057-2-AP)
G3BP2	Lapin	1,0 µg/ml	5,0 µg/ml	Abcam (ab86135)
G3BP2	Lapin	/	2,4 µg/ml	ProteinTech (16276-1-AP)
GFP	Goat	/	4,0 µg/ml	Abcam (ab6673)
UBAP2L	Lapin	/	5,0 µg/ml	Bethyl (A300-534A)
β-CATENINE	Souris	/	0,25 µg/ml	BD Biosciences (610154)
Anti-Souris IgG1, Alexa Fluor™ 594	Chèvre	2,0 µg/ml	2,0 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (A21125)
Anti-Lapin IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488	Âne	2,0 µg/ml	2,0 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (A21206)
Anti-Souris IgG2a, Alexa Fluor™ 647	Chèvre	2,0 µg/ml	2,0 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (A21241)

Coloration à l'Hémalun-Eosine (HE) et au Bleu Alcian

Après déparaffinage et réhydratation des coupes de tissus (voir ci-dessus), des incubations successives dans de l'hémalun (1092491000, Sigma Aldrich. 30 secondes) et dans l'éosine (3137.2, CarlRoth. 5 secondes), dilués dans l'eau du robinet (10 minutes) ont été réalisées. La coloration Bleu Alcian a été réalisée à l'aide de bleu alcian (A3157, Sigma Aldrich. 30 secondes) et l'éosine (5 secondes) a été utilisé comme contre-colorant. Les lames colorées par HE ou par le bleu alcian ont ensuite été déshydratées et montées avec du Depex (1005790500, Sigma Aldrich).

La quantification de la surface colorée au Bleu Alcian sur la surface des cellules acinaires, métaplasique et des cellules qui composent les PanIN a été réalisée à l'aide du programme HALO (Indica Labs, v.3.3.2541). L'intelligence artificielle « DenseNet AI » a permis de sélectionner les cellules d'origine

acinaire et l'algorithme « Area quantification FL v2.2.1 » a permis de déterminer la surface colorée par le Bleu Alcian.

Immunoprécipitation et spectrométrie de masse

Le pancréas émincé a été lavé dans du HBSS (14025-050, Life Technologies) et digéré par la collagénase P (11213865001, Sigma Aldrich. 0,2 mg/ml dans du HBSS) pendant 15 minutes, à 37°C, sous agitation (225 rpm). L'activité enzymatique a été inhibée avec du FBS froid à 2,5%. Les fragments de tissus ont été lavés deux fois avec du PBS à 4°C et réticulés par incubation à température ambiante dans une solution de dithio-bis(succinimidyl propionate) (DSP) fraîchement préparée (13303-100, CovaChem. 2 mM) dans du PBS/DMSO 5% (D4540, Sigma Aldrich). La réaction de réticulation a ensuite été inhibée par l'ajout de Tris (04819638, MP Biomedicals. 20 mM, pH 7,5) pendant 15 minutes. Les protéines ont été extraites du culot cellulaire centrifugé, à l'aide d'un tampon de lyse RIPA (10 µl/mg de tissu) composé de Tris (50 mM, pH 7,5), NaCl (P029.3, Carl Roth. 100 mM), Igepal® (I8896, Sigma Aldrich. 0,5%), glycérol (800688, MP Biomedicals. 10%), EDTA (04800683, MP Biomedicals. 125 µM), MgCl₂ (1058330250, Sigma Aldrich) et inhibiteur de protéases (11836153001, Sigma Aldrich). Le lysat a été clarifié par centrifugation. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide du test protéique de Bradford. Des billes magnétiques de protéine A/G prélavées (88802, Life Technologies. 50 µl par échantillon) ont été couplées à 10 µg de l'anticorps spécifiquement dirigé contre la protéine cible dans un volume total de 200 µl de tampon RIPA. L'anticorps IgG anti-lapin (KCC003, Rockland) a été utilisé comme anticorps de contrôle isotypique. Les billes, conjuguées aux anticorps et lavées, ont ensuite été incubées avec le lysat cellulaire, débarrassées des protéines se liant de manière aspécifique, aux billes pendant une nuit à 4°C, avec une légère agitation. Après l'immunoprécipitation, les billes ont été lavées abondamment avec du tampon RIPA pour éliminer les protéines liées de manière non spécifique. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées des billes à l'aide de 4x Laemmli Sample Buffer (1610747, Bio-Rad) avec du 2-mercaptoéthanol (31350010, Life Technologies) complété par du tampon RIPA dans un volume final de 50 µl. Les immunoprécipitats ont été soumis à un Western Blot pour vérifier

l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt. 50 µg de protéines du lysat de cellules de départ ont été utilisés comme témoin total.

En parallèle au Western Blot, les protéines immunoprécipitées ont été séparées pendant 15 minutes à 120V dans un gel d'acrylamide à 10%. Les bandes de protéines ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie colloïdal et digérées dans le gel avec de la trypsine. Les peptides résultant de la digestion ont été extraits avec 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans 65% d'acétonitrile (ACN) et séchés dans un speedvac. Les peptides ont été dissous dans le solvant A (0,1% de TFA dans 2% d'ACN), chargés sur une pré-colonne en phase inversée (Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific) et élués en mode contre-lavage. La séparation des peptides a été réalisée à l'aide d'une colonne analytique en phase inversée (Acclaim PepMap RSLC, 0,075 x 250 mm, Thermo Fisher Scientific) avec un gradient linéaire de 4%-27,5% de solvant B (0,1% TFA dans 98% ACN) pendant 40 minutes, 27,5%-50% de solvant B pendant 20 minutes, 50%-95% de solvant B pendant 10 minutes, et un maintien à 95% de solvant B pendant les 10 dernières minutes, à un débit constant de 300 nl/min sur un système Ultimate 3000 RSLC. Les peptides ont été analysés par un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Lumos tribrid (Thermo Fisher Scientific). Ils ont été soumis à une source NSI suivie d'une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) dans le Fusion Lumos couplé en ligne à la nano-LC. Les peptides intacts ont été détectés dans l'Orbitrap à une résolution de 120.000. Les peptides ont été sélectionnés pour la MS/MS en utilisant le réglage HCD à 30, et les fragments d'ions ont été détectés dans l'Orbitrap à une résolution de 30.000. Une procédure dépendant des données et alternant entre un balayage MS suivi de balayages MS/MS a été appliquée pendant 3 secondes pour les ions au-dessus d'un seuil de comptage d'ions de $2,0 \times 10^4$ dans le balayage d'étude MS, avec une exclusion dynamique de 40 secondes. La tension d'électrospray appliquée était de 2,1 kV. Les spectres MS1 ont été obtenus avec une cible AGC d'ions 4×10^5 et un temps d'injection maximal de 50 ms, et les spectres MS2 ont été acquis avec une cible AGC d'ions 5×10^4 et une injection maximale réglée sur dynamique. Pour les balayages MS, la plage de balayage m/z était comprise entre 375 et 1800. Les données MS/MS résultantes ont été traitées à l'aide du moteur de recherche Sequest HT dans Proteome Discoverer 2.5 SP1 contre une

base de données de protéines de *Mus Musculus* obtenue à partir d'Uniprot. La trypsine a été spécifiée comme enzyme de clivage, permettant jusqu'à 2 clivages non effectués, 4 modifications par peptide et jusqu'à 5 charges. L'erreur de masse a été fixée à 10 ppm pour les ions précurseurs et à 0,1 Da pour les ions fragments. L'oxydation de Met (+15,995 Da) et la conversion de Gln (-17,027 Da) ou de Glu (-18,011 Da) en pyro-Glu au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide ont été considérées comme des modifications variables. Le taux de fausse découverte (FDR) a été évalué à l'aide de Percolator et les seuils pour la protéine, le peptide et le site de modification ont été fixés à 1%. Pour la comparaison des abondances, les rapports d'abondance ont été calculés par Label Free Quantification (LFQ) des intensités des précurseurs dans Proteome Discoverer 2.5 SP1. Les protéines ont été considérées comme immunoprécipitées avec G3BP1 ou avec G3BP2 si le rapport d'abondance était > 2, la valeur p ajustée < 0,05, le score PEP Sum > 3, le peptide unique > 1 et FDR = élevée.

Échantillons de pancréas humain

L'utilisation de tissus humains présentant un adénocarcinome canalaire pancréatique confirmé histologiquement et sans traitement néoadjuvant a été approuvée par le comité d'éthique médicale de l'hôpital Erasme (P2021/382).

Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyennes $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons simples entre deux groupes expérimentaux ont été effectuées à l'aide d'un test t de Student non-pairé. Pour identifier les différences significatives entre plusieurs groupes, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA à sens unique suivie d'un test de Tukey. Pour toutes les analyses statistiques, le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad 8.0.2 Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, États-Unis). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, non significatif.

D. Résultats

L'expression des protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2 est induite lors de la tumorigenèse pancréatique

Dans l'une de nos précédentes études⁷, nous avons obtenu le transcriptome de cellules acinaires pancréatiques exprimant une forme oncogénique de KRAS, en absence ou en présence d'inflammation. L'analyse de ces données a indiqué que parmi les 1747 ARNm montrant une augmentation significative de leur expression ($p\text{-value} < 0,05$; $\log_2\text{ratio} > 0,5$) en présence d'inflammation, 55 d'entre eux codent pour des protéines de liaison à l'ARN (RBP). Cela représente près de 13% des 415 protéines identifiées comme RBP (<http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca/>) (**Figure 1A et 1B**). Certaines de ces RBP pourraient être impliquées dans la formation des PanIN, en contrôlant un mécanisme moléculaire lié au processus de traduction.

Pour tester cette possibilité, et sur base de données de la littérature établissant leur rôle dans la régulation de la traduction (voir Introduction 4.D.1. Rôles en lien avec la traduction), nous avons décidé de nous concentrer sur deux de ces RBP, à savoir G3BP1 et G3BP2. Dans cette optique, nous avons tout d'abord comparé l'expression d'ARNm de *G3BP1* et de *G3BP2* dans des PDAC et des tissus pancréatiques normaux adjacents. Les résultats montrent une augmentation significative de leur expression au cours du processus tumoral humain, d'environ 4 fois (**Figure 1C**). Dans les modèles murins ElaK, en absence et en présence d'inflammation, nous avons constaté que leur expression augmentait dans les PanIN par rapport aux cellules acinaires. De manière intrigante, cette augmentation s'accompagne d'un changement de localisation cellulaire, G3BP1 et G3BP2 passant d'une localisation principalement périnucléaire dans les cellules acinaires à une localisation cytoplasmique dans les PanIN (**Figures 1D et 1E**). La localisation périnucléaire spécifique de G3BP1/2 dans les cellules acinaires se distingue de celle trouvée dans d'autres types cellulaires qui est caractérisée par un enrichissement d'expression au niveau du cytoplasme (**Figures 2A, 2B, S1C et S2C**).

Le pattern d'expression cytoplasmique de G3BP1 et G3BP2 dans les PanIN précoces est conservé dans les PanIN avancées de souris ElaK LSL-Trp53^{R172H/+} (ElaKP) et dans les tumeurs résultant d'une greffe orthotopique de cellules KPE obtenues à partir d'un PDAC présent dans une souris ElaKP (**Figures 1F et 1G**). En conclusion, l'expression de G3BP1 et G3BP22 est induite au cours la tumorigenèse pancréatique, que ce soit chez l'humain ou la souris.

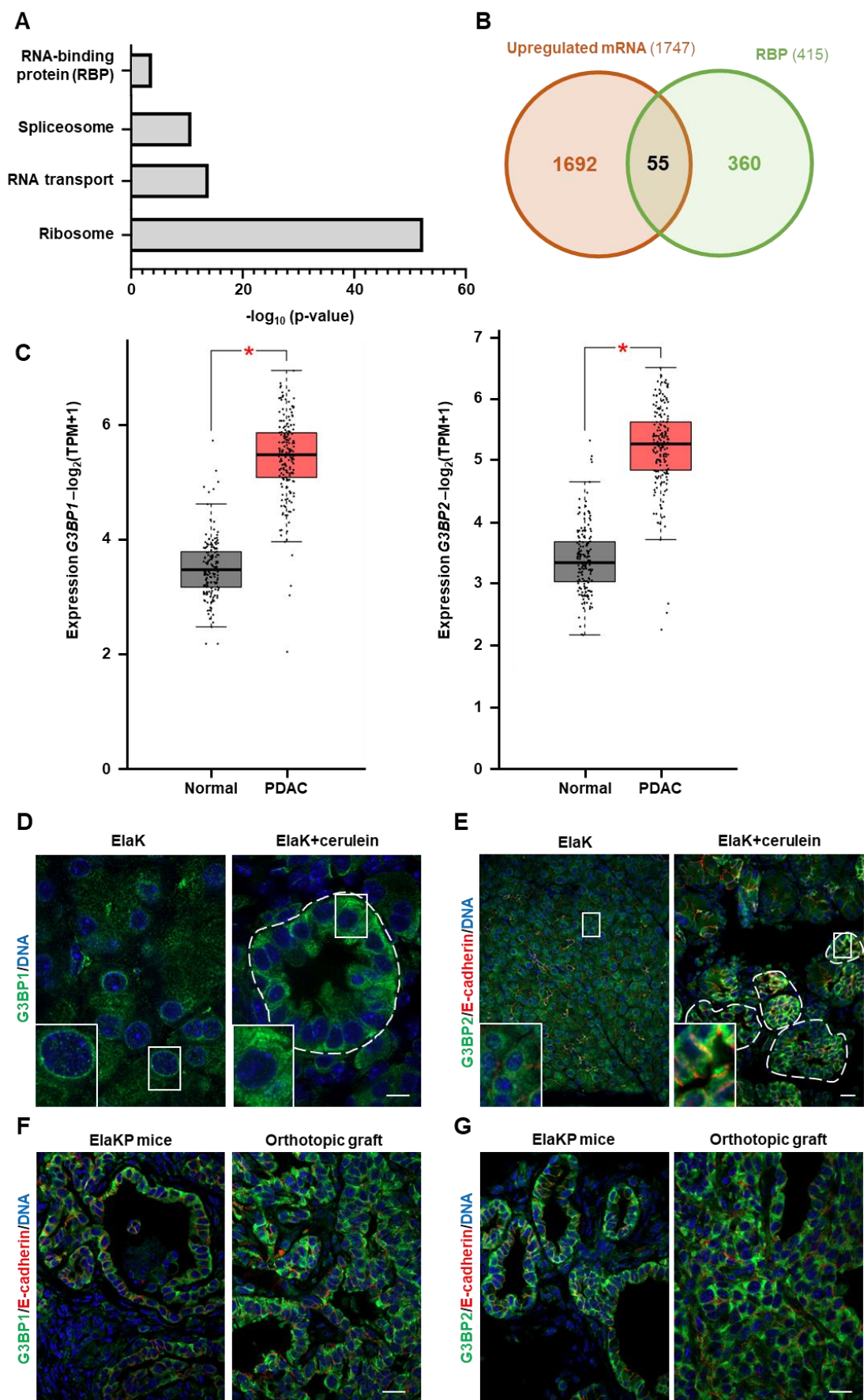


Figure 1. L'expression des protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2 augmente lors de la formation des tumeurs pancréatiques. (A) Diagramme illustrant des voies biologiques significativement enrichies dans le transcriptome de cellules acinaires pancréatiques exprimant une forme oncogénique de KRAS, en présence d'inflammation. (B) Diagramme de Venn montrant le nombre d'ARNm communs entre les ARNm augmentés dans la tumorigénèse pancréatique et les ARNm codant les protéines de liaison à l'ARN (<http://rbpddb.cabr.utoronto.ca/>). (C) Expression du gène de *G3BP1* et de *G3BP2* dans les adénocarcinomes canaux pancréatiques (PDAC) humains (rouge, n=179) et dans les tissus normaux correspondants (gris, n=171) disponibles dans les données de GTEx (Genotype-Tissue Expression) et de TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) exploitées par le programme GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). L'astérisque rouge indique une signification statistique à une p-valeur > 0,01. Échelle ordinale : log₂ (TPM+1). (D) Coupes de pancréas de souris ElaK traitées avec de la céruléine ou non (contrôle) immunomarquées avec G3BP1. n=5. (E) Coupes de pancréas de souris ElaK traitées avec de la céruléine ou non (contrôle) immunomarquées avec G3BP2 et E-cadhérine (marqueur de la membrane plasmique). n=5. (F) Coupes de PDAC présent dans une souris ElaKP et d'une tumeur orthotopique générée avec des cellules PDAC dérivées d'ElaKP immunomarquées avec G3BP1 et E-cadhérine. n=3. (G) Coupes de PDAC présent dans une souris ElaKP et d'une tumeur orthotopique générée avec des cellules PDAC dérivées d'ElaKP immunomarquées avec G3BP2 et E-cadhérine. n=3. Les noyaux ont été colorés au Hoechst. Lignes pointillées : PanIN. Barre d'échelle : 10 µm (D) ou 20 µm (E, F, G).

Les protéines G3BP1/2 sont essentielles à la tumorigénèse pancréatique

Afin d'évaluer le rôle de G3BP1 et de G3BP2 dans la tumorigénèse pancréatique, nous avons généré des souris présentant une inactivation conditionnelle de G3BP1 et G3BP2 (*G3bp1^{ff}* et *G3bp2^{ff}*) dans les cellules acinaires du pancréas. Pour cela, nous avons inséré à l'aide du système CRISPR-Cas9 des sites *loxP* de part et d'autre de l'exon 2 des gènes *G3bp1* et *G3bp2*, et avons vérifié par séquençage l'insertion correcte des différents sites *loxP* (Figures S1A et S2A). L'insertion des sites *loxP* ne perturbe pas l'expression protéique de G3BP1 et de G3BP2 (Figures S1B-C et S2B-C) et l'histologie des tissus étudiés dans les souris *G3bp1^{ff}* et *G3bp2^{ff}* (Figures S1D et S2D).

Nous avons alors cherché à voir si nos modèles permettaient d'éliminer de façon efficace l'expression de G3BP1 et G3BP2 dans les cellules acinaires. Pour cela, nous avons croisé les souris *G3bp1^{ff}* et *G3bp2^{ff}* avec des souris ElastaseCre^{ER} (Ela) pour obtenir des souris Ela-*G3bp1^{ff}* et Ela-*G3bp2^{ff}*. Nous avons traité ces souris au tamoxifène et les avons sacrifiées pour récupérer leur pancréas 2 mois après le traitement. Le pancréas de ces souris présentait une histologie normale (données non représentées). Nous avons également observé une perte d'expression de G3BP1 (Figures 2A) et une

perte suggérée de G3BP2 dans une partie des cellules acinaires (**Figure 2B**). Dans le pancréas de souris *Ela-G3bp2^{ff}* porteuses d'un allèle *Rosa^{YFP}*, il apparaît que l'expression de G3BP1 est plus élevée dans les cellules acinaires exprimant YFP, comparé à celles qui n'expriment pas YFP, ce qui semble indiquer que la perte de G3BP2, suggérée par le marquage de la YFP, est compensée par une augmentation de l'expression de G3BP1. Ces résultats suggèrent que G3BP1 ne présente pas de fonction dans les cellules acinaires d'un pancréas normal et qu'il en va de même pour G3BP2.

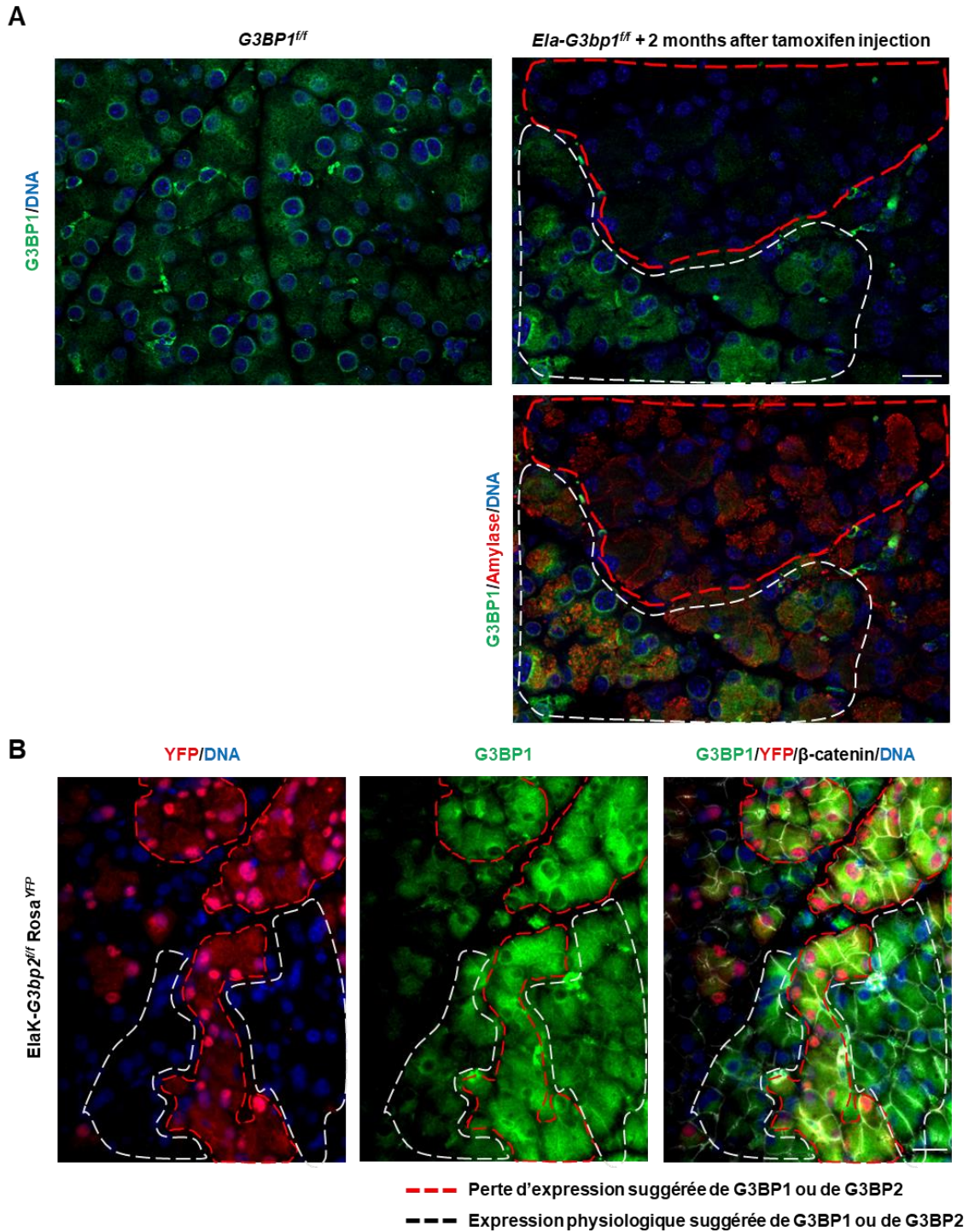


Figure 2. G3BP1 et G3BP2 ne présentent pas de fonctions dans les cellules acinaires d'un pancréas normal. (A) Coupe de pancréas de souris *G3bp1^{fl/fl}* immunomarquée avec G3BP1 et amylase (marqueur de différenciation acinaire). (B) Coupe de pancréas de souris *ElaK-G3bp2^{fl/fl}-Rosa^{YFP}* immunomarquée avec G3BP1, β-caténine et YFP. Le marquage YFP met en évidence les cellules acinaires dans lesquelles la Cre recombinase est active et a donc probablement recombiné les sites *loxP* flanquant l'exon 2 du gène *G3bp2*, entraînant la perte d'expression de G3BP2 et l'expression de la YFP à partir du locus *Rosa* dans ces cellules. Les lignes en pointillés rouges représentent les cellules acinaires caractérisées par une perte probable d'expression de G3BP2, tandis que les lignes en pointillés blancs représentent les

cellules acinaires qui n'expriment pas la YFP et qui expriment donc toujours G3BP2 à des niveaux physiologiques. Une expression plus élevée de G3BP1 est observée dans les cellules acinaires n'exprimant plus G3BP2. Les noyaux ont été colorés au Hoechst. Barre d'échelle : 20 μ m (A, B). Pour cette figure, l'absence de résultats avec l'anticorps anti-G3BP2 provient de l'inefficacité des nouveaux anticorps anti-G3BP2 reçus durant la réalisation de ces expériences. Suite à une demande d'information, la firme productrice de l'anticorps nous a indiqué que l'animal ayant servi à la production des nouveaux lots n'était plus le même. n=3.

Nous avons alors étudié le rôle éventuel des deux protéines dans la tumorigenèse pancréatique par croisement de nos modèles avec le modèle LSLKras^{G12D}. A cette fin, les souris ElaK-G3bp1^{f/f} et Ela-G3bp2^{f/f} qui résultaient de ces croisements ont été traitées au tamoxifène, puis à la céruléine pour induire une inflammation du pancréas. Nous n'avons pas observé de différence histologique entre les pancréas ElaK, ElaK-G3bp1^{f/f} et ElaK-G3bp2^{f/f}, des PanIN étant présentes dans les pancréas des 3 génotypes (**Figure 3A**). Des immunomarquages réalisés à l'aide d'anticorps G3BP1 et G3BP2 permettaient d'observer dans les pancréas de souris ElaK-G3bp1^{f/f} et ElaK-G3bp2^{f/f} la présence de PanIN qui exprimaient ou n'exprimaient pas G3BP1 et G3BP2 (**Figures 3B et 3C**). Ces résultats indiquent que l'initiation du cancer du pancréas n'est pas altérée dans les cellules acinaires présentant une inactivation de G3BP1 ou de G3BP2, et que G3BP1, tout comme G3BP2, ne contrôle pas la formation des PanIN.

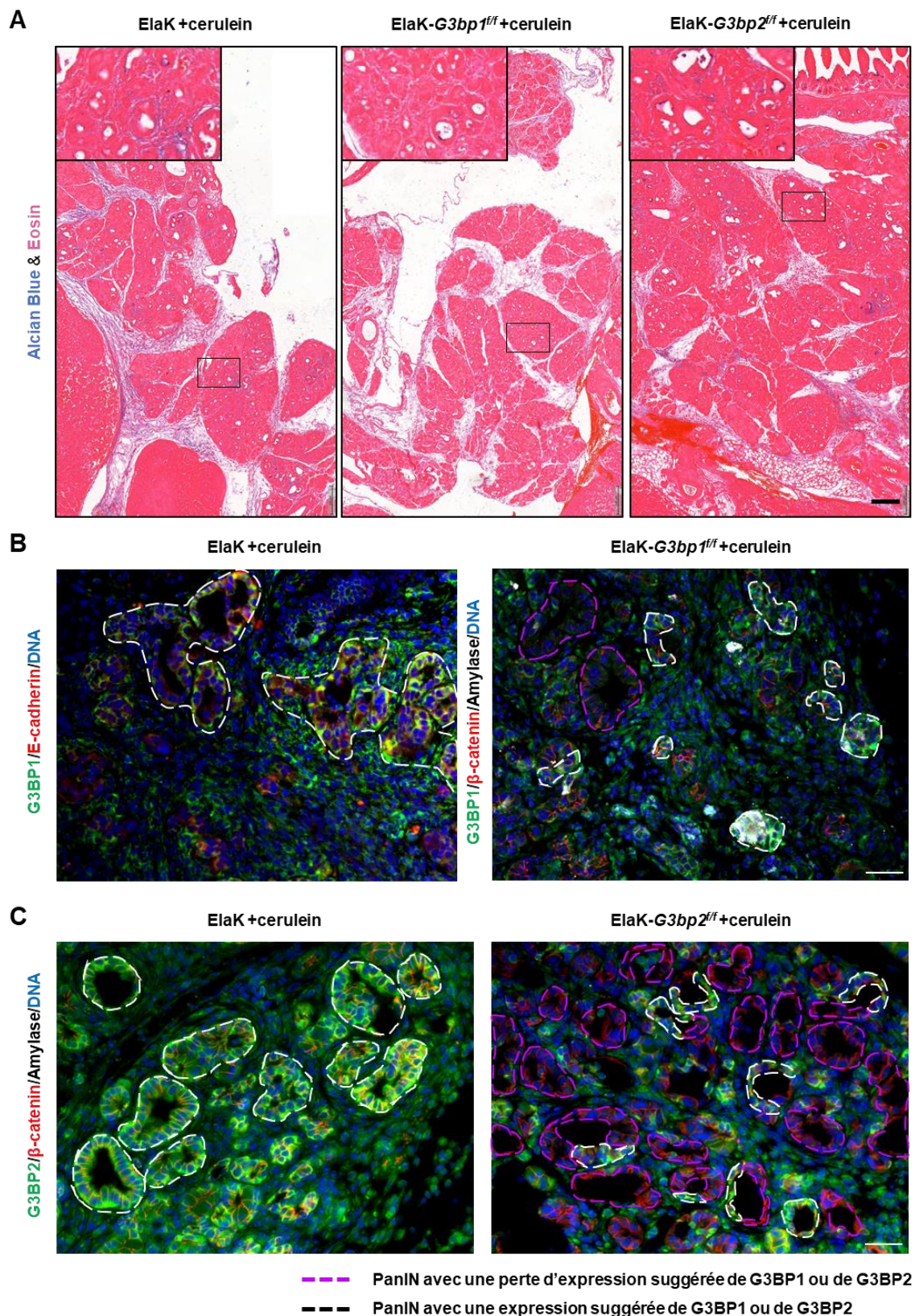


Figure 3. L'inactivation conditionnelle de *G3bp1* ou de *G3bp2* dans les cellules acinaires n'impacte pas la formation des PanIN. (A) Coupes de pancréas colorées au bleu alcian et l'éosine. Les lames proviennent de souris Elak-G3bp1^{+/+}-G3bp2^{+/+}, Elak-G3bp1^{ff}-G3bp2^{+/+} ou Elak-G3bp1^{+/+}-G3bp2^{ff} traitées à la céruléine (1 semaine) (B) Coupes de pancréas immunomarquées avec G3BP1, β-caténine

(marqueur de la membrane plasmique) et amylase (marqueur de différenciation acinaire). Les coupes proviennent de souris *ElaK-G3bp1^{+/-}* (*ElaK*) ou *-G3bp1^{f/f}* traitées à la céruléine (1 semaine). Les lignes en pointillés blancs représentent les lésions PanIN exprimant G3BP1, tandis que les lignes en pointillés mauves représentent les PanIN caractérisées par une perte d'expression de G3BP1. **(C)** Coupes de pancréas immunomarquées avec G3BP2, β -caténine et amylase. Les coupes proviennent de souris *ElaK-G3bp2^{+/-}* (*ElaK*) ou *-G3bp2^{f/f}* traitées à la céruléine (1 semaine). Les lignes en pointillés blancs représentent les lésions PanIN exprimant G3BP2, tandis que les lignes en pointillés mauves représentent les PanIN caractérisées par une perte d'expression de G3BP2. Les noyaux ont été colorés au Hoechst. n=5. Barre d'échelle : 200 μ m (A), 40 μ m (B, C).

Afin de tester l'éventuelle redondance fonctionnelle de G3BP1 et G3BP2, nous avons généré des souris *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}*. Après une semaine de traitement à la céruléine, les souris *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}* montraient une formation réduite de lésions PanIN, en comparaison à des souris *ElaK* (**Figures 4A et 4B**). Un traitement de 4 semaines à la céruléine a également été réalisé afin d'obtenir un pancréas présentant une tumorigenèse plus avancée. Ce traitement confirmait le résultat précédent, et indiquait une réduction de 5 fois de la présence de PanIN positives au Bleu Alcian dans les pancréas *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}*, comparé au pancréas *ElaK* (**Figures 4C et 4D**). Des immunofluorescences sur des coupes issues de ces souris ont permis de mettre en évidence que des cellules ayant perdu l'expression de G3BP1 maintiennent l'expression du marqueur de marqueur acinaire dans les pancréas *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}* (**Figures 4E**). Etant donné que ce résultat n'a pas été observé dans les pancréas *ElaK-G3bp1^{f/f}* (**Figures 3B**), la perte d'expression de G3BP1 dans les cellules amylase-positives dans *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}* est probablement associée avec une expression de G3BP2. Ces résultats suggèrent que la diminution de la formation de PanIN observée dans *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}* est liée à la perte d'expression de G3BP1 et de G3BP2.

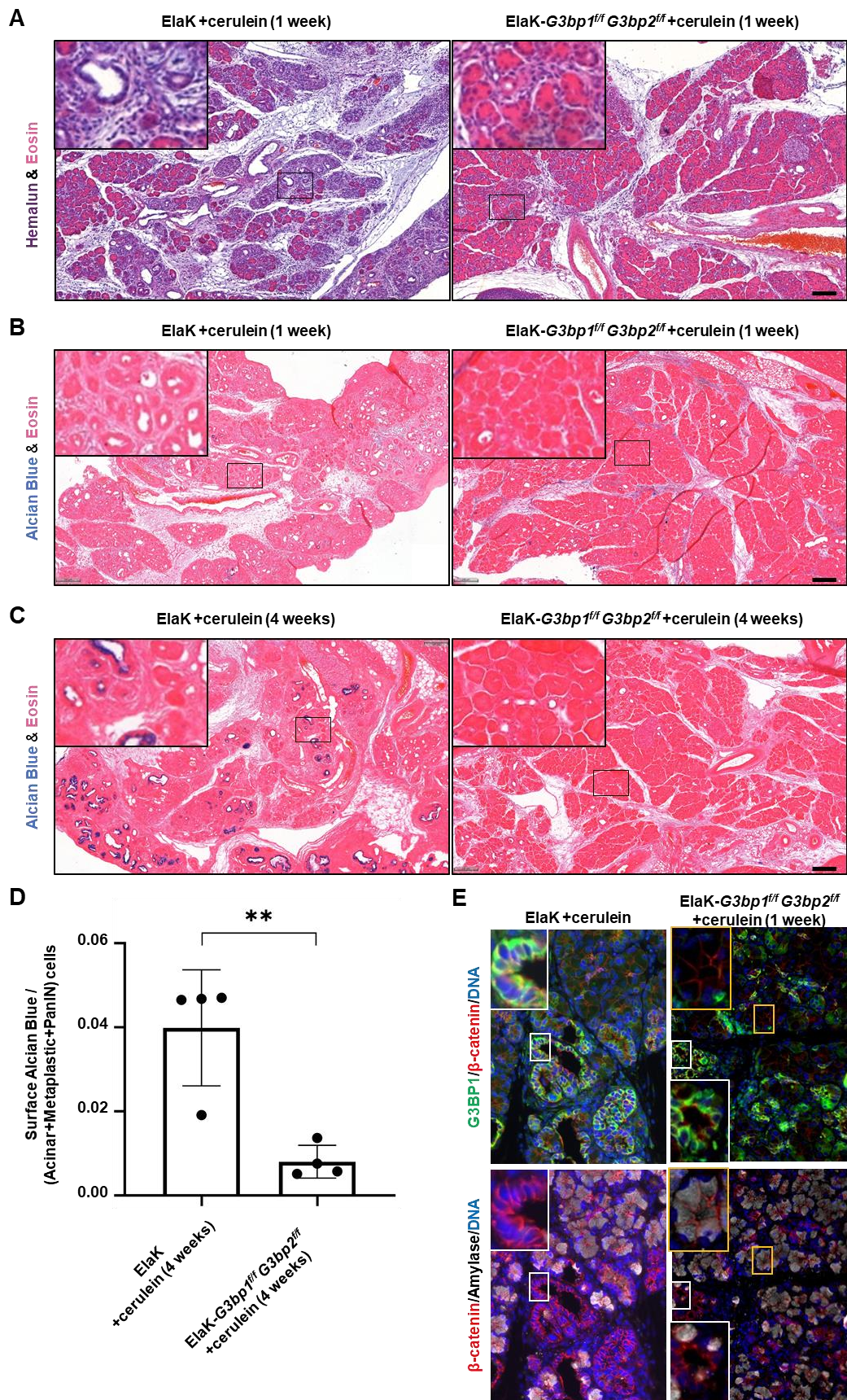


Figure 4. L'inactivation de *G3bp1* et de *G3bp2* dans les cellules acinaires empêche la formation des PanIN. (A) Coupes de pancréas colorées à l'hémalum et l'éosine. Les lames proviennent de souris *ElaK-G3bp1^{+/+}-G3bp2^{+/+}* ou *ElaK-G3bp1^{ff/ff}-G3bp2^{ff/ff}* traitées à la céruléine (1 semaine). (B) Coupes de pancréas colorées au bleu alcian et l'éosine. Les lames proviennent de souris *ElaK-G3bp1^{+/+}-G3bp2^{+/+}* ou *ElaK-G3bp1^{ff/ff}-G3bp2^{ff/ff}* traitées à la céruléine (1 semaine). (C) Coupes de pancréas colorées au bleu alcian et l'éosine. Les lames proviennent de souris *ElaK-G3bp1^{+/+}-G3bp2^{+/+}* ou *ElaK-G3bp1^{ff/ff}-G3bp2^{ff/ff}* traitées à la céruléine (4 semaines). (E) Coupes de pancréas immunomarquées avec G3BP1, G3BP2, β -caténine (marqueur de la membrane plasmique) et amylase (marqueur de différenciation acinaire). Les coupes proviennent de souris *ElaK* ou *ElaK-G3bp1^{ff/ff}-G3bp2^{ff/ff}* traitées à la céruléine (1 semaine). Les encadrés jaunes représentent des cellules qui ont perdus l'expression de G3BP1 ou de G3BP2 suite au traitement du tamoxifène. Les encadrés blancs représentent des cellules qui maintiennent l'expression de G3BP1 ou de G3BP2. Les noyaux ont été colorés au Hoechst. n=4. Barre d'échelle : 200 μ m (A, B, C) 20 μ m (E).

G3BP1, G3BP2, CAPRIN1, et USP10 interagissent au sein d'un même complexe protéique.

Afin d'investiguer le mécanisme par lequel les protéines G3BP1 et G3BP2 contrôlent la tumorigénèse pancréatique, nous avons immunoprécipité G3BP1 et G3BP2 à partir d'extraits de pancréas de souris *ElaK*, traitées ou non à la céruléine. Par la suite, nous avons analysé les protéines immunoprécipitées par spectrométrie de masse. Cette approche nous a ainsi permis d'établir leur interactome protéique dans les pancréas sains et inflammés de ces souris.

Dans le pancréas, que ce soit dans la condition contrôle ou céruléine, comme prévu, chaque protéine G3BP a été retrouvée dans l'immunoprécipitation correspondante, tandis que G3BP2 a été retrouvé dans l'interactome de G3BP1, et inversement G3BP1 dans l'interactome de G3BP2 (**Table 5**: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing).

On peut noter que dans le pancréas contrôle, 324 protéines ont été identifiées à la fois dans l'interactome de G3BP1 et celui de G3BP2, tandis que dans les pancréas traités à la céruléine, 219 protéines figuraient dans l'interactome G3BP1 et G3BP2 (**Figure 5A et Table 5**: https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing). 59

protéines sont trouvées dans les interactomes de G3BP1 et de G3BP2, à la fois en absence et en présence d'inflammation. Ces résultats suggèrent que, lors de l'initiation tumorale pancréatique, certaines interactions avec les protéines G3BP1 et G3BP2 sont conservées, tandis que d'autres sont

perdues ou acquises. Nous avons alors analysé la liste des protéines présentes au regard de nos résultats et des données de la littérature.

Nos données montrent que G3BP1 et G3BP2 sont présents autour du noyau des cellules acinaires, dans un pancréas normal (**Figures 1D et 1E**). D'une façon intéressante, l'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse a révélé l'interaction de G3BP1 et G3BP2 avec la nucléoporine (Nup) 214 et la transportine-1, des composants du pore nucléaire, exclusivement dans les cellules acinaires (**Table 5** : https://drive.google.com/drive/folders/1MAR9_deeCAveSraZirgvUnXoi5y_IMoZ?usp=sharing). La présence d'un domaine NTF2-like dans G3BP1 et G3BP2, similaire au domaine NTF2 interagissant avec les nucléoporines, renforce l'intérêt de ce résultat. Pour renforcer la possibilité d'une interaction entre ces protéines, nous avons réalisées un comarquage pour G3BP1 et les nucléoporines, en utilisant pour détecter ces dernières un anticorps FGNups, qui reconnaît notamment Nup214. Nous n'avons observé qu'une colocalisation très partielle de G3BP1 et FGNups, compatible avec une localisation de G3BP1 sur la face externe du pore cellulaire (**Figure 5B**). Ce comarquage confirmait aussi l'absence d'enrichissement périnucléaire de G3BP1 dans les PanIN (**Figure 5B**). Ces résultats suggèrent une potentielle fonction de G3BP1 et de G3BP2 dans un mécanisme de transport nucléaire spécifique au sein des cellules acinaires.

Nos résultats suggèrent également une interaction de G3BP1 et de G3BP2 avec CAPRIN1 (Cell Cycle Associated Protein 1) et USP10 (Ubiquitin-Specific Protease 10), deux protéines impliquées dans des processus liés à la traduction (voir la partie Discussion). Pour renforcer la possibilité d'interactions entre ces protéines, nous avons réalisé des expériences d'immunomarquage sur des pancréas de souris traitées ou non à la céruléine. Dans les cellules acinaires d'un pancréas normal, nous avons observé une expression préférentielle de CAPRIN1 et USP10 autour des noyaux, d'une façon très similaire à la localisation de G3BP1. Dans les PanIN, CAPRIN1 et USP10 étaient localisées principalement dans le cytoplasme, tout comme G3BP1 (**Figures 5C et 5D**). Afin d'évaluer si une telle interaction était également possible dans le PDAC humain, nous avons cherché à voir si une corrélation existait entre

leurs niveaux d'expression au niveau transcriptionnel, et avons observé que c'était effectivement le cas (**Figure 5E**). Ces résultats indiquent que l'interactome de G3BP1 et G3BP2 est partiellement modifié au cours de la formation des PanIN, et suggèrent que ces modifications sont liées à des changements de leur fonction. Dans les PanIN, une interaction avec CAPRIN1 et USP10 suggère un rôle dans un mécanisme lié à la traduction.

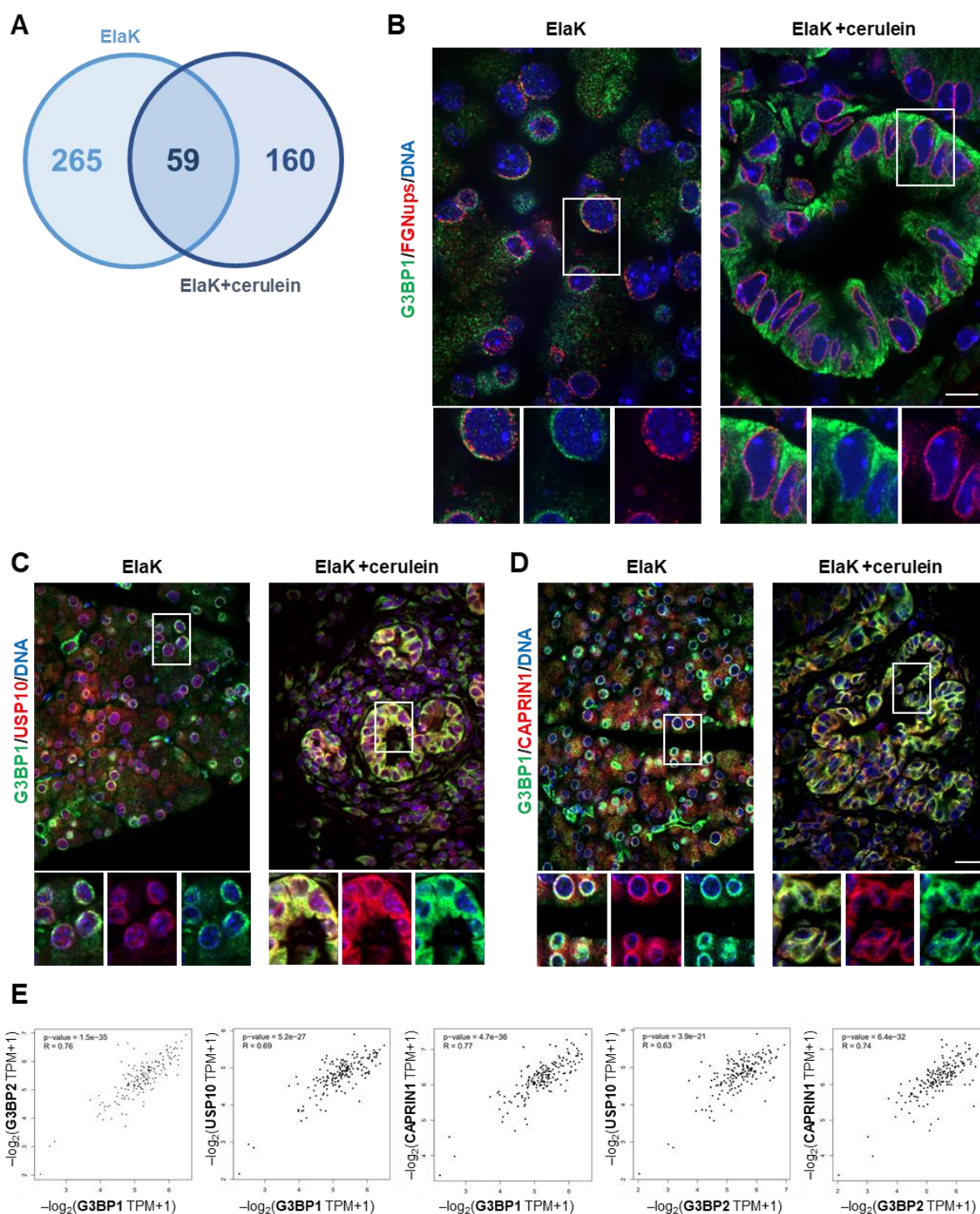


Figure 5. G3BP1 et G3BP2 interagissent et colocalisent avec CAPRIN1 et USP10. (A) Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines communes présentes dans les interactomes acinaire (ElaK) et PanIN (ElaK + céruléine) de G3BP1/2. (B) Coupe de pancréas de souris ElaK traitées ou non à la céruléine immunomarquées avec G3BP1 et FGNups. L'anticorps anti-FGNups cible les nucléoporines présentant des répétitions de phénylalanine et de glycine (FG), dont la nucléoporine 214. n=3. (C) Coupe de pancréas de souris ElaK traitées ou non à la céruléine immunomarquées avec G3BP1 et USP10. n=3. (D) Coupes de pancréas de souris ElaK traitées ou non à la céruléine immunomarquées avec G3BP1 et CAPRIN1. Les noyaux ont été colorés au Hoechst. n=3. Barre d'échelle : 10 μ m (B) 20 μ m (C, D). (E) Diagramme en points représentant les niveaux d'expression des gènes *G3BP1* et *G3BP2* en fonction de ceux des gènes *CAPRIN1*, *USP10* et de l'autre isoforme *G3BP* dans les adénocarcinomes canaux pancréatiques (PDAC) humains à partir des données de TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) exploitées par le programme GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). Le coefficient de corrélation R de Spearman évalue l'intensité et la direction de la relation entre deux variables ordinales. Une relation linéaire entre les deux variables est associée positivement si $R > 0$ et est significative si la p-valeur < 0.05 . Échelle ordinale : $\log_2$ (TPM+1) où TPM signifie transcrits par millions de kilobase.

E. Discussion

Actuellement, un contrôle du développement des PanIN via la régulation de la traduction n'est encore que peu décrit dans la littérature. De tels mécanismes de régulation pourraient impliquer, entre autres, des protéines de liaison à l'ARN. La présente étude met en évidence l'importance des protéines de liaison à l'ARN, G3BP1 et G3BP2, dans la tumorigenèse pancréatique, suggérant qu'un mécanisme de régulation traductionnelle impliquant ces protéines joue un rôle crucial dans l'initiation des tumeurs pancréatiques. La présence de CAPRIN1 et USP10 dans l'interactome de G3BP1 et G3BP2 renforce cette hypothèse. En effet, des études antérieures ont montré que CAPRIN1 interagit avec les complexes d'initiation de la traduction et participe à la régulation de la stabilité et de la traduction d'ARNm. Il a la capacité de se lier à des ARNm spécifiques et de moduler leur traduction. CAPRIN1 peut ainsi influencer la traduction sélective de certains ARNm en réponse à des signaux cellulaires spécifiques (8). De son côté, USP10 joue un rôle dans la régulation de la synthèse des protéines en influençant les voies de signalisation clés impliquées dans la traduction des ARNm (9). Ces résultats incitent donc à explorer davantage les mécanismes sous-jacents.

Pour mieux comprendre ce mécanisme, des expériences supplémentaires seront nécessaires. Nous déterminerons ainsi le transcriptome associé au complexe de G3BP1 et G3BP2 dans les PanIN en utilisant l'immunoprécipitation suivie d'un séquençage de l'ARN (RIP-seq). Nous déterminerons également le translatome, c'est-à-dire la population d'ARNm activement traduits, par une expérience de « polysome profiling » sur des ARN extraits de pancréas provenant de souris témoins ElaK et ElaK-G3bp1^{ff}-G3bp2^{ff} traitées à la céruléine. Afin de déterminer les ARNm soumis à un contrôle traductionnel possible dépendant de G3BP1 et G3BP2, nous comparerons les données transcriptomiques du RIP-seq et du translatome. De plus, nous analyserons si G3BP1 et de G3BP2 sont liées à des monosomes ou à des polysomes. Cette analyse déterminera les effets des protéines G3BP1 et G3BP2 sur le processus de traduction présent dans les PanIN : un effet stimulant sera envisagé si le transcriptome de ces protéines est préférentiellement associé à la fraction liée aux polysomes, un effet inhibiteur dans la situation inverse. L'effet stimulant ou inhibiteur sur la traduction des ARNm sera

validé en comparant le protéome total avec le transcriptome total des cellules acinaires et des PanIN de souris *ElaK* et *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}*. Dans ce contexte, un ARNm dont la traduction est contrôlée par G3BP1 et G3BP2 montrera, au cours de la tumorigénèse pancréatique, une stabilité de son expression, une augmentation de sa liaison aux ribosomes, et une expression protéique augmentée.

L'étude de la régulation traductionnelle requiert des ARN qui ne sont pas dégradés ; obtenir de tels ARN a constitué un défi que nous n'avons pas pu relever lors de la réalisation de cette thèse. La présence de quantités très élevées de RNases dans le pancréas peut faire en sorte qu'il ne sera pas possible d'obtenir des RNA de qualité suffisante. Par conséquent, l'utilisation d'un modèle en culture tel que les cellules KPE représente une alternative pour étudier les mécanismes par lesquelles G3BP1 et G3BP2 contribuent à la tumorigénèse pancréatique, sous réserve de la confirmation de l'existence d'une interaction entre G3BP1, G3BP2, CAPRIN1 et USP10 dans ces cellules. Des expériences préliminaires ont montré une expression cytoplasmique élevée de G3BP2, USP10 et CAPRIN1 dans les cellules KPE, d'une façon similaire à celle trouvée dans les PanIN (**Figure 6**), et une qualité satisfaisante des échantillons issus des cellules KPE lors d'une expérience de « polysome profiling » (donnée non-montrée). L'utilisation de ces cellules pourrait donc faciliter la réalisation des expériences de polysome profiling, de protéomique, et de RIP-seq.

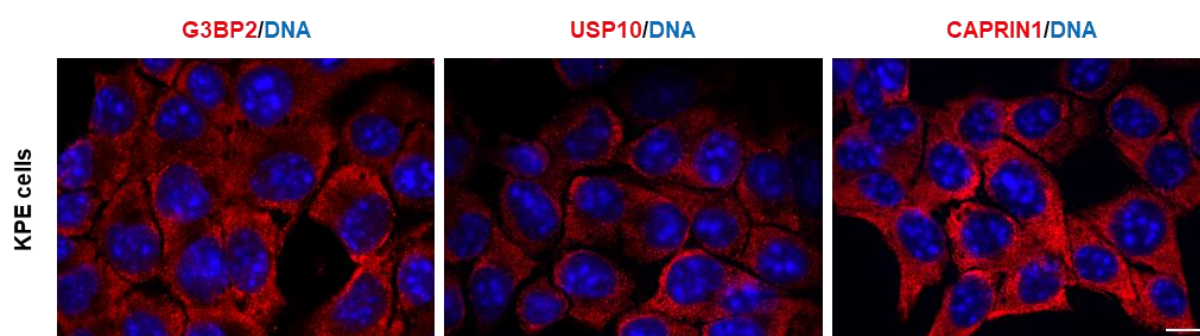


Figure 6. Une expression cytoplasmique élevée de G3BP2, USP10 et CAPRIN1 caractérise les cellules KPE, dérivées des souris *ElaKP*. Cellules KPE immunomarquées avec G3BP2, USP10, et CAPRIN1. Les noyaux ont été colorés au Hoechst. n=1, n=1 et n=4. Barre d'échelle : 10 μ m.

Une question qui se pose concerne les ARNm qui pourraient être régulés par G3BP1 et G3BP2. La quasi absence de PanIN dans le pancréas des souris *ElaK-G3bp1^{f/f}-G3bp2^{f/f}* pourrait indiquer que les ARNm impliqués dans ces régulations codent pour des protéines essentielles au développement des PanIN. La genèse de ces lésions précancéreuses repose fréquemment sur l'activation des voies de signalisation MAPK et AKT, dont les acteurs centraux sont Kras et ses effecteurs. Nous avons constaté une forte augmentation de l'expression de KRAS et de ses effecteurs lors l'initiation des PanIN (7). Cependant, cette hausse est observée au niveau des protéines (**Figure 7A et 7B**), mais pas de leur ARNm (**Figure 7C et 7D**), suggérant que l'expression de ces protéines peut être contrôlée par un mécanisme traductionnel. La présence des ARNm codant pour KRAS et ses effecteurs dans le transcriptome obtenu dans l'expérience de RIP-seq renforcerait cette hypothèse.

Par ailleurs, une analyse des données humaines de PDAC révèle une corrélation entre les niveaux d'expression des ARNm codant G3BP1, G3BP2, KRAS, et ses effecteurs (**Figure 7E**). Ces observations suggèrent que G3BP1 et G3BP2 coréguleraient KRAS et ses effecteurs.

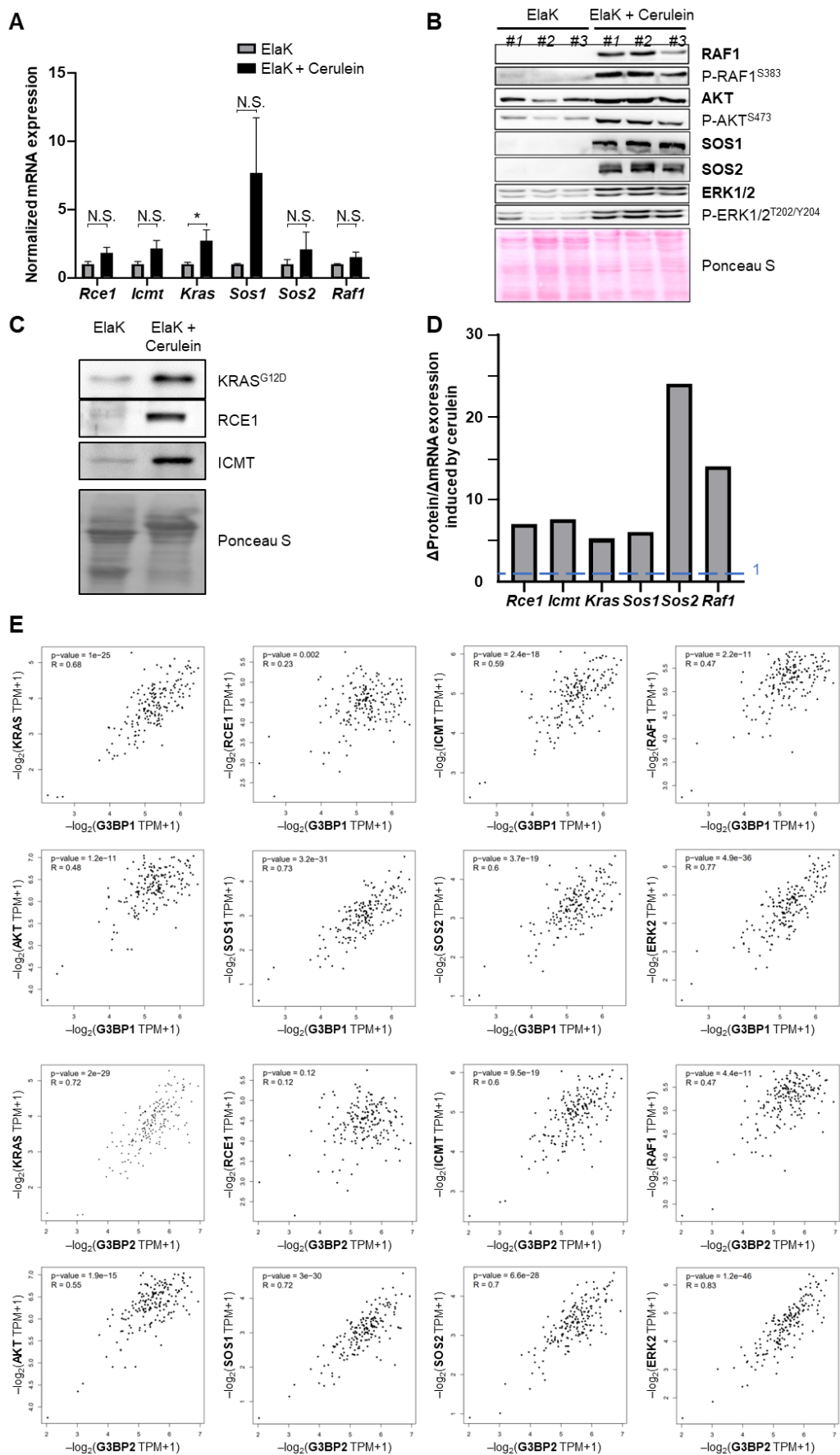


Figure 7. L'inflammation augmente l'expression de KRAS et de ses effecteurs au niveau protéique mais pas transcriptomique. (A) Diagramme représentant l'expression d'ARNm détectées par RT-PCR quantitative des gènes *Rce1*, *lcmt*, *Kras*, *Sos1*, *Sos2* et *Raf1* dans les cellules d'origine acinaire triées par FACS à partir de pancréas de souris *ElaK-Rosa26 YFP* traitées ou non à la céruléine. Donnée obtenue par Mohamad Assi. (B) Détection par Western Blot de l'expression des protéines SOS1, SOS2, RAF1 et sa forme phosphorylée (S383), et AKT et sa forme phosphorylée (S473) dans les lysats protéiques de souris *ElaK* traitées ou non à la céruléine. Le rouge ponceau a été utilisé le contrôle de charge. Donnée obtenue par Mohamad Assi. N=3. (C) Détection par Western Blot de l'expression des enzymes modificatrices de KRAS, RCE1, et ICMT, et de KRAS^{G12D} dans les souris *ElaK* traitées ou non à la céruléine. Les données présentées sont issues d'une expérience représentative d'au moins 3 expériences indépendantes aboutissant à la même conclusion. Le rouge ponceau a été utilisé le contrôle de charge. Donnée obtenue par Mohamad Assi. (D) Diagramme représentant le rapport de l'augmentation protéique sur l'augmentation des ARNm pour les gènes *Rce1*, *lcmt*, *Kras*, *Sos1*, *Sos2* et *Raf1*, en présence d'inflammation. (E) Diagrammes en points représentant les niveaux d'expression des ARNm des gènes *G3BP1* et *G3BP2* en fonction des niveaux d'expression des ARNm des gènes *KRAS*, *RCE1*, *ICMT*, *RAF1*, *AKT*, *SOS1*, *SOS2*, et *ERK2* dans les adénocarcinomes canauxaires pancréatique (PDAC) humains obtenus à partir des données de TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) exploitées par le programme GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). Le coefficient de corrélation R de Spearman évalue l'intensité et la direction de la relation entre deux variables ordinales. Une relation linéaire entre les deux variables est associée positivement si $R > 0$ et est significative si la p-valeur < 0.05 . Échelle ordinale : $\log_2 (TPM+1)$ où TPM signifie transcrits par millions de kilobase.

Une exploration plus poussée de l'interaction entre G3BP1/2 et les principales voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse pancréatique pourrait dévoiler de nouvelles stratégies de traitement et, en fin de compte, améliorer le pronostic des patients atteints d'un cancer du pancréas. En conclusion, les résultats de notre étude soulignent l'importance de G3BP1/2 en tant que cibles thérapeutiques potentielles et jettent les bases de futures recherches visant à relever les défis cliniques posés par le cancer du pancréas.

F. Figures supplémentaires

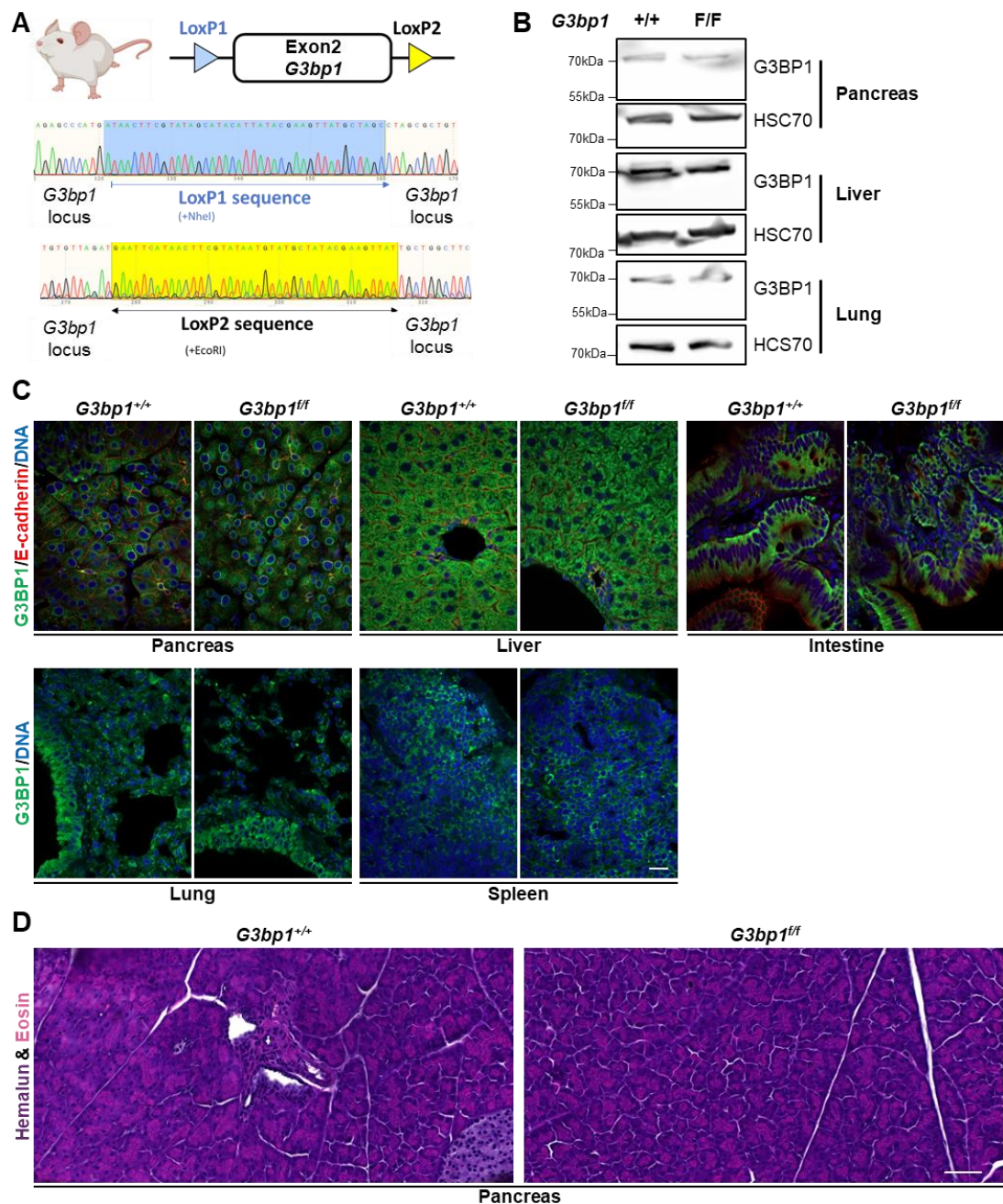


Figure S1. Génération des souris présentant une inactivation conditionnelle du gène *G3bp1* (*G3bp1*^{ff}). L'insertion des sites *loxP* par CRISPR-Cas9 ne perturbe pas l'expression protéique de G3BP1 dans les différents tissus étudiés, ainsi que l'histologie du pancréas. (A) Schéma représentant les sites d'insertion des sites *loxP* dans le locus endogène de *G3bp1* et chromatogrammes qui ont été obtenus via un séquençage de Sanger et qui montrent les séquences d'ADN de ces sites *loxP* et d'une partie de *G3BP1*. (B) Western Blot représentant l'expression protéique de G3BP1 et HSC70 (contrôle de charge) dans les lysats protéiques de souris *G3bp1*^{+/+} (contrôle) ou *G3bp1*^{ff}. Les données présentées sont issues d'une expérience représentative d'au moins 2 expériences indépendantes aboutissant à la même conclusion. (C) Coupes de pancréas, de foie, d'intestin, de poumon et de rate de souris *G3bp1*^{+/+} ou *G3bp1*^{ff} immunomarquées avec G3BP1 et E-cadherine (marqueur de membrane plasmique). Les noyaux ont été colorés au Hoechst. (D) Coupes colorées par l'hémalun et l'éosine. Les lames proviennent de pancréas de souris *G3bp1*^{+/+} ou *G3bp1*^{ff}. n=2. Barre d'échelle : 20 µm (C) et 50 µm (D).

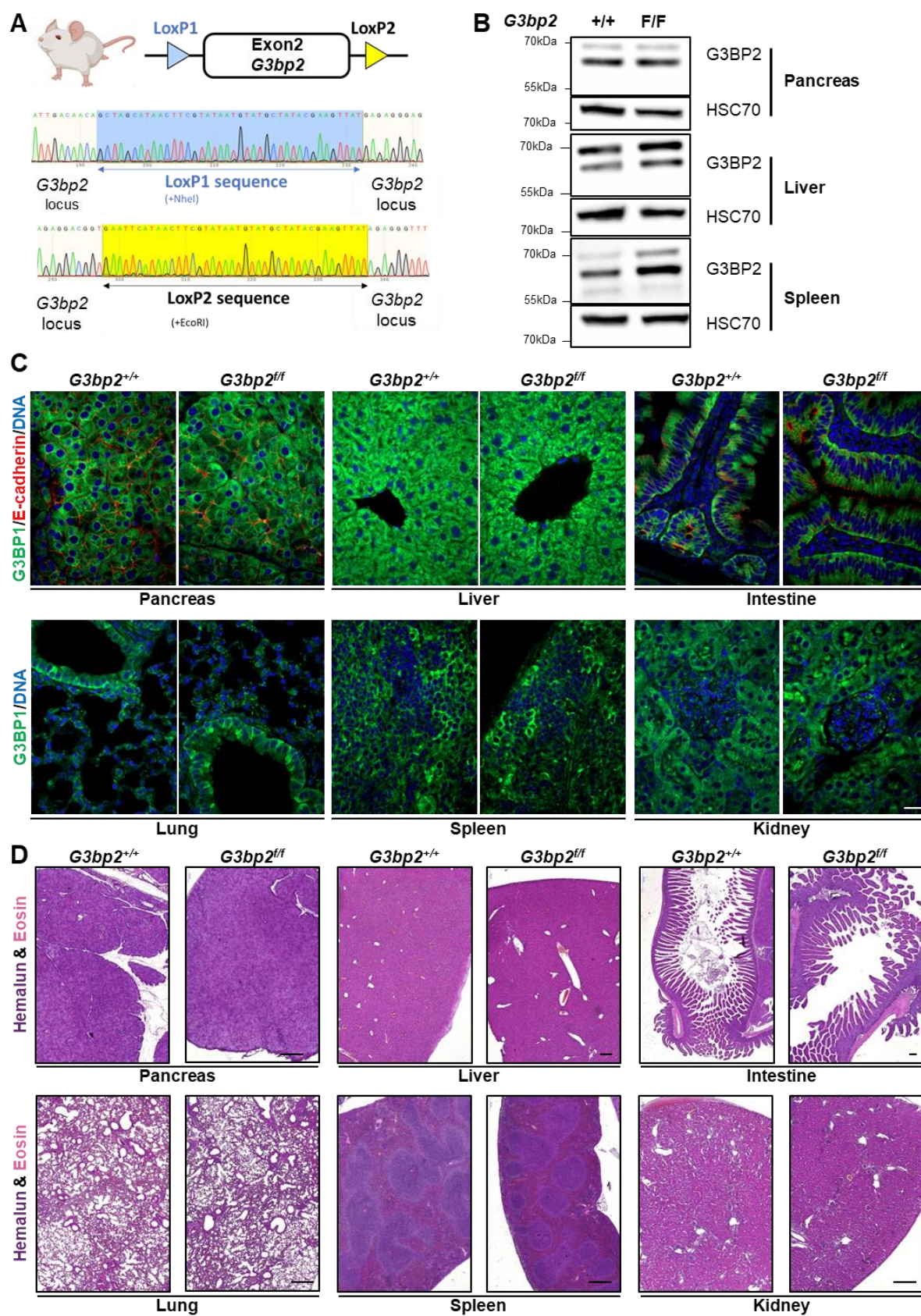


Figure S2. Génération des souris présentant des insertions de sites *loxP* de part et d'autre de l'exon 2 de *G3bp2* endogène (*G3bp2^{ff}*). L'insertion des sites *loxP* par CRISPR-Cas9 ne perturbe pas l'expression protéique de G3BP2 et l'histologie dans les différents tissus étudiés. (A) Schéma

représentant les sites d'insertion des sites *loxP* dans le locus endogène de *G3bp2* et chromatogrammes qui ont été obtenus via un séquençage de Sanger et qui montrent les séquences d'ADN de ces sites *loxP* et d'une partie de *G3BP2*. **(B)** Western Blot représentant l'expression protéique des G3BP2 et HSC70 (contrôle de charge) dans les lysats protéiques de souris *G3bp2^{+/+}* (contrôle) ou *G3bp2^{ff}*. La bande de plus haut poids moléculaire représente l'isoforme G3BP2a alors que la plus basse représente l'isoforme G3BP2b. Les données présentées sont issues d'une expérience représentative d'au moins 2 expériences indépendantes aboutissant à la même conclusion. **(C)** Coupes de pancréas, de foie, d'intestin, de poumon, de rate et de rein de souris *G3bp2^{+/+}* ou *G3bp2^{ff}* immunomarquées avec G3BP2 et E-cadhérine (marqueur de membrane plasmique). Les noyaux ont été colorés au Hoechst. **(D)** Coupes colorées par l'hémalum et l'éosine. Les lames proviennent de pancréas, de foie, d'intestin, de poumon, de rate et de rein de souris *G3bp1^{+/+}* ou *G3bp1^{ff}*. n=3. Barre d'échelle : 20 μ m (C), 200 μ m (D).

G. Références

1. Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernández-Porras, I., Cañamero, M., ... & Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer cell*, 19(6), 728-739.
2. Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2016). Mutant KRAS enhances tumor cell fitness by upregulating stress granules. *Cell*, 167(7), 1803-1813.
3. Fonteneau, G., Redding, A., Hoag-Lee, H., Sim, E. S., Heinrich, S., Gaida, M. M., & Grabocka, E. (2022). Stress granules determine the development of obesity-associated pancreatic cancer. *Cancer discovery*, 12(8), 1984-2005.
4. Qiu, W., & Su, G. H. (2013). Development of orthotopic pancreatic tumor mouse models. *Pancreatic Cancer: Methods and Protocols*, 215-223.
5. Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., ... & Tanaka, K. (2015). Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome biology*, 16, 1-11.
6. Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7), 1120-1123.
7. Assi, M., Achouri, Y., Lorient, A., Daguette, N., Dahou, H., Baldan, J., ... & Jacquemin, P. (2021). Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Research*, 81(10), 2679-2689.
8. Yang, Z. S., Qing, H., Gui, H., Luo, J., Dai, L. J., & Wang, B. (2019). Role of caprin-1 in carcinogenesis. *Oncology Letters*, 18(1), 15-21.
9. Bhattacharya, U., Neizer-Ashun, F., Mukherjee, P., & Bhattacharya, R. (2020). When the chains do not break: the role of USP10 in physiology and pathology. *Cell death & disease*, 11(12), 1033.

Discussions et perspectives

I. Synopsis

La thèse s'est intéressée à la régulation de la traduction au cours de la tumorigenèse pancréatique.

La première étude s'est penchée sur la caractérisation des mécanismes de régulation de la traduction lors de l'initiation du cancer du pancréas. Nous avons identifié les modifications générales qui influent sur la synthèse des protéines, lorsque les PanIN se développent à partir des cellules acinaires. Dans la plupart des tissus, l'initiation d'une tumeur est liée à une augmentation de la synthèse protéique couplée à une augmentation du stress du réticulum endoplasmique. De manière similaire, l'initiation tumorale des cellules acinaires du pancréas montre une augmentation significative de la synthèse des protéines. Cette augmentation est notamment associée à une activité accrue des facteurs d'initiation de la traduction, ainsi qu'à une biogenèse ribosomale accrue. En revanche, le stress du réticulum endoplasmique est réduit. Cette diminution est liée à la modification du programme d'expression génique qui est associée à la formation de PanIN et à la réduction globale du niveau de N-glycosylation qui en résulte.

Dans la deuxième partie de notre travail, notre attention s'est portée sur le rôle des protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2 dans l'initiation tumorale pancréatique. Nous avons d'abord émis l'hypothèse que les granules de stress composés de G3BP1 et de G3BP2 ne jouent pas de rôle dans la tumorigenèse pancréatique. Ensuite, nous avons cherché à mettre en évidence leur implication dans l'initiation tumorale pancréatique, via la caractérisation phénotypique de modèles de souris que nous avons généré et qui présentent une inactivation conditionnelle de ces deux protéines.

II. Régulation de la synthèse protéique lors de l'initiation tumorale pancréatique

Les résultats d'incorporation de puromycine révèlent une augmentation de la synthèse protéique dans les PanIN par rapport aux cellules acinaires. Le résultat est cohérent avec l'augmentation de la production de ribosomes et avec l'activation des facteurs d'initiation de la traduction. Cependant, un

facteur technique, autres que l'initiation tumorale, pourrait expliquer l'augmentation de l'incorporation de la puromycine au cours de la tumorigenèse pancréatique. En effet, les cellules acinaires ont une sécrétion protéique plus élevée que les PanIN, en raison de la production et de la sécrétion d'enzymes digestives. Par conséquent, une quantité plus importante de protéines néosynthétisées et marquées à la puromycine pourraient être rapidement sécrétées hors des cellules acinaires. Cela remettrait alors en question la conclusion de l'expérience quant aux niveaux réels de synthèse protéique entre cellules acinaires et PanIN. Cependant, des expériences d'incorporation d'acides aminés marqués dans un pancréas sain, indiquent que les enzymes digestives nouvellement synthétisées se localisent principalement dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi 10 à 30 minutes après injection des marqueurs, dans les granules de zymogène à partir de 30 minutes, et dans les canaux pancréatiques à partir d'1 heure après leur injection^{203 204 205}. De plus, la comparaison des données d'incorporation de puromycine pendant 30 minutes dans un pancréas sain de souris (Yvan Martineau, données non publiées), et des données issues de cette thèse pour une période de 50 minutes, semble révéler un enrichissement des protéines marquées autour du noyau après 30 minutes. Cependant, après 50 minutes, l'enrichissement n'est plus périnucléaire, mais plutôt cytoplasmique. Par conséquent, on ne peut pas tout à fait négliger qu'une partie de la puromycine incorporée dans les protéines néosynthétisées soit davantage sécrétée dans le cas des cellules acinaires que dans le cas des PanIN. A contrario, les données transcriptomiques d'Assi et al. 2021⁷⁴ suggèrent une augmentation de l'activité du protéasome dans les PanIN. Par conséquent, les protéines immatures marquées à la puromycine seraient plus susceptibles d'être dégradées dans les lésions PanIN que dans les cellules acinaires. L'activité accrue du protéasome pourrait ainsi réduire le niveau d'incorporation de puromycine dans les PanIN. On peut néanmoins anticiper que ces paramètres contraires sont négligeables dans le temps imparti pour le marquage à la puromycine, et de là, être confiant sur les conclusions que nous tirons de cette expérience.

Concernant les acteurs impliqués dans l'augmentation du niveau de synthèse protéique dans les PanIN, une implication du complexe protéique mTORC1, avec sa kinase mTORC, peut être envisagée.

En effet, ce complexe est connu pour stimuler la synthèse protéique²⁰⁶ et nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (RPS6) (dépendante de sa kinase S6K régulée par mTORC1) et de 4E-BP1 ; ces deux protéines voient leur activité régulée par mTORC1. Un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de mTORC1 est qu'il est aussi connu pour réguler positivement plusieurs étapes de la biogenèse des ribosomes, notamment la transcription de l'ARN ribosomal et la synthèse des protéines ribosomales ; nous avons identifié une augmentation de ces deux processus au cours de l'initiation tumorale pancréatique. D'un point de vue mécanistique, à travers la phosphorylation, mTORC1 active la protéine kinase S6K qui favorise la production des ARN ribosomiques à partir de la transcription de l'ADN ribosomique²⁰⁷. L'activation de la synthèse des protéines ribosomales est médiée par la phosphorylation de LARP1 (La-related protein 1) par mTORC1. LARP1 régule spécifiquement la traduction des ARNm portant le motif 5' TOP présent sur les ARNm codant pour les protéines ribosomales²⁰⁸. La phosphorylation de LARP1 libère le complexe LARP1/PABPC1 de la coiffe des ARNm pour laisser la place au complexe eIF4E pour initiation la traduction. Par conséquent, l'activation de mTORC1 pourrait être un mécanisme responsable de l'augmentation de la production de ribosomes matures au cours de l'initiation tumorale pancréatique.

Un autre mécanisme expliquant le lien entre la tumorigenèse pancréatique et la régulation de la biogenèse des ribosomes pourrait impliquer la nucléoline. Cette protéine nucléolaire est connue pour intervenir dans la maturation des pré-ARN ribosomaux et dans l'assemblage des sous-unités des ribosomes. Il a été récemment montré que les formes oncogéniques de RAS augmentaient l'activité de la nucléoline, et ses effets, lors de la tumorigenèse pancréatique²⁰⁹. Nos données supportent entièrement ce résultat, comme nous observons une augmentation d'un peu plus de 2 fois du transcrit de la nucléoline au cours de l'initiation tumorale pancréatique, dans les données RNA-seq d'Assi et al.⁷⁴.

L'augmentation du niveau de synthèse protéique dans les PanIN est également visible au niveau des EIF. Il est connu que la formation du complexe eIF4F, composé d'eIF4A, d'eIF4E et facilite l'initiation

de la traduction en se liant à la coiffe en 5' des ARNm. Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de 4E-BP1, ce qui contribue à renforcer l'interaction entre eIF4E et eIF4G, et donc la traduction.

L'analyse des données RNA-seq d'Assi et al. 2021⁷⁴ révèle par ailleurs une diminution significative des voies KEGG liées à la sécrétion pancréatique ($p\text{-value} = 2,65.10^{-10}$) et à l'exportation de protéines ($p\text{-value} = 4,39.10^{-9}$) pendant l'initiation de la tumorigenèse pancréatique. Toutes les protéines sécrétées présentent un peptide signal qui leur permet d'être adressées au RE. Ce peptide signal est généralement clivé au cours du processus de sécrétion par des peptidases signal. D'une façon intéressante, nous observons au cours de l'initiation tumorale pancréatique une diminution significative de la transcription des gènes codant pour des peptidases signal (de 4,71 pour *Spca3*, de 3,45 pour *Spca2* et de 2,58 pour *Sec11c*) et pour des protéines impliquées dans le transport post-traductionnel des polypeptides précurseurs dans le réticulum endoplasmique pour y être repliées et glycosylées (de 2,55 pour *Sec62*, de 1,66 pour *Sec63* et de 1,43 pour *Sec61b*). De plus, la diminution des transcrits des canaux calciques du réticulum endoplasmique (de 3,56 pour *Itpr2* et de 1,67 pour *Atp2a*) est observée au cours de la tumorigenèse pancréatique. La sécrétion des enzymes digestives est induite suite à une augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme en réponse à la cholécystokinine. Ce calcium est stocké dans le RE et libéré par les canaux calciques lors de la sécrétion des protéines au pôle apical des cellules acinaires. ITPR2 libère le calcium dans le RE suite à son activation par IP3 stimulée par la cholécystokinine pour stimuler la sécrétion protéique, alors que ATP2A2 assure le pompage actif du calcium du cytoplasme vers le RE après la sécrétion des protéines. La diminution envisagée de la capacité de transport par les canaux calciques suggère une diminution de la capacité de sécrétion de protéines, telles que les enzymes digestives. Ainsi, ces données permettent de comprendre pourquoi nous observons une réduction du processus de sécrétion de protéines matures lors la tumorigenèse pancréatique.

Un autre facteur impliqué dans l'augmentation de la biogenèse des ribosomes pourrait bien être la Fibrillarine (FBL). FBL est une méthyltransférase nucléolaire responsable de modifications de l'ARNr au cours de la biogenèse des sous-unités ribosomales. FBL fait partie d'un complexe avec les protéines NOP56, NOP58 et NHP2 et nos données de RNA-seq indiquent que les ARNm codant FBL, NOP58 et NHP2 sont augmentées significativement dans les PanIN, respectivement de 2,15, 2,70 et 4,19. Les méthylations introduites par FBL sur l'ARNr induisent une hétérogénéité importante dans la composition des ribosomes, qui vont contribuer à diversifier leur fonction ; les ribosomes différenciellement modifiés peuvent traduire plus efficacement certains ARNm que d'autres. Dans ces conditions, on peut envisager que l'augmentation de FBL va introduire un niveau supplémentaire de régulation de la traduction lors de la tumorigenèse pancréatique en influençant de façon importante l'expression des gènes. Il est à noter que le rôle de FBL au cours de la tumorigenèse pancréatique est actuellement étudié au sein du laboratoire.

Il est impératif de souligner que nos données proviennent d'un modèle d'initiation tumorale, et plus précisément d'un modèle de souris Ela-K traitée de manière aiguë avec de la céruléine. Il est donc important de considérer que les résultats pourraient varier à des stades plus avancés dans les tumeurs pancréatiques. Par conséquent, des investigations utilisant des modèles de tumorigenèse plus avancés sont nécessaires pour évaluer comment ces mécanismes évoluent dans les stades ultérieurs du développement tumoral.

III. Rôles des granules de stress renforcés par KRAS dans la tumorigenèse pancréatique

Les granules de stress (SG) sont des agrégats denses et sans membrane, composés de protéines et d'ARN que l'on trouve dans le cytoplasme de cellules en culture soumises à un stress, tel que la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). In vivo, que ce soit dans des modèles animaux ou chez l'homme, les pathologies où la présence de SG a été décrite sont plus rares^{210 211 212}. En ce qui concerne les cancers induits par KRAS, comme le PDAC, deux études ont largement contribué à

populariser ce domaine^{213 214}. Ma thèse s'est penchée sur la confirmation de ces données publiées qui indiquent que les SG contribuent au développement de la tumorigenèse pancréatique.

Il a été démontré que la mutation G12D de KRAS favorise la formation des granules de stress en augmentant la transcription de *PTGS2* (enzyme augmentant la synthèse de la prostaglandine 15-d-PGJ2) et en diminuant celle de *HPDG* (enzyme diminuant la production de 15-d-PGJ2). Par conséquent, il a été conclu que l'activation de KRAS favorise la production de 15-d-PGJ2, et que 15-d-PGJ2 serait donc un facteur aggravant de cette maladie²¹⁴. Pour notre part, dans trois cancers associés à une fréquence élevée de mutations KRAS (PDAC, LUAD et COAD), nous avons observé une absence de lien entre les mutations activatrices de KRAS et une variation de l'expression des enzymes métabolisant 15-d-PGJ2. De plus, cette prostaglandine a des propriétés anti-inflammatoires dans les cancers via l'inhibition de voies de signalisation pro-inflammatoire, telles que les voies impliquant NF-κB et JAK-STAT. Deux autres études ont montré que la prostaglandine 15-d-PGJ2, qui cible l'hélicase ARN ATP-dépendante eukaryotic initiation factor 4A-I (eIF4A1), bloque la traduction²¹⁵ et la prolifération cancéreuse, et induit l'apoptose dans les cas de leucémie et de cancer colorectal^{216 217}. Ces résultats vont à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle les granules de stress réduiraient la survie des patients atteints d'un cancer. Par ailleurs, en complément de l'étude transcriptomique, il serait pertinent d'évaluer l'ouverture de la chromatine à la transcription de *PTGS2* et de *HPGD* par CHIP (Immunoprécipitation de la chromatine)-seq chez les patients atteints de PDAC, LUAD et COAD, en utilisant les données de CHIP Atlas.

Par ailleurs, les deux études montrent la présence de SG dans les tumeurs pancréatiques chez l'homme et dans les modèles murins^{213 214}. La présence de SG, généralement associés à un blocage de la synthèse protéique, est difficilement conciliable à une demande accrue en synthèse protéique pendant l'initiation et le développement tumoral.

Nous avons montré que l'absence de granules de stress dans les PanIN d'un pancréas de souris ne réside pas dans leur incapacité à former ces granules. En effet, les cellules des PanIN ont le potentiel

de les former lorsqu'elles sont soumises à un choc thermique. Par ailleurs, les cellules canalaire et les cellules des îlots de Langerhans forment également des granules de stress lors du choc thermique, au contraire des cellules acinaires.

La méthode la plus couramment employée pour conclure qu'une protéine forme des granules de stress consiste à observer d'une part des agrégats dynamiques et visibles par microscopie à fluorescence classique, et d'autre part, la colocalisation avec une protéine des granules de stress, telle qu'EIF4G, CAPRIN1, ou UBAP2L. Cependant, ces observations ne sont pas suffisantes pour conclure à la présence d'une protéine définie dans des SG. En effet, nos résultats suggèrent que G3BP1 et CAPRIN1 co-localisent dans les cellules acinaires et dans les cellules des PanIN, alors que nous avons montré qu'il n'y a pas de granules de stress dans ces types cellulaires. Une façon de déterminer la présence de granules de stress est d'identifier les protéines qui interagissent avec la protéine étudiée et de comparer l'interactome identifié avec le protéome des granules de stress, comme nous l'avons fait.

Une autre méthode employée pour déterminer la présence de granules de stress composés de G3BP1/2 est de déléter le domaine NTF2-like de G3BP1/2. En effet, la délétion de ce domaine empêche la formation de granules de stress dépendante de G3BP. Cependant, ce domaine pourrait avoir d'autres fonctions, telles que l'interaction avec USP10 et CAPRIN1 et le transport nucléaire de protéines et d'ARNm, étant donné sa localisation dans les cellules acinaires et sa similarité avec le domaine NTF2 qui est connu pour son rôle dans ce transport. De plus, d'autres caractéristiques des granules de stress pourraient également être requises en complément pour déterminer la nature des condensats observés, telle que la dimérisation de G3BP, sa valence²¹⁸ (c'est-à-dire le nombre de liaisons disponibles à l'ARNm par la protéine) et ses interactions auto-inhibitrices. Cependant, la difficulté réside dans l'utilisation de ces techniques dans les modèles murins.

Une analyse incomplète des interactions de G3BP1/2 peut donc conduire à l'attribution erronée de la fonction de granules de stress aux protéines G3BP1/2 dans le contexte étudié. Par exemple, l'étude de Gupta et al. 2017¹⁸³ associe le mécanisme par lequel G3BP2 régule l'initiation tumorale du sein au rôle

qu'il tient dans la formation des granules de stress, sans toutefois fournir de preuves expérimentales démontrant la présence de ces granules dans des échantillons de cancer du sein. Par conséquent, ce type de raccourcis dans l'étude et dans les référencements peuvent conduire à l'idée de cibler les granules de stress pour traiter les cancers.

IV. Rôles des protéines de liaison à l'ARN G3BP1 et G3BP2 dans la tumorigenèse pancréatique

L'objectif principal de l'étude de G3BP dans la tumorigenèse pancréatique est centré sur l'identification d'un rôle éventuel et la caractérisation du mécanisme moléculaire sous-jacent. Si nous avons pu montrer ce rôle, nous n'avons pas encore identifié le mécanisme impliqué. Sur base des études actuelles décrivant des rôles de G3BP dans différents contextes, il est difficile de suggérer un mécanisme plausible par lequel l'absence de G3BP1 et de G3BP2 dans les cellules acinaires réduit la formation des PanIN. Cependant, nous savons que les cellules acinaires qui perdent l'expression de ces deux protéines maintiennent l'expression de l'amylase, et les PanIN formées ne montrent pas de perte d'expression de G3BP1 et de G3BP2. Ceci pourrait suggérer que la diminution de PanIN observée dans les double KO pourrait être liée à un rôle de G3BP dans la métaplasie acino-canalaire. Il est également concevable que la perte d'expression de G3BP1 et de G3BP2 entraîne la mort des cellules métaplasiques, pour lesquelles leur expression est essentielle à la survie, contrairement aux cellules acinaires.

Une compensation de l'expression de l'une des deux isoformes, G3BP1 ou G3BP2, est observée dans les cellules acinaires et potentiellement dans les PanIN en cas de perte d'expression de l'autre isoforme. De plus, la réduction de la formation de PanIN n'est observée qu'en cas de double délétion. Ceci serait liée à une haute similarité de séquence, expliquant qu'ils présentent des fonctions redondantes. La littérature suggère par ailleurs des fonctions divergentes pour les deux protéines. Par conséquent, nous proposons que le domaine responsable de la tumorigenèse soit une région avec une haute similarité de séquence entre les deux protéines, qui partagerait donc une même fonction.

A. Rôles de G3BP1/2 en lien avec la traduction

Sur base des données de la littérature, les protéines G3BP1 et G3BP2 pourraient promouvoir la tumorigenèse pancréatique en permettant la traduction d'ARNm, d'une façon générale. Alternativement, leurs rôles pourraient être liés à leur influence sur un facteur bien précis. Ainsi, G3BP1 et G3BP2 pourraient entraver les fonctions de p53. S'il est vrai que nous n'avons pas détecté p53 dans l'interactome protéique de G3BP1 et de G3BP2, certaines des protéines qui y ont été détectées influencent l'activité de p53. C'est le cas de USP10 et RanBP2. D'une part, il a été démontré que le complexe composé de G3BP2 et RanBP2 séquestrerait p53 dans le cytoplasme^{189 190}. D'autre part, il a été prouvé que la déubiquitineuse USP10 défavorisait le cancer du pancréas car elle stabilise l'expression de p53 en le déubiquitinylant²¹⁹. Cependant, l'interaction de G3BP1 avec USP10 inhibe la fonction d'USP10 sur p53²²⁰ ; par conséquent, le complexe identifié dans notre étude pourrait favoriser la dégradation de p53. De plus, une surexpression de G3BP1 réduit la présence de p53 au sein du noyau ; l'augmentation d'expression de G3BP1 dans les PanIN pourrait ainsi réduire la présence de p53 dans le noyau. En outre, G3BP2 interagit avec la protéine murine double minute 2 (MDM2) pour inhiber p53, en favorisant sa dégradation via le protéasome¹⁸⁸. Une autre étude indique qu'une expression élevée d'USP10 dans les tissus cancéreux de la prostate est fortement corrélée à une expression élevée de G3BP2 et de p53 dans le cytoplasme¹⁸⁷. Par conséquent, l'expression élevée d'USP10 pourrait inhiber p53 par sa séquestration dans le cytoplasme des lésions PanIN. Enfin, un ARN long non-codant (lncRNA) nommé P53RRA régulerait l'interaction de G3BP1 et de p53. En effet, ce lncRNA interagit avec G3BP1 dans le cytoplasme pour éliminer p53 du complexe de G3BP1 ; cela entraîne une augmentation de l'activité de p53 dans le noyau²²¹. Par conséquent, il serait intéressant de déterminer l'expression des ARN non-codant dont P53RRA dans les pancréas sain et inflammé. En conclusion, on peut envisager un rôle de G3BP dans la tumorigenèse pancréatique via une régulation de l'activité de p53, soit par sa dégradation, soit par sa séquestration dans le cytoplasme des PanIN.

En tous les cas, le rôle des protéines G3BP1 et G3BP2 dans la tumorigenèse pancréatique semble s'écarter de leur rôle initial décrit par Parker en 1996¹⁵³ dans un autre contexte tumoral, où il était montré qu'elles activaient la voie Ras en se liant au domaine SH3 de la protéine activatrice de la Ras-GTPase (GAP) dans les cellules stimulées par le sérum. En effet, l'interactome de G3BP1 et de G3BP2 dans les pancréas sains et inflammés n'a pas révélé la présence de cette protéine GAP.

L'augmentation d'expression de G3BP2 pourrait contribuer à la tumorigenèse pancréatique via NF- κ B. En effet, il a été décrit qu'une surexpression de G3BP2 favorise la rétention d'I κ Ba dans le cytoplasme via la liaison du domaine NTF2-like de G3BP2 à la séquence de rétention cytoplasmique (CRS) d'I κ Ba, qui interagit avec le complexe I κ Ba/NF- κ B¹⁹².

B. Rôles de G3BP1/2 via la régulation d'ARNm

L'identification de l'interactome de G3BP1 et de G3BP2 dans les pancréas sains et inflammés a permis de mettre en évidence un rôle potentiel de ces protéines dans l'augmentation de la traduction de certains transcrits. Il est généralement admis qu'il existe une interaction mutuellement exclusive entre, d'une part G3BP1, et d'autre part CAPRIN1 et USP10, avec G3BP1 interagissant avec CAPRIN1 en condition de stress et avec USP10 en l'absence de stress²⁰², CAPRIN1 et USP10 ont été identifiées comme partenaires protéiques de G3BP1 et de G3BP2 dans les pancréas sains et inflammés. Les données actuelles ne permettent pas encore de déterminer si ces quatre protéines forment un seul complexe ou s'il existe deux complexes différents composés soit de USP10, soit de CAPRIN1. Pour y remédier, il faudrait réaliser l'expérience d'immunoprécipitation suivie de la spectrométrie de masse en maintenant le crosslinker DSP intact avant l'injection des échantillons dans le spectromètre. En effet, ce crosslinker crée des liaisons covalentes entre les groupes amines primaires de deux protéines. La technique permet ainsi de déterminer les régions peptidiques de deux protéines qui se lient et par conséquent identifier si le complexe étudié est composé des quatre protéines, à savoir G3BP1, G3BP2, CAPRIN1 et USP10.

Pour élucider le rôle de l'interaction potentielle de G3BP1/2 avec USP10 et CAPRIN1, une association en lien avec la traduction peut être faite sur base de Ward *et al.* 2011. Leur étude détaille également l'interaction de G3BP1 avec G3BP2, USP10 et CAPRIN en lien avec la traduction d'ARNm viraux²²². Etant donné que les virus utilisent la machinerie de traduction de la cellule hôte infectée, les interactions de G3BP1 avec G3BP2, CAPRIN1 et USP10 peuvent être aboutir à une traduction active d'ARNm spécifiques. Dans le cadre des pancréas sains et inflammés, ces interactions pourraient, par analogie, favoriser la traduction d'ARNm spécifiques. Actuellement, les ARN associés à G3BP1/2 n'ont pas encore été identifiés. Ils le seront par RNA-immunoprecipitation (RIP) suivi d'un RNA-seq. Ces interactions seront confirmées par RNA-scope sur des lames de tissu pancréatique et par immunoprécipitation de l'ARN d'intérêt, suivie d'une analyse protéomique telle que le Western Blot²²³.

Par ailleurs, l'interaction suggérée de G3BP1 avec USP10 pourrait moduler la métaplasie acino-canalaire et la formation des PanIN en régulant l'activité de la protéine c-Myc dont le rôle est démontré dans ces deux processus. D'un côté, USP10 antagonise l'activité transcriptionnelle de l'oncogène c-Myc²²⁴. Par conséquent, étant donné que l'interaction de G3BP1 avec USP10 peut inhiber la fonction d'USP10²²⁰, le complexe identifié dans notre étude pourrait favoriser l'expression de c-Myc. D'un autre côté, même si G3BP1 présente une activité endoribonucléase contribuant à dégrader l'ARNm de c-Myc¹⁷³, il a également été montré que G3BP1 régulait positivement l'expression de c-Myc, au niveau protéique, au cours de la progression du cancer du côlon¹⁸⁶. Par conséquent, l'augmentation de l'expression de USP10 et de G3BP1 dans la tumorigenèse pourrait conduire à une augmentation de l'activité de c-Myc, favorisant ainsi la formation des PanIN.

En outre, au contraire de USP10 et CAPRIN1 qui interagiraient avec G3BP1/2 dans les pancréas sains et inflammés, les protéines FXR2 (Fragile X Related 2) et PUM2 (Pumilio 2) ont uniquement été identifiées comme interactants de G3BP1/2 dans les pancréas inflammés. FXR2 est une RBP impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm²²⁵. PUM2 se lie à un vaste réseau d'ARNm spécifiques et réprime l'expression des protéines en inhibant la traduction et en favorisant la dégradation de l'ARNm.

À l'inverse, dans certains contextes, PUM2 peut activer l'expression des protéines en interagissant avec les polysomes. Ainsi, il participe au contrôle de l'expression génique en régulant la stabilité et la traduction des ARNm²²⁶. L'interaction de G3BP1/2 avec PUM2 a été démontrée dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes dans un modèle de cellules germinales mâles²²⁷. De plus, les immunoprécipitations de G3BP1/2 suivies de la spectrométrie de masse suggèrent l'interaction de G3BP1/2 avec ATXN2L, ELAVL1, NUFIP2, PABPC1, PTBP3, RBM25 et ZC3HAV1, des protéines impliquées dans la régulation de la traduction d'ARNm. Par exemple, PABPC1 est une protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm, qui traduit spécifiquement certains ARNm. D'un point de vue mécanistique, PABPC1 facilite l'interaction de la queue poly(A) avec le complexe eIF4F lié au 5' des ARNm. Cette interaction favorise alors une organisation spatiale propice à l'initiation de la traduction. La liaison de PABPC1 à la queue poly(A) des ARNm protège aussi les ARN de leur dégradation et favorise ainsi leur stabilité¹⁵². Par conséquent, l'identification d'une interaction de G3BP1/2 avec différentes protéines régulatrices de la traduction dans le pancréas sain par rapport à un pancréas inflammé pourrait suggérer une fonction distincte des complexes dans le contrôle des ARNm qui leur sont associés.

Pour identifier la régulation de la traduction d'ARNm par G3BP1/2, les ARNm liés à ces protéines seront identifiées par RIP-seq et le polysome profiling déterminerait les ARNm enrichis en ribosomes. Si les résultats du polysome profiling révèlent des modifications dans la traduction de plusieurs ARNm, il sera nécessaire de confirmer cette modification pour les ARNm d'intérêt. Dans ce cas, une approche combinant l'imagerie de cellules vivantes avec une visualisation de la traduction à l'échelle moléculaire, basée sur la technologie SunTag, pourrait être utilisée¹⁹⁸. Cette technologie analyse la conformation des ARNm, sachant qu'un ARNm, qui est traduit activement, adopte une structure en forme de boucle où les régions 3' et 5' UTR se rapprochent¹⁵².

G3BP1/2 pourraient moduler l'activité de la traduction des ARNm auxquels il est lié, tout en exerçant une influence sur la stabilisation ou sur la dégradation de ces ARNm par le biais de son activité nucléase. Par conséquent, il serait intéressant de comparer les interactomes nucléiques de G3BP1/2

avec les transcriptomes de cellules acinaires et des PanIN⁷⁴, afin d'identifier des ARNm présents dans les deux cas. L'impact de la liaison de G3BP1/2 sur les ARNm associés sera complété par une analyse protéomique de pancréas contrôles et double KO. Cela permettra par exemple d'identifier les ARNm liés et stabilisés par G3BP1/2, car ils seront augmentés à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau protéique au cours de la tumorigenèse.

Une approche comparative pourrait être entreprise en confrontant les ARNm répertoriés dans la littérature comme étant liés à G3BP1 avec les ARNm codant pour des protéines impliquées dans la tumorigenèse pancréatique. Dans le modèle d'initiation tumorale pancréatique du laboratoire, les souris ElaK traitées à la céruléine, il a été montré que l'inflammation entraînait une augmentation protéique des effecteurs de la voie de signalisation de KRAS ainsi que des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles de KRAS⁷⁴. Conjointement, les ARNm codant ces protéines ne sont pas augmentées suite à l'inflammation. Cela suggère que des modifications post-transcriptionnelles sont responsables de l'augmentation protéique, que ce soit par une stabilité accrue des protéines, ou par une augmentation de la traduction des ARNm. Par conséquent, il sera intéressant de rechercher la présence des ARNm codant pour KRAS et ses effecteurs dans l'interactome nucléotidique de G3BP1 et de G3BP2.

Par ailleurs, de manière générale, les cellules tumorales peuvent réactiver des mécanismes de prolifération actifs au cours de l'embryogenèse pour acquérir leurs propriétés tumorales et cancéreuses. Il est donc pertinent d'explorer dans la littérature les mécanismes dans lesquelles G3BP1 et G3BP2 sont impliquées. Ainsi, la protéine de liaison à l'ARN Rasputin, l'homologue de drosophile de G3BP, renforce la stabilité et la traduction d'ARNm codant pour des composants essentiels de la machinerie de transcription, d'épissage et de traduction au cours de l'embryogenèse¹⁶⁹. Par conséquent, la présence d'ARNm codant pour ces composants sera recherchée dans l'interactome de G3BP1 et de G3BP2 trouvés dans les cellules acinaires et les PanIN.

De plus, la liaison des ARNm à G3BP peut être prédite à l'aide de logiciel²²⁸ sur base de la séquence protéique de liaison à l'ARN de G3BP et de la séquence nucléotidique et la structure tridimensionnelle des ARN. Cependant, G3BP1/2 présentent une multitude de rôles en fonction du contexte ; cela dépend évidemment d'un côté de leur interactome protéique et des protéines exprimées dans la cellule et d'un autre côté des ARNm exprimés. En effet, G3BP1 et G3BP2 présentent des régions dites intrinsèquement désordonnées, rendant la détermination de la conformation et des interactions moins prédictibles.

En conclusion, nous avons identifié des interactions protéiques de G3BP1/2 qui leur suggèrent un rôle dans le contrôle de la traduction, qui pourrait être différent entre les cellules acinaires et les cellules des PanIN. Cependant, il est difficile à ce stade-ci d'identifier les ARNm liés et régulés par G3BP1/2 sur base de la séquence des ARNm, de la littérature et des expériences. Il est donc essentiel de déterminer les ARNm liées à G3BP1/2 de manière empirique.

Pour identifier les ARNm liés à G3BP1/2, une expérience d'immunoprécipitation suivie d'un RNA-seq (RIP) avait été envisagée lors de la conception du projet. Cependant, en raison des défis associés à l'extraction d'ARN de haute qualité à partir d'un complexe protéique exprimé dans le pancréas, il n'a pas été possible à ce jour d'identifier des ARNm par cette voie. Des alternatives peuvent être proposées comme STAMP-seq²²⁹, TRIBE²³⁰ et DART-seq²³¹. Par exemple, STAMP-seq correspond pour les ARN à ce que BioID représente pour les protéines ; dans cette approche, la protéine d'intérêt est fusionnée à l'enzyme ABOBEC1, ce qui induit une modification détectable par RNA-seq sur les ARN localisés à proximité de la protéine d'intérêt. Par conséquent, un modèle murin transgénique exprimant la protéine de fusion sous la dépendance du promoteur de l'élastase évite toute isolation par FACS des cellules d'intérêt. Ainsi, cela réduit le nombre d'étapes entre la lyse du pancréas et le séquençage d'ARN et doit permettre d'améliorer la qualité des ARNm extraits.

Les expériences de polysome profiling sur les cellules acinaires et les PanIN ont montré les difficultés à extraire des complexes ribonucléoprotéiques intacts de ces cellules. Pour contourner ces difficultés,

une alternative serait de marquer spécifiquement les ribosomes *in vivo* dans les cellules d'intérêt. Cette approche consiste à exprimer une protéine ribosomique étiquetée par l'hémagglutinine A (HA) dans un type cellulaire cible, puis à utiliser des anticorps dirigés contre HA pour purifier les polysomes et les ARNm associés de la cellule cible²³².

V. Modèles cellulaires et murins de tumorigenèse pancréatique

L'utilisation de modèles cellulaires et murins de tumorigenèse pancréatique occupe une place cruciale dans la recherche biomédicale. Cette approche est privilégiée par rapport aux essais sur l'humain, tant d'un point de vue éthique que scientifique. Ces modèles permettent une compréhension des mécanismes sous-jacents aux processus tumoraux, tout en limitant les risques et les implications éthiques associés aux expérimentations humaines.

Les modèles *in vitro* permettent une manipulation précise des conditions expérimentales, une modification aisée de l'expression de gènes et une observation rapide des réponses cellulaires aux stimuli ou à ces modifications. Au laboratoire, nous disposons de lignées tumorales du PDAC provenant de cancers humains telles que les cellules Panc-1 ou de souris $\text{ElaCre}^{\text{ER}} \text{LSL-KRas}^{\text{G12D/+}} \text{LSL-Trp53}^{\text{R172H/+}}$, également appelées cellules KPE. Cependant, l'utilisation de ces cellules n'a pas été privilégiée pour décrire l'évolution de la synthèse protéique lors de la tumorigenèse pancréatique. En effet, nous avons étudié les stades plus précoces de formation des PanIN. De plus, la comparaison de cellules en culture avec des cellules acinaires normales n'est pas pertinente. Elles seraient néanmoins intéressantes à utiliser pour étudier les mécanismes par lesquelles G3BP1 et G3BP2 contribuent à la tumorigenèse pancréatique, si nous pouvions confirmer l'interaction de G3BP1 avec G3BP2, CAPRIN1 et USP10, dans ces cellules. Un des désavantages est la présence dans ces cellules de la mutation dans *Trp53*. Par contre, une déplétion par CRISPR-Cas9 de G3BP1 et de G3BP2 dans les cellules KPE faciliteraient la

réalisation des expériences de polysome profiling, de protéomique et de RIP-seq, en fournissant un contrôle négatif intéressant.

Les modèles murins représentent une étape supplémentaire dans la compréhension des processus tumoraux. Ces modèles *in vivo* reproduisent plus fidèlement la complexité des interactions cellulaires et tissulaires au sein d'un organisme vivant. Ils offrent également la possibilité d'évaluer l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques dans un contexte plus proche de la réalité clinique. Dans le cadre du projet de thèse, nous avons à disposition les souris génétiquement modifiées et les greffes orthotopiques de cellules KPE. Le modèle Elastase-CreER LSL Kras^{G12D/+} sert de fondement majeur à notre étude car les lésions PanIN développées dans ce modèle correspondent aux lésions observées chez l'humain⁷⁰.

Un troisième modèle potentiellement exploitable dans le cadre de cette thèse est la culture de cellules acinaires de pancréas sain murin. Cette approche est donc considérée comme un modèle *ex vivo* et offre l'avantage de mimer la métaplasie acino-canalaire, un événement initiateur dans la formation des PanIN à partir de cellules acinaires. En effet, les cellules acinaires se métaplasient spontanément lors de leur mise en culture²³³. Sur base de ce modèle *ex vivo*, nous avons observé une diminution de l'incorporation de puromycine, indicatrice du niveau de synthèse protéique, au cours de la métaplasie (donnée non présentée). Ce résultat contraste avec nos données indiquant une diminution de la phosphorylation du facteur eif2 α (donnée non présentée). En effet, la diminution de l'incorporation de puromycine suggère une diminution de la traduction au cours de la métaplasie tandis que la phosphorylation d'eif2 α est associée à une augmentation de la traduction. Par conséquent, ce modèle ne reproduit pas les modifications liées à la synthèse protéique obtenue avec le modèle murin de tumorigenèse pancréatique. Nous proposons que la différence sur le contrôle de la synthèse protéique dans le modèle *ex vivo* soit liée à l'absence de modifications génétiques transformant les cellules.

L'utilisation de modèles et de techniques expérimentales permet in fine la compréhension et la meilleure prise en charge de pathologies, car les méthodes employées rendent visibles l'invisibilité des

mécanismes biologiques via des outils d'amplification des signaux. Toutefois, il est essentiel de reconnaître les pièges potentiels qui peuvent conduire à des erreurs d'interprétation. Par exemple, l'utilisation d'anticorps couplés à un fluorochrome permet de rendre une protéine visible grâce à nos instruments. Cependant, rien ne nous prouve sans une validation de qualité que l'anticorps reconnaisse bien sa cible de façon spécifique. Dans cette optique, je suggérerais la création d'un comité de scientifiques indépendants de toute affiliation commerciale, en vue d'élaborer un cahier de charges que les entreprises devraient remplir avant la commercialisation de leur anticorps, dans lequel, par exemple, la validation d'un anticorps serait supportée par des données de sous- ou surexpression de la protéine ciblée.

VI. Rôles de G3BP1 et de G3BP2 dans le contrôle de la synthèse protéique des cellules métaplasiques

Les protéines G3BP1 et G3BP2 pourraient participer à l'augmentation de la synthèse des protéines ribosomales dans l'initiation tumorale du pancréas. En effet, nous avons mis en évidence la co-immunoprécipitation de G3BP1 et de G3BP2 avec LARP1B, un membre de la famille de LARP1, uniquement lors de l'initiation tumorale pancréatique. La protéine LARP1 régulée par mTORC1 est impliquée dans la synthèse des protéines ribosomales. Par conséquent, des investigations supplémentaires pourraient être intéressantes pour déterminer le rôle de G3BP1 et de G3BP2 dans la synthèse des protéines ribosomales et potentiellement dans l'initiation tumorale pancréatique.

VII. Rôles de G3BP1 et de G3BP2 dans le transport nucléaire des cellules acinaires

Le transport nucléaire est le mécanisme par lequel des ARNm et des protéines sont transférées du noyau au cytoplasme des cellules et vice-versa. Ce transport s'effectue au travers des pores nucléaires qui sont des canaux composés de nucléoporines (NUP) à travers la double enveloppe membranaire du noyau.

Le transport à travers ces pores nucléaires est dit passif lorsque les molécules sont suffisamment petites. En revanche, les macromolécules ne peuvent pas directement franchir les pores. Leur transport nécessite l'intervention de karyophérines, appelées importines lors d'un transport du cytoplasme vers le noyau et exportine du noyau vers le cytoplasme.

La nucléoporine 214 (NUP214) et l'importine nommée transportine-1 (TNPO1) sont deux protéines localisées au niveau de la membrane nucléaire et impliquées dans le transport de protéines entre le cytoplasme et le noyau. NUP214 est localisée dans la partie cytoplasmique des pores nucléaires et sert d'ancrage pour des protéines impliquées dans l'import nucléaire. TNPO1 régule les déplacements des protéines entre le cytoplasme et le noyau. En faisant partie de la famille des importines, sa principale fonction est de reconnaître spécifiquement les séquences de signal nucléaire (NLS) présentes sur les protéines et de favoriser leur transport dans le noyau.

Nos données montrent un enrichissement d'expression de G3BP1 et de G3BP2 autour du noyau des cellules acinaires du pancréas. D'une façon intéressante, l'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse a révélé, dans un pancréas sain, l'interaction de G3BP1 et de G3BP2 avec la NUP214 et TNPO1, contrairement à un pancréas inflammé.

La localisation de G3BP1 et de G3BP2 autour du noyau des cellules acinaires et leur interaction avec des composants du transport nucléaire sont renforcées par la mise évidence de l'interaction du domaine NTF2-like (nuclear transport factor 2-like) de G3BP1/2 avec le site de liaison FxFG (séquences répétées de phénylalanines et de glycines) présent dans certaines nucléoporines comme la NUP214¹⁶².

La localisation périnucléaire de G3BP1 et de G3BP2 est une particularité unique car elle n'a pas été mise en évidence dans d'autres tissus sains et dans les modèles de culture de cellules *in vitro*. Cet enrichissement semble disparaître au cours de l'initiation tumorale pancréatique.

Par conséquent, les protéines G3BP1/2 pourraient jouer un rôle dans le transport nucléaire des cellules acinaires du pancréas ; elles pourraient favoriser l'import de protéines reconnues par TNPO1 du côté cytoplasmique du pore.

Au cours de la tumorigenèse pancréatique, nos données actuelles indiquant une localisation cytoplasmique de G3BP1/2 et une absence d'interaction de G3BP1/2 avec NUP214 et TNPO1 ne permettent pas de mettre en évidence une perte de la fonction de TNPO1 et NUP214 et donc un défaut du transport nucléaire.

VIII. Perspectives de traitements du PDAC ciblant G3BP1 et G3BP2

Le PDAC est un cancer mortel pour lequel il n'existe actuellement que très peu d'options thérapeutiques. Comme il s'agit d'un cancer présentant une grande hétérogénéité cellulaire et moléculaire, avec diverses voies de signalisation altérées, il est essentiel de comprendre les mécanismes de ces altérations pour ouvrir la voie à de nouvelles thérapies.

Nous avons prouvé que la délétion conditionnelle de G3BP1 et de G3BP2 dans les cellules acinaires réduit la formation de lésions précancéreuses dans le pancréas. Par conséquent, l'évaluation d'un traitement ciblant G3BP1 et G3BP2 est encouragée par cette étude. Si le traitement fonctionne sur des modèles murins plus avancés de PDAC et sur des lésions déjà établies avant le traitement, une étude clinique chez l'homme serait suggérée.

L'identification du mécanisme par lequel G3BP1 et G3BP2 contribuent à l'initiation tumorale pancréatique est essentiel pour choisir les inhibiteurs de leur activité. Actuellement, les données disponibles ne permettent pas encore de déterminer les domaines de G3BP1 et de G3BP2 à cibler. Cependant, l'identification de leur interactome protéique dans les pancréas sains et inflammés, réalisée au cours de cette thèse, participe à la compréhension du mécanisme et guidera ainsi la sélection des inhibiteurs.

Toute une série de thérapies ne fonctionnent pas chez les patients atteints de PDAC. Une des raisons suggérées est la présence d'un microenvironnement tumoral bien établi au moment du diagnostic tardif. Par conséquent, nous suggérons une thérapie combinée d'un médicament ciblant G3BP1/2 avec

une autre thérapie ciblant le microenvironnement tumoral dans la prise en charge du PDAC. De plus, nos résultats ne permettent pas encore de déterminer l'efficacité du traitement à des étapes plus avancées de la pathologie PDAC. Par conséquent, il serait intéressant de tester le médicament anti-G3BP dans un premier temps sur le modèle de greffe orthotopique de cellules KPE dans lequel le microenvironnement tumoral n'est pas encore bien établi. Ce modèle offre aussi l'avantage d'évaluer l'efficacité du médicament à des étapes plus avancées du développement du cancer, à un moment où les lésions sont déjà établies. Dans un second temps, le traitement serait testé sur le modèle de souris $\text{ElaCre}^{\text{ER}} \text{LSL-KRas}^{\text{G12D/+}} \text{LSL-Trp53}^{\text{R172H/+}}$ qui est plus représentatif d'un développement du cancer humain car il présente un développement du microenvironnement tumoral bien établi. Dans le cas où l'inhibition de l'activité de G3BP1 et de G3BP2 ne montre d'effet dans ce modèle, le traitement ciblant G3BP1 et G3BP2 devra être combiné avec un médicament ciblant le microenvironnement tumoral.

Par ailleurs, la prévision des effets secondaires d'un traitement ciblant G3BP1 et G3BP2 demeure complexe. D'une part, leur expression protéique est ubiquitaire. D'autre part, les souris déficientes en G3BP2 meurent après leur sevrage avec une pénétrance complète et la déficience en G3BP1 induit une mort des cellules neuronales et une létalité embryonnaire. Cette létalité est liée au rôle de G3BP1 dans l'expression de facteurs de croissance essentiels et soumis à l'empreinte génétique (phénomène épigénétique dans lequel l'expression d'un gène dépend de son origine parentale spécifique)¹⁷⁹ et dans la régulation de la concentration calcique des neurones²³⁴. Cependant, les rôles de ces protéines dans les différents tissus à l'âge adulte ne sont pas établis. Pour appréhender ce rôle, nous pourrions utiliser le modèle de double inactivation conditionnelle que nous avons généré, et déléter l'expression des deux gènes par croisement avec une souche exprimant une CreER sous la dépendance d'un promoteur ubiquiste. Dans le cas où une mortalité est observée après injection de tamoxifène à l'âge adulte, on pourrait en conclure que des thérapies systémiques visant à bloquer l'activité des G3BP ne constitueraient pas une approche thérapeutique appropriée.

Actuellement, aucune étude en phase clinique ciblant G3BP sur des cancers n'a été réalisée et n'est en cours d'après le site <https://clinicaltrials.gov/>. Actuellement, un peptide nommé GAP161 interfère dans l'interaction entre G3BP1 et RasGAP²³⁵. De même, un autre composé biologiquement actif présent dans le thé vert, appelé gallate d'épigallocatechine (EGCG), est connu pour inhiber la prolifération des cancers du poumon en interagissant avec G3BP1, inhibant ensuite Ras et d'autres voies de signalisation en aval, telles que les voies de la MAPK²³⁶. Cependant, l'interaction entre G3BP1 et RasGAP n'a pas été démontrée dans les pancréas inflammés, ce qui réduit l'intérêt de cet inhibiteur pour la prise en charge d'un patient atteint d'un PDAC. Par contre, le peptide GAP159 inhibe l'expression de G3BP1 et de G3BP2²³⁷ et son efficacité pourrait être évaluée dans la tumorigenèse pancréatique. De plus, le resvératrol, un agent anticancéreux bloquant le cancer du pancréas, cible G3BP1 en se liant à son domaine NTF2-like, induisant ainsi l'apoptose par l'activation de p53. En outre, la régulation à la baisse de G3BP1 supprime l'expression de p53 et l'apoptose induites par le resvératrol²²⁰. Enfin, un laboratoire a récemment décrit deux inhibiteurs de G3BP (G3Ia and G3Ib), conçu pour se lier à une poche spécifique du domaine NTF2-like de G3BP1/2. G3Ia et G3Ib semblent agir en antagonisant l'interaction de G3BP1/2 avec leurs partenaires de liaison dans le domaine NTF2-like, tels que CAPRIN1 et USP10²³⁸. Les résultats de notre recherche suggéreraient donc que l'utilisation de ces molécules pourraient avoir un effet sur la formation des PanIN, mais également sur les cellules acinaires.

En fonction des données de notre étude, nous sommes en mesure de formuler quelques recommandations concernant la manière de cibler thérapeutiquement G3BP1 et G3BP2. Nous suggérons que le traitement doit cibler G3BP1 et G3BP2 de façon spécifique. En effet, des compensations d'expression et de fonction sont observées dans les cellules acinaires et dans les PanIN quand l'expression d'un des deux membres est inhibée. Ce futur médicament devrait dès lors cibler une structure fonctionnelle commune à G3BP1 et G3BP2. Celle-ci n'a pas encore été définie, mais pourrait l'être lorsqu'on identifiera de façon précise le mécanisme par lequel les protéines G3BP1 et G3BP2 contrôle la tumorigenèse pancréatique. Ainsi, l'évaluation de l'oncogénicité de mutants de

G3BP1 et G3BP2 perdant des domaines conservés de G3BP1 et de G3BP2 affinerait la région à cibler thérapeutiquement. Par ailleurs, étant donné que l'expression de G3BP1 et de G3BP2 est ubiquitaire, il serait préférable que les médicaments puissent être administrés spécifiquement dans l'organe atteint, à l'aide de capsules spécifiques ou de modifications génétiques induites par CRISPR-Cas9 spécifiquement dans les cellules cancéreuses. Cette dernière possibilité permettrait de modifier la partie de la structure de G3BP1 et de G3BP2 qui favoriserait le cancer, spécifiquement dans les lésions tumorales.

Annexes

I. La N-acétylcystéine réduit les réponses pro-oxydantes et inflammatoires au cours de la pancréatite et de la tumorigenèse du pancréas

Dans l'article intitulé « *N-Acetylcysteine reduces the pro-oxidant and inflammatory responses during pancreatitis and pancreas tumorigenesis* », j'ai contribué à la réalisation des expériences et à la collecte des données pour la révision du manuscrit. Les données issues de la révision représentent la majorité des figures présentes dans l'article.



Article

N-Acetylcysteine Reduces the Pro-Oxidant and Inflammatory Responses during Pancreatitis and Pancreas Tumorigenesis

Marie-Albane Minati , Maxime Libert, Hajar Dahou, Patrick Jacquemin * and Mohamad Assi *

Liver and Pancreas Differentiation (LPAD) Group, de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium; marie-albane.minati@uclouvain.be (M.-A.M.); maxime.l.libert@uclouvain.be (M.L.); hajar.dahou@uclouvain.be (H.D.)

* Correspondence: patrick.jacquemin@uclouvain.be (P.J.); m.assi@uclouvain.be (M.A.); Tel.: +32-2764-75-31 (P.J. & M.A.)



Citation: Minati, M.-A.; Libert, M.; Dahou, H.; Jacquemin, P.; Assi, M. N-Acetylcysteine Reduces the Pro-Oxidant and Inflammatory Responses during Pancreatitis and Pancreas Tumorigenesis. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1107. <https://doi.org/10.3390/antiox10071107>

Academic Editors: Don-Kyu Kim and Kamalakannan Radhakrishnan

Received: 27 April 2021

Accepted: 7 July 2021

Published: 11 July 2021

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



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

Abstract: Pancreatitis, an inflammation of the pancreas, appears to be a main driver of pancreatic cancer when combined with *Kras* mutations. In this context, the exact redox mechanisms are not clearly elucidated. Herein, we treated mice expressing a *Kras*^{G12D} mutation in pancreatic acinar cells with cerulein to induce acute pancreatitis. In the presence of *Kras*^{G12D}, pancreatitis triggered significantly greater redox unbalance and oxidative damages compared to control mice expressing *wild-type Kras* alleles. Further analyses identified the disruption in glutathione metabolism as the main redox event occurring during pancreatitis. Compared to the *wild-type* background, *Kras*^{G12D}-bearing mice showed a greater responsiveness to treatment with a thiol-containing compound, N-acetylcysteine (NAC). Notably, NAC treatment increased the pancreatic glutathione pool, reduced systemic markers related to pancreatic and liver damages, limited the extent of pancreatic edema and fibrosis as well as reduced systemic and pancreatic oxidative damages. The protective effects of NAC were, at least, partly due to a decrease in the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by acinar cells, which was concomitant with the inhibition of NF- κ B(p65) nuclear translocation. Our data provide a rationale to use thiol-containing compounds as an adjuvant therapy to alleviate the severity of inflammation during pancreatitis and pancreatic tumorigenesis.

Keywords: antioxidants; cancer; edema; inflammation; pancreas

1. Introduction

Acute pancreatitis is defined as a transient and local inflammation of the pancreas characterized by immune cell infiltration and edema [1]. In the absence of appropriate medical care, acute pancreatitis can lead to systemic multiorgan failure and death. The mortality of patients with severe pancreatitis is around 5% [2]. Pancreatitis first affects acinar cells; it causes acinar-to-ductal metaplasia (ADM) and promotes an excessive release of digestive acinar enzymes, which results more widely in pancreatic damage and dysfunction [3]. In the presence of oncogenic mutations in the *Kirsten rat sarcoma (Kras)* gene, pancreatitis has been shown to promote the development of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) from acinar cells [4–6].

Emerging studies confirm the importance of reactive oxygen species (ROS) in PDAC pathophysiology [7,8]. Yet, the precise redox changes driven by pancreatitis during PDAC initiation are still not clearly elucidated. Indeed, multiple studies have characterized the redox alterations occurring during inflammation-induced metabolic dysfunction and pancreatitis in *wild-type* rodents [9–16]; however, there is a lack of information regarding the main redox changes taking place during the initiation of pancreas tumorigenesis (presence of *Kras* mutations). To fill this gap of knowledge in the field, we herein compared mice expressing *Kras wild-type* alleles (control mice) with those expressing acinar-specific mutated *Kras*^{G12D} oncogenic allele. We found that pancreatitis induced greater redox unbalance and oxidative damages during pancreas tumorigenesis in mice bearing *Kras*^{G12D}

mutation. Strikingly, *Kras*^{G12D} mice were more responsive to supplementation with the thiol-rich compound, N-acetylcysteine (NAC), as evidenced by a reduction in inflammation severity and systemic and pancreatic oxidative damages. Therefore, using this comparative approach, our study demonstrates that *Kras*^{G12D} mutation aggravates redox unbalance in the presence of pancreatitis. It also provides a rationale to use thiol-containing compounds as an adjuvant therapy, not only for pancreatitis, but also in the context of pancreatic tumorigenesis.

2. Materials and Methods

2.1. Human Material and Ex Vivo Culture

Pancreata from human heart-beating cadaveric donors were processed by the Beta Cell Bank (Brussels, Belgium) affiliated to the Euro-Transplant Foundation (Leiden, The Netherlands). A full written consent was obtained and the medical ethical committee of the Vrije Universiteit Brussel Hospital approved the use of donor pancreata (ethic approval number: B.U.N. 143201732606). Culture protocol was performed as previously described [17]. This culture spontaneously induces ADM and mimics the molecular mechanisms driven by inflammation. Cells were maintained in 3D suspension culture for 3 days in Advanced RPMI 1640 medium (12633-012, Thermo Fisher, Merelbeke, Belgium) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (F7524, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium), 1% penicillin-streptomycin (15070-063, Life Technologies, Merelbeke, Belgium) and 0.1 mg/mL soybean trypsin inhibitor (17075-029, Life Technologies, Merelbeke, Belgium), at 37 °C and 5% CO₂. On the day of isolation (day 0), 100 µL of cells, corresponding to the normal fraction, was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C, for future protein extraction.

2.2. Mice Models and Treatments

All procedures described were approved by the animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (ethic number: 2017/UCL/MD/020). *Wild-type* (WT) and *ElastaseCreER-LSLKras*^{G12D} (*Ela-Kras*^{G12D}) mice were maintained in a CD1-enriched background; this mouse model allows the expression of a mutated *Kras*^{G12D} allele specifically in acinar cells to study pancreas tumorigenesis process. *ElaCreER* and *LSLKras*^{G12D} mice have been described previously [5,18]; these mice were bred in our animal facility to obtain an *Ela-Kras*^{G12D} background. In select experiments, *ElaCreER* and/or *LSLKras*^{G12D} mice were bred with *LSLRosa*^{yellow fluorescence protein (YFP)/YFP} mice to obtain *ElaCreERYFP/YFP* (*Ela*^{YFP/YFP}) and *ElaCreER-LSLKras*^{G12D; YFP/YFP} (*Ela-Kras*^{G12D; YFP/YFP}) mice; since the Elastase promoter is selectively expressed in pancreatic acinar cells, these mice allow the specific isolation and study of YFP-positive acinar cells. Adult *Ela*^{YFP/YFP}, *Ela-Kras*^{G12D; YFP/YFP} and *Ela-Kras*^{G12D} mice (6-week-old) were first treated with tamoxifen (30 mg/mL in corn oil) by oral gavage (T5648-1G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) and 4-hydroxytamoxifen (0.3 mg/mL in corn oil) by subcutaneous injection (H7904-25mg, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) to recombine the LSL stop cassettes and allow the expression of *Kras*^{G12D} and/or YFP from their respective endogenous locus. To induce acute pancreatitis, WT and *Ela-Kras*^{G12D} mice received intraperitoneal injections of cerulein (100–150 µL in phosphate buffered saline, PBS) (125 µg/kg; 24252, Eurogentec, Seraing, Belgium) for 5 days. We must note that lower amounts of cerulein could be injected depending on the used mouse strain (e.g., Black-6 mice could be injected with 60 µg/kg of cerulein). In addition to cerulein injections, a set of WT and *Ela-Kras*^{G12D} mice received intraperitoneal N-acetylcysteine (NAC) (1 g/kg; A7250-50G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) injections. For transcriptomic analyses on isolated YFP-positive acinar cells, *Ela*^{YFP/YFP} and *Ela-Kras*^{G12D; YFP/YFP} mice received cerulein injections for 3 days (125 µg/kg). Mice were sacrificed at 8 weeks of age by cervical dislocation and tissues were collected for subsequent analyses.

2.3. Ex Vivo Culture of Primary Mouse Acinar Cells

Cultures of dissociated mouse pancreata that mimic ADM were isolated as previously described [19]. This culture spontaneously mimics the molecular mechanism driven by

inflammation. Briefly, pancreata were cut into small pieces and digested with collagenase P (11213865001, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) (0.35 mg/mL of collagenase in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffer, 14025-100, Life Technologies, Merelbeke, Belgium). Collagenase incubation was performed for 15 min at 37 °C with 180 rotations per minute (rpm). The cell suspension was washed three times with HBSS/5% FBS and filtered through 500 µm (43-50500-50, ImTec Diagnostics, Antwerp, Belgium) and 100 µm (CLS431752-50EA, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) strain filters. Finally, cells were dropped gently on a cushion of 30% FBS and centrifuged at 1000 rpm, for 2 min. The day of isolation (day 0) is equivalent to normal pancreas. Metaplasia was induced by maintaining acinar cells in 3D suspension culture, for 3 days, in Advanced RPMI supplemented with 5% FBS, 1% penicillin-streptomycin and 0.1 mg/mL soybean trypsin inhibitor, at 37 °C and 5% CO₂.

2.4. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) in Primary Acinar Cells

Primary mouse acinar cells were isolated as described above and maintained in culture for 1 or 3 days. At the different timepoints, cells were washed with PBS and incubated for 30 min with 5 µM DCFDA probe at 37 °C (ab113851, Abcam, Cambridge, UK). Then, cells were washed once with PBS and pelleted by centrifugation (1200 rpm, 1 min). The pellet was resuspended in 1 mL PBS and cells were distributed in the wells of an opaque 96-well plate. Finally, DCFDA fluorescence was measured using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands) at Excitation/Emission = 485/535 nm.

2.5. Detection of 4-Hydroxynonenal (4-HNE) Adducts by Immunoblot

This analysis was performed as described previously [20,21]. Proteins (50 µg) were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels. After transfer, PVDF membranes (ISEQ00010, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium) were incubated with a reducing solution (100 mM MOPS (M1254-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) and 250 mM sodium borohydride, pH 8 (452882-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium)) for 15 min, at room temperature (RT). Membranes were then washed with ultrapure water and PBS (3 × 5 min). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibody (ab46545, Abcam, Cambridge, UK) in 5% low-fat milk diluted in PBS/0.25% Tween-20 (P2287-500mL, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). The next day, membranes were incubated with the secondary antibodies for 1 h at RT in 5% low-fat milk diluted in PBS/0.25% Tween-20.

2.6. Detection of Protein Carbonyls by Immunoblot

Protein carbonyls analysis was performed as described previously [21]. Briefly, 25 µg of total protein was derivatized with 1% Dinitrophenylhydrazine following manufacturer's instructions (ab178020, Abcam, Cambridge, UK) and then separated by electrophoresis on 12.5% SDS polyacrylamide gels. Proteins were transferred on PVDF membranes, which were incubated with a blocking solution of 1% BSA in PBS/0.05% Tween-20, containing primary antibodies, overnight at 4 °C. The next day, membranes were washed and incubated with secondary antibodies in 5% low-fat milk diluted in PBS/0.05% Tween-20, for 1 h at RT.

2.7. Detection of Protein Expression by Immunoblot

Tissues and cells were lysed in 50 mM Tris-base-HCl, 150 mM NaCl and 1% NP40 (I8896-50ML, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) buffer. Protease and phosphatase (1183615-3001 and 04906837001, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) inhibitors were added just before lysis. Samples were maintained on ice during the procedure. Cell debris were pelleted by centrifugation (14,000 × g, 10 min, at 4 °C). Proteins were quantified using a Bradford assay (23200, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). Samples containing 30 to 50 µg of total proteins were electrophoresed on 7.5% to 12.5% SDS polyacrylamide gels. PVDF membranes were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20. Membranes were incubated overnight with primary antibodies, at 4 °C. The used antibodies are listed in Table 1. The next day, membranes were washed

with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with the secondary antibodies for 1 h, at RT. After incubation, membranes were washed again and revealed using chemiluminescence (kits 34577 and 34094, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). Pictures were taken with a Fusion Solo S machine (Vilber, Collégien, France). Densitometric analysis was performed using the Image Studio Lite Ver 5.2 software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Table 1. Antibodies used in western blot (WB) and immunohistochemistry (IHC) experiments. CST, cell signaling technology; SCB, Santa-Cruz biotechnology.

Antibody	Reference	Dilution	Application
Superoxide dismutase 1 (SOD1)	37385T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	WB
Catalase (CAT)	12980T, CST, Leiden, The Netherlands	1/1000	WB
Sulfiredoxin (SRX)	14273-1-AP, Proteintech, Leon-Rot, Germany	1/500	WB
Xanthine oxidase (XO)	Sc398548, SCB, Heidelberg, Germany	1/500	WB
Mitogenic oxidase 1 (MOX1)	Sc518023, SCB, Heidelberg, Germany	1/500	WB
Peroxiredoxin-I (PRX-I)	NBP1-82558, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA	1/1000	WB
Glutathione peroxidase 1 (GPx1)	AF3798-SP, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA	1/1000	WB
4-Hydroxynonenal (4-HNE)	ab46545, Abcam, Cambridge, UK	1/500	WB
Protein carbonyls	ab178020, Abcam, Cambridge, UK	1/5000	WB
Heat shock cognate (HSC70)	Sc7298, SCB, Heidelberg, Germany	1/2000	WB
Nuclear factor Kappa B(NF- κ B(p65))	8242S, CST, Leiden, The Netherlands	1/100	IHC
Phospho-Extracellular signal-regulated kinase (P-ERK ^{T202/Y204})	9101S, CST, Leiden, The Netherlands	1/100	IHC
CD45	ab10558, Abcam, Cambridge, UK	1/100	IHC

2.8. Measurement of Reduced and Disulfide Glutathione

Fresh pancreata were homogenized and deproteinized in a solution of 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA; S2130-100G, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). After centrifugation (8000 $\times$ g, 10 min), supernatant was diluted with double-deionized water to obtain a 0.5% SSA concentration. Then, reduced glutathione (GSH) and disulfide glutathione (GSSG) were measured according to manufacturer's instructions (38185-1KT, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium). Absorbance developed proportionally to the content of GSH or GSSG and was measured at 405/415 nm using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands).

2.9. Measurement of Myeloperoxidase Activity (MPO)

MPO activity was measured according to the manufacturer's instructions (ab150136, Abcam, Cambridge, UK). Pancreata were homogenized in MPO assay buffer and supernatant was collected after centrifugation (13,000 rpm, 10 min, 4 °C). Then, supernatant was added to a clear-bottom 96-well plate in presence of the MPO substrate and incubated at 25 °C for 30 min. Reaction was then stopped and absorbance measured at 412 nm using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands).

2.10. Determination of TNF- α , Amylase, Aspartate Transaminase (AST) and Alanine Transaminase (ALT) Levels

Cultures of dissociated mouse pancreata, which mimic pancreatitis-induced metaplasia, were isolated as mentioned above. After isolation, acinar cells were treated with PBS (vehicle) or NAC (5 mM) for 3 days from the onset of the culture. After treatment, culture medium was collected for TNF- α ELISA measurements according to manufacturer's instructions (430907, Biolegend, San Diego, CA, USA) [22]. TNF- α levels were also measured by ELISA in pancreas lysates from cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}* mice supplemented with PBS or NAC. Absorbance was proportional to the content of TNF- α and was measured at 450 nm using a microplate reader (GloMax, Promega, Leiden, The Netherlands). Amylase, AST and ALT levels were measured in the plasma of cerulein-treated *wild-type* and *Ela-Kras^{G12D}* mice, supplemented with PBS or NAC, using DRI-CHEM machine (NX500i, Fujifilm, Tokyo, Japan). To obtain plasma, blood was collected using EDTA-coated material

and centrifugated at $1500 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant corresponding to the plasma fraction was then transferred to a new tube and used for measurements.

2.11. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), RNA Extraction and Quantitative PCR

Pancreata of *Ela^{YFP/YFP}* and *Ela-Kras^{G12D}; YFP/YFP* mice were digested using collagenase P (11213865001, Merck Life Science, Overijse, Belgium) (0.6 mg/mL), as previously described [23]. Briefly, an EGTA-buffered solution was injected in the main duct for optimization of pancreas dissociation. Pancreata were digested in calcium (Ca^{2+}) buffer for 15–20 min, at 37 °C. After washing, the cells were filtered through a 35- μm cell strainer and sorted by FACS (FACSARIA™ III cell sorter, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). RNA extraction was performed using a column-based protocol (AM1912, Thermo Fisher, Merelbeke, Belgium) on YFP-positive acinar cells sorted from *Ela^{YFP/YFP}* and *Ela-Kras^{G12D}; YFP/YFP* pancreata treated or not with cerulein for 3 days. Reverse transcription reaction was performed on 150–250 ng of total RNA using the M-MLV reverse transcriptase (M1705, Promega, Leiden, The Netherlands). Quantitative PCR was carried out in a final volume of 10 μL (1 μL neosynthesized cDNA, 2 μL primers 10 μM , 5 μL Sybergreen KAPA mix 2X (KK4601, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium), and 2 μL nuclease-free water) using the CFX96 Real-Time System thermocycler (C1000, Biorad, Temse, Belgium). The expression of target genes was normalized to the ribosomal protein L4 (*Rpl4*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) housekeeping genes. Relative expression was calculated using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. Primers used in the study are listed in Table 2.

Table 2. PCR primers used in the present study.

Gene	Accession Number	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Species
Glutathione peroxidase 1 (<i>Gpx1</i>)	14775	AGTCCACCGTGTATGCCTTC	GTGTCCGAAGTATTGCACG	<i>Mus musculus</i>
Superoxide dismutase 1 (<i>Sod1</i>)	20655	GGAAACCATCCACTTCGAGCA	CTGCACTGGTACAGCCTTGT	<i>Mus musculus</i>
Catalase (<i>Cat</i>)	12359	CTCGCAGAGACCTGTATGTC	TGTGGAGAATCGAACGGCAA	<i>Mus musculus</i>
Thioredoxin 1 (<i>Txn1</i>)	22166	AAGCTTGTCTGGTGGACTT	AACCTCCCACTTTTGACC	<i>Mus musculus</i>
Thioredoxin-interacting protein (<i>Txnip</i>)	56338	CCTAGTGATTGGCAGCAGGT	GAGAGTCGTCCACATCGTCC	<i>Mus musculus</i>
Thioredoxin reductase 1 (<i>Txnrd1</i>)	50493	AGAGCTGGTGGTTTCACTTC	TTTTTGTTCGGCTTCAGGGCT	<i>Mus musculus</i>
Sulfiredoxin (<i>Srxn1</i>)	76650	GTACCAATCGCCGTGCTCAT	CTCAGCAGCTTGGCAGGAAT	<i>Mus musculus</i>
Tumor necrosis factor- α (<i>TNF-α</i>)	21926	GTGACAAGCCTGTAGCCAC	ACAAGGTACAACCCATCGGC	<i>Mus musculus</i>
Interleukine 6 (<i>IL6</i>)	16193	TGTTCTCTGGGAAATCGTGG	AGCATTGGAATTTGGGGTAGGA	<i>Mus musculus</i>
Interleukine 1- α (<i>IL1-α</i>)	16175	CGCTTGAGTCGGCAAAGAAA	CTGATACTGTACCCGGCTC	<i>Mus musculus</i>
Interleukine 1- β (<i>IL1-β</i>)	16176	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG	AAGGTCCACGGGAAAGACAC	<i>Mus musculus</i>
Nitric oxide synthase 2 (<i>Nos2</i>)	18126	TGAAACTTCTCAGCCACCTTGG	AGAGAACTTCCAGGGGCAAG	<i>Mus musculus</i>
C-C motif chemokine ligand 2 (<i>Ccl2</i>)	20296	CTGTGCTGACCCCAAGAAGG	AAGACCTTAGGCGAGATGACG	<i>Mus musculus</i>
Amylase (<i>Amy2a5</i>)	109959	GTGGTCAATGGTCAGCCTTT	TTGCCATCGACCTTATCTCC	<i>Mus musculus</i>
Chymotrypsin (<i>Ctrc</i>)	76701	GGATGACACTTGGAGGCACA	CGATGTCGTTCCACAGCAGA	<i>Mus musculus</i>
Ribosomal protein L4 (<i>Rpl4</i>)	67891	CGCAACATCCCTGGTATTACT	TGTGCATGGGAGGTTATAGT	<i>Mus musculus</i>
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	14433	GGTCTCAGTGTAGCCCAAG	AATGTGTCCGTCGTGGATCT	<i>Mus musculus</i>

2.12. Bulk RNA-Sequencing and Bioinformatics

The RNA Integrity Number (RIN) of total extracted RNA was measured using Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Samples with a $\text{RIN} \geq 7$ were selected for RNA-SEQ experiments, which were performed by the Novogene Company. Sequencing libraries were generated using the rRNA-depleted RNA by NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (E7420L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) following manufacturer's recommendations. Briefly, fragmentation was carried out using divalent cations under elevated temperature in NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer (E7525L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). First strand cDNA was synthesized using random hexamer primer and M-MuLV Reverse Transcriptase (M0253L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Second strand cDNA synthesis was subsequently performed using DNA polymerase I and RNase H. In the reaction buffer, dNTP with dUTP replacing dTTP were used. Then, NEBNext adaptors (E7335L, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) with hairpin loop structure were ligated to the adenylated 3' ends of DNA fragments. The cDNA fragments of preferentially 150–200 bp in length were purified using AMPure XP system (Beckman Coulter, Brea, CA,

USA). Library preparations were sequenced on an Illumina HiSeq platform and paired-end reads were generated.

For data analysis, clean data (clean reads) were obtained by removing reads containing adapter, reads containing poly-N, and low-quality reads from the raw data. All the downstream analyses were based on clean data of high quality. Reference genome and gene model annotation files were directly downloaded from the genome website. Index of the reference genome was built using Bowtie v2.0.6 [24,25] and paired-end clean reads were aligned to the reference genome using TopHat v2.0.9 [26]. Then, Cuffdiff (v2.1.1) was used to calculate fragments per kilo-base of exon per million fragments mapped (FPKMs) of coding genes in each sample [27]. KOBAS software was used to test the statistical enrichment of differentially expressed genes in KEGG pathways [28]. RNA-SEQ data can be downloaded using the following accession numbers: GSE163254 and GSE163263 [29].

2.13. Histology and Immunohistochemistry

Dissected pancreata were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; HT501128-4L, Sigma Aldrich, Overijse, Belgium) for 4 h at 4 °C, before paraffin embedding. Sections of 6 µm were deparaffinized and antigen retrieval was performed using citrate (pH 6.0) or Tris-EDTA (pH 9.0) buffer in Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium). After permeabilization with PBS/0.3% Triton-100X (3051.4, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 5 min, sections were blocked with solution 1 (3% low-fat milk, 5% BSA, 0.3% Triton-100X in PBS) for 45 min, at RT. Primary antibodies (Table 1) diluted in solution 1 were added and incubated overnight, at 4 °C. The next day, slides were washed with PBS/0.1% Triton-100X and incubated with secondary antibodies diluted in solution 2 (10% BSA, 0.3% Triton-100X) at 37 °C, for 1 h, before DAB staining (ab64238, Abcam, UK, Cambridge). Pictures were selected after scanning on Pannoramic P250 Flash III (3DHitech, Budapest, Hungary). Edematous areas were measured on hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections (measurements were performed on the whole pancreas area) using the CaseViewer software (3DHitech, Budapest, Hungary). The quantification of CD45, NF-κB(p65) and P-ERK^{T202/Y204} staining was performed on whole pancreas using the HALO software (Indica Labs, Albuquerque, NM, USA).

2.14. Statistical Analysis

Data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Normality and equal variance were checked by applying a combination of four tests: Anderson–Darling test, D’Agostino–Pearson omnibus normality test, Shapiro–Wilk normality test and Kolmogorov–Smirnov normality test. Comparisons between two groups were performed using an unpaired Student’s t-test. Comparisons between three or more groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant effects or interactions were further analyzed by post hoc method. For all statistical analysis, the level of significance was set at $p < 0.05$. A statistical tendency was considered when P -values were $0.05 < p < 0.1$. Analyses were performed using SigmaStat (version 3.1, Systat Software inc., San Jose, CA, USA) and GraphPad Prism (version 8, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). For RNA-SEQ data, DESeq2 R package (Bioconductor), was used to determine significant differential gene expression using a model based on the negative binomial distribution. P values were corrected using the Benjamini and Hochberg’s approach for controlling the false discovery rate (FDR). Genes with a corrected p value < 0.05 were assigned as differentially expressed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Results and Discussion

3.1. Pancreatitis Induces a Greater Pro-Oxidant Response in Mice Bearing Oncogenic *Kras*^{G12D}

To investigate the main pancreatitis-driven redox changes occurring in the presence of either wild-type *Kras* or mutated *Kras*^{G12D} alleles, WT and *Ela-Kras*^{G12D} mice were challenged with cerulein for 5 days to induce pancreatitis (inflammation of the pancreas). We first measured the oxidative damage marker 4-HNE. Interestingly, in total pancreas

lysates, we found increased 4-HNE levels only in cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}*, but not cerulein-treated WT mice (Figure 1A); this increase was also observed in the plasma of cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}* mice compared to their untreated siblings (Figure S1A), indicating that pancreatitis induces both local and systemic oxidative damages, selectively in *Ela-Kras^{G12D}* mice. It is well-known that pancreatitis induces redox unbalance in WT rodents [9–11]. The absence of a significant increase in 4-HNE in our cerulein-treated WT mouse model is not synonymous with the absence of redox alterations; it probably means that a longer period and/or higher doses of cerulein treatment are needed to induce significant oxidative damage level. However, our data undoubtedly show that the oncogenic *Kras^{G12D}* increases the extent of oxidative damages and accelerates the establishment of a pro-oxidant state in the pancreas. Since acinar cells are mainly affected by pancreatitis, we wanted to confirm that the redox changes observed in the total pancreas are also occurring in acinar cells. To do so, we used an ex vivo culture system that mimics the effect of pancreatitis on acinar cells. On day 3 (metaplastic acini), ROS levels were increased three-fold compared to day 1 (non-metaplastic acini) in acinar cultures from *Ela-Kras^{G12D}* pancreata (Figure S1B), indicating the presence of a pro-oxidant response in the whole pancreas and in acinar cells during pancreatic transformation.

In addition, the expression of major redox-sensitive antioxidant and pro-oxidant enzymes was modulated by pancreatitis (Figure 1B and Figure S1C). For example, the expression of peroxiredoxin-I (PRX-I), a major mammalian peroxidase, was similarly increased in cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}* and WT mice compared to their untreated controls, respectively (Figure 1B); however, the expression of sulfiredoxin (SRX) and catalase (CAT) was selectively increased in cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}* animals (Figure 1B). These data suggest enhanced antioxidant defense to buffer the pro-oxidant response induced by pancreatitis in the pancreas. We observed in FACS-sorted acinar cells, from *Ela-Kras^{G12D}* pancreata, an increased expression of numerous antioxidant genes (Figure S2), including *Sulfiredoxin-1* (*Srxn1*), *thioredoxin-1* (*Txn1*) and *thioredoxin reductase 1* (*Txnrd1*), thus confirming that similar antioxidant defense is also taking place in acinar cells from cerulein-treated pancreata. Altogether, our data show that although pancreatitis promoted subtle redox alterations in WT mice, its combination with *Kras^{G12D}* mutation induced the greatest level of pro-oxidant response and oxidative damages in the pancreas.

3.2. Pancreatitis Modulates the Expression of Glutathione-Regulating Enzymes in Acinar Cells

After mapping the overall redox changes, we aimed to identify the most relevant redox mechanisms occurring in acinar cells during pancreatitis-driven tumorigenesis. We first analyzed the transcriptional landscape of FACS-sorted acinar cells from cerulein-treated and untreated *Ela-Kras^{G12D}* mice and identified an upregulation in the “glutathione metabolism” pathway in response to pancreatitis (Figure 2A). This pathway was also upregulated, but to a lesser extent, in metaplastic acinar cells from cerulein-treated WT mice (Figure 2A). Interestingly, inflammation, cytokine production and pancreatic cancer pathways were all upregulated in the *Ela-Kras^{G12D}* compared to the WT group (data not shown), suggesting that the inflammatory and pro-oxidant responses of pancreatitis are more severe in the former.

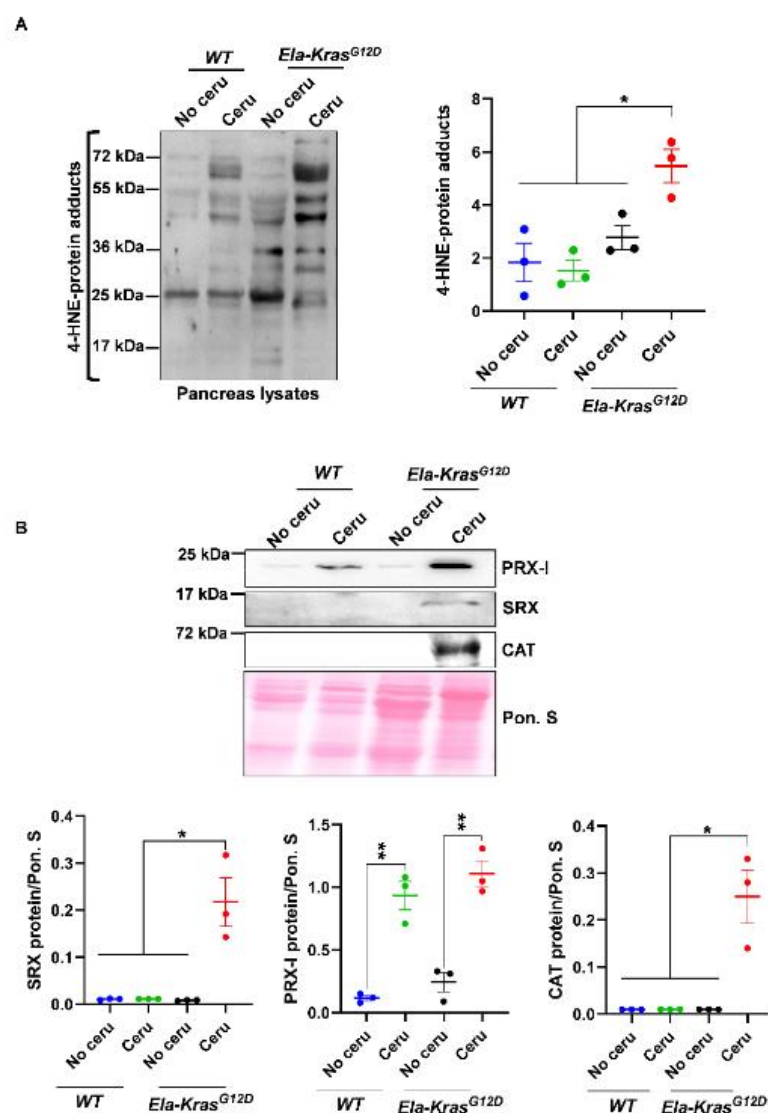


Figure 1. Pancreatitis induces an important pro-oxidant response particularly in *Ela-Kras^{G12D}* mice. (A) Western blot for the oxidative damage marker, 4-HNE, on pancreas lysates of wild-type (WT) and *Ela-Kras^{G12D}* mice treated with cerulein for 5 days ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras^{G12D}*) or untreated ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras^{G12D}*). The corresponding densitometry analysis is also available as a bar graph. (B) Western blot on pancreas lysates of wild-type (WT) and *Ela-Kras^{G12D}* mice treated with cerulein for 5 days ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras^{G12D}*) or untreated ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras^{G12D}*). The analyzed enzymes are Peroxiredoxin-I (PRX-I), Sulfiredoxin (SRX) and Catalase (CAT). The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S staining (Pon. S) is also available as a bar graph. Data are mean ± SEM. Statistical significance for all panels in this figure was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). All quantifications in this figure show biological replicates.

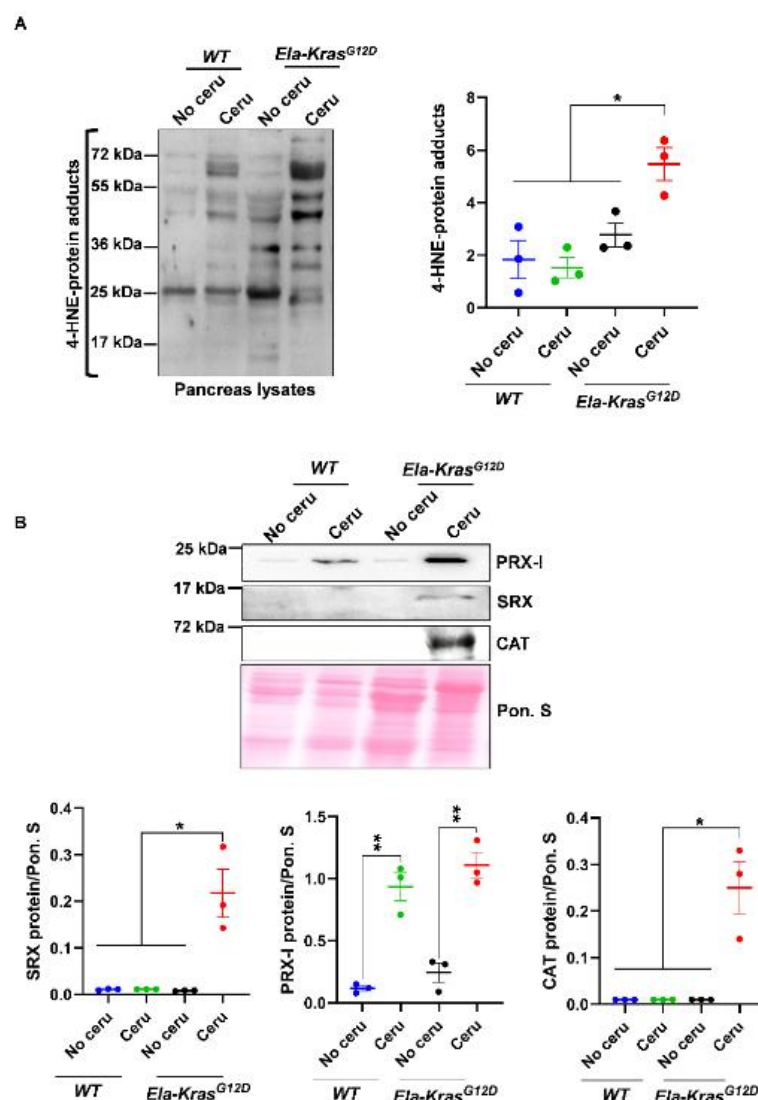


Figure 1. Pancreatitis induces an important pro-oxidant response particularly in *Ela-Kras*^{G12D} mice. (A) Western blot for the oxidative damage marker, 4-HNE, on pancreas lysates of wild-type (WT) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 5 days ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}). The corresponding densitometry analysis is also available as a bar graph. (B) Western blot on pancreas lysates of wild-type (WT) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 5 days ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}). The analyzed enzymes are Peroxiredoxin-I (PRX-I), Sulfiredoxin (SRX) and Catalase (CAT). The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S staining (Pon. S) is also available as a bar graph. Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance for all panels in this figure was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). All quantifications in this figure show biological replicates.

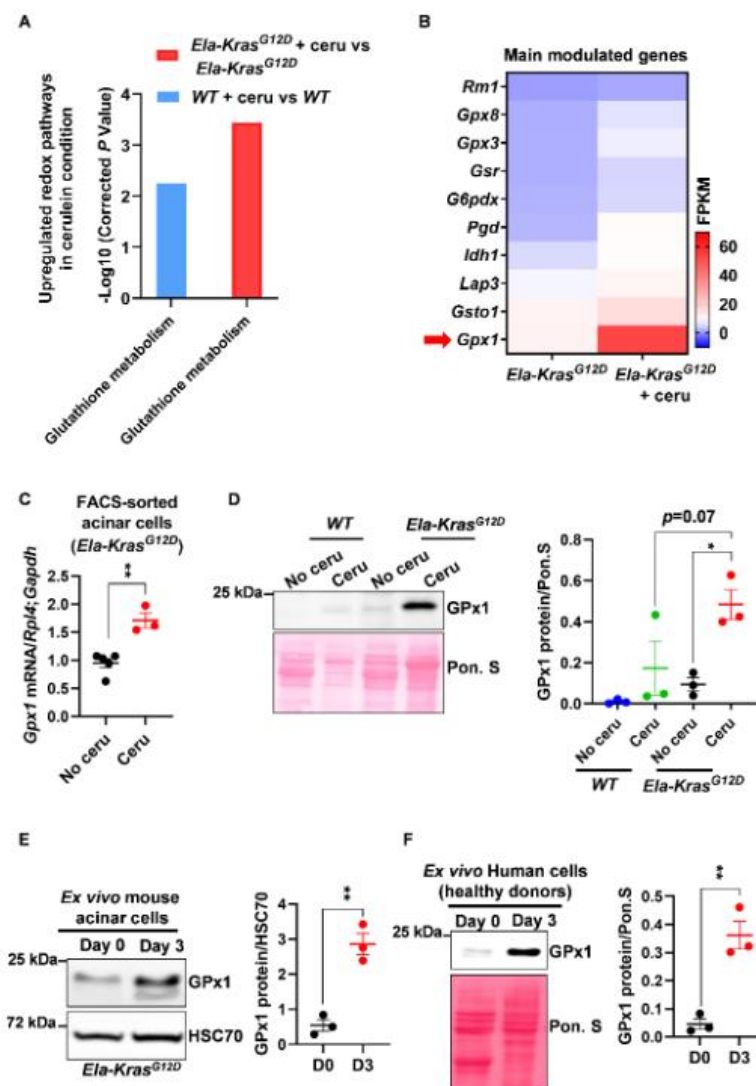


Figure 2. Pancreatitis modulates the expression of glutathione-regulating enzymes in mouse and human pancreatic cells. (A) Upregulated glutathione pathway identified by KEGG analysis in FACS-sorted acinar cells from wild-type (WT) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}). “Glutathione metabolism” is the official term used in the KEGG database; it means that the expression of a set of genes involved in glutathione oxidation and/or reduction is being changed. The corrected P -values were presented as “ $-\text{Log}_{10}$ ” so that when the differential expression is higher, the P -value on graph follows the same tendency. (B) Heatmap for the main genes modulated in the glutathione metabolism pathway in *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days ($n = 3$) or untreated ($n = 3$). Red arrow shows one of the most expressed genes, *GPx1*. (C) Quantitative PCR for glutathione peroxidase 1 (*Gpx1*) on FACS-sorted acinar cells from *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days ($n = 3$) or untreated ($n = 5$). Ribosomal protein L4 (*Rpl4*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) were used as housekeeping genes. (D) Western blot for GPx1 on pancreas lysates of wild-type (WT) and *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 5 days ($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}) or untreated

($n = 3$ for both WT and *Ela-Kras*^{G12D}). The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S (Pon. S) is also available as a bar graph. (E) Western blot for GPx1 in ex vivo cultured acinar cells on day 0 (normal) and 3 (metaplasia); these cells were isolated from *Ela-Kras*^{G12D} pancreata and cultured under conditions mimicking inflammation ($n = 3$). The corresponding densitometry analysis normalized to HSC70 is also available as a bar graph. Three independent cultures from three different mice were tested. (F) Western blot for GPx1 in ex vivo cultured human acinar cells on day 0 (normal) and 3 (metaplasia); these cells were obtained from healthy heart-beating cadaveric donors and cultured under conditions mimicking inflammation ($n = 3$). Three independent cultures from three different donors were tested. Due to the scarcity of human material, we only assessed the expression of GPx1, which is the most relevant redox enzyme for this study. The corresponding densitometry analysis normalized to Ponceau S (Pon. S) is also available as a bar graph. Data are mean $\pm$ SEM. *P*-values for panel A were calculated using a Student's *t*-test and corrected by the Benjamini and Hochberg method. Statistical significance for Panels C, E and F was tested by Student's *t*-test (** $p < 0.01$). Statistical significance for panel D was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$). A statistical tendency was considered when *p*-values were $0.05 < p < 0.1$. All quantifications in this figure show biological replicates.

Among other genes, we observed that the expression of *glutathione peroxidase* (Gpx1) was mostly increased at the mRNA level in FACS-sorted acinar cells from cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to untreated counterparts (Figure 2B,C); glutathione peroxidase (GPx1) plays a critical role in the consumption of intracellular glutathione to buffer pro-oxidative responses. This result was also reproduced at the protein level in total pancreas lysates from cerulein-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice and in specific acinar cultures from the same genetic background (Figure 2D,E). Interestingly, the expression of GPx1 was higher in *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to their WT counterparts (Figure 2D), thus confirming the higher extent of redox changes occurring in the presence of *Kras*^{G12D} mutation. We also observed an increased protein expression of GPx1 in primary human pancreatic cells cultured ex vivo under conditions mimicking inflammation (Figure 2F). As a proof of glutathione metabolism activation, we observed that short-term pancreatitis (1 day of treatment) decreased reduced glutathione (GSH) levels and increased the production of glutathione disulfide (GSSG) in the pancreas of cerulein-treated mice compared to healthy siblings (No cerulein) (Figure S3), highlighting the use of reduced glutathione (GSH) by GPx1 to buffer the pro-oxidant environment induced by pancreatitis [30]. These experiments validate the increase in GPx1 expression at the mRNA and protein levels and suggest that changes in glutathione utilization rates occur during pancreatitis. These experiments also reveal that a similar mechanism may also operate in inflamed human pancreata.

3.3. N-Acetylcysteine Reduces the Severity of Pancreatitis in Wild-Type and *Ela-Kras*^{G12D} Mice

As glutathione is depleted during pancreatitis, we questioned the usefulness of the thiol-containing compound, NAC, on pancreatic redox homeostasis and inflammation severity. Early studies have reported a positive antioxidant effect of NAC during pancreatitis in WT mice and human cells from patients with redox disorders [31–36]. However, the exact impact of NAC on pancreatic inflammation in a *Kras*^{G12D} background is still not clearly elucidated. To induce acute pancreatitis, WT and *Ela-Kras*^{G12D} mice received a 5-day cerulein regimen and were treated with NAC by intraperitoneal injection, as depicted in Figure 3. Acute pancreatitis increased GSSG levels and decreased GSH levels in WT and *Ela-Kras*^{G12D} mice compared to untreated counterparts (no cerulein; Figures 4A and 5A); these effects were more pronounced in *Ela-Kras*^{G12D} animals, which is consistent with the higher level of oxidative damages observed in this background (Figure 1). NAC treatment increased the content of GSH and concomitantly decreased GSSG rates in the pancreata of cerulein-treated WT and *Ela-Kras*^{G12D} mice (Figures 4A and 5A); this is probably due to the direct scavenging of ROS by NAC, thereby sparing the intra-pancreatic GSH pool and/or to the ability of NAC to directly provide cysteine for GSH synthesis [37]. In both WT and *Ela-Kras*^{G12D} groups, the total pancreas weight of NAC-treated mice was significantly

reduced compared to that of cerulein-treated mice (Figures 4B and 5B). Circulating amylase levels, as well as AST and ALT rates, increase during pancreatitis due to pancreas and liver damage, respectively [9]. NAC treatment significantly reduced the circulating levels of amylase, AST and ALT only in cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}*, but not in WT mice; for the latter, a protective tendency was observed for circulating amylase levels without reaching a statistical significance (Figures 4C and 5C). These measurements suggest that NAC reduces zymogen activation in acinar cells and relieves pancreatitis-related liver damage, especially in the *Ela-Kras^{G12D}* background.

Histological analysis showed a better pancreas architecture in NAC-treated groups (Figures S4 and S5). Whole-tissue quantification of H&E-stained sections revealed that NAC treatment decreased edema by two folds in both cerulein-treated WT and *Ela-Kras^{G12D}* mice (Figure 4D,E and Figure 5D,E). Similarly, collagen deposit, stained by Sirius Red, was also reduced by 1.1- and 1.4-fold in response to NAC treatment in cerulein-treated WT and *Ela-Kras^{G12D}* mice, respectively (Figure 4D,E and Figure 5D,E). CD45 is a transmembrane receptor expressed on the majority of immune cells and used as a marker to measure tissular immune cell infiltration. Although NAC did not impact CD45-positive immune cell infiltration (Figure S6A), it significantly reduced oxidative damage markers at the pancreatic (i.e., protein carbonyls) and systemic (i.e., 4-HNE) levels in both WT and *Ela-Kras^{G12D}* backgrounds (Figure 4F, Figure 5F and Figure S6B). Since immune cells are a major source of ROS production during inflammation [38], our results suggest that NAC is correcting redox imbalance by directly scavenging ROS generated by immune cells rather than affecting their infiltration in the pancreas. Accordingly, the activity of myeloperoxidase (MPO), a pro-oxidant enzyme majorly expressed by immune cells, was decreased particularly in *Ela-Kras^{G12D}* pancreata suffering from pancreatitis (Figures 4G and 5G). Our data indicate that NAC alleviates the hallmarks of pancreatitis and related oxidative damages, especially in the *Ela-Kras^{G12D}* genotype.

3.4. N-Acetylcysteine Improves Pancreatitis-Related Inflammation in *Ela-Kras^{G12D}* Mice

Since *Ela-Kras^{G12D}* mice exhibited a higher responsiveness to NAC treatment, we focused on this genetic background to better understand the impact of NAC on pancreatic inflammation during pancreatitis. We returned to the transcriptomic data of FACS-sorted acinar cells from cerulein-treated and untreated *Ela-Kras^{G12D}* mice and found an important upregulation of TNF signaling in response to pancreatitis (Figure 6A). Since TNF- α plays a key role in the formation of edema in the lungs [39–41], we assume that it can exert similar functions in the pancreas. To test our hypothesis, using ELISA, we measured the TNF- α content in pancreas lysates from cerulein-treated *Ela-Kras^{G12D}* mice supplemented with PBS or NAC. Interestingly, in the pancreas, edema levels correlated positively with TNF- α levels (Pearson, $r = 0.93$, $p < 0.05$) and NAC treatment reduced TNF- α rates in the pancreata of *Ela-Kras^{G12D}* mice compared to vehicle-treated counterparts (Figure 6B). Acinar cells actively produce pro-inflammatory cytokines during pancreatitis and pancreas tumorigenesis [21,42]. To check the impact of NAC on acinar-specific TNF- α release, we isolated acinar cells from *Ela-Kras^{G12D}* pancreata and cultured them ex vivo under conditions mimicking inflammation. Strikingly, NAC-treated acinar cells released two-fold less TNF- α in culture media compared to vehicle-treated ones (Figure 6C). Accordingly, the nuclear translocation of NF- κ B(p65), a transcription factor involved in the regulation of cytokines expression [43], was also decreased by two-fold in acinar cells from NAC-treated *Ela-Kras^{G12D}* pancreata (Figure 6D,E). In favor of a transcriptional control for TNF- α expression and release, we found that NAC treatment significantly reduced TNF- α mRNA expression in ex vivo cultured acinar cells from *Ela-Kras^{G12D}* pancreata (Figure S7); the expression of other pro-oxidant and inflammatory genes, including *IL6*, *Ccl2* and *Nos2*, was downregulated in NAC-treated acinar cells compared to vehicle-treated cultures (Figure S7). Finally, the activation of ERK-MAPK, a critical pathway for pancreas carcinogenesis and inflammation, tended to decrease in acinar cells following NAC administration into *Ela-Kras^{G12D}* mice (Figure 6D,E). However, we cannot rule out that NAC may also reduce the

production of TNF- α from immune cells infiltrating the pancreas. Our results indicate that NAC reduces the severity of inflammation during the initiation of pancreas tumorigenesis, at least partly, by decreasing the production of TNF- α from acinar cells.

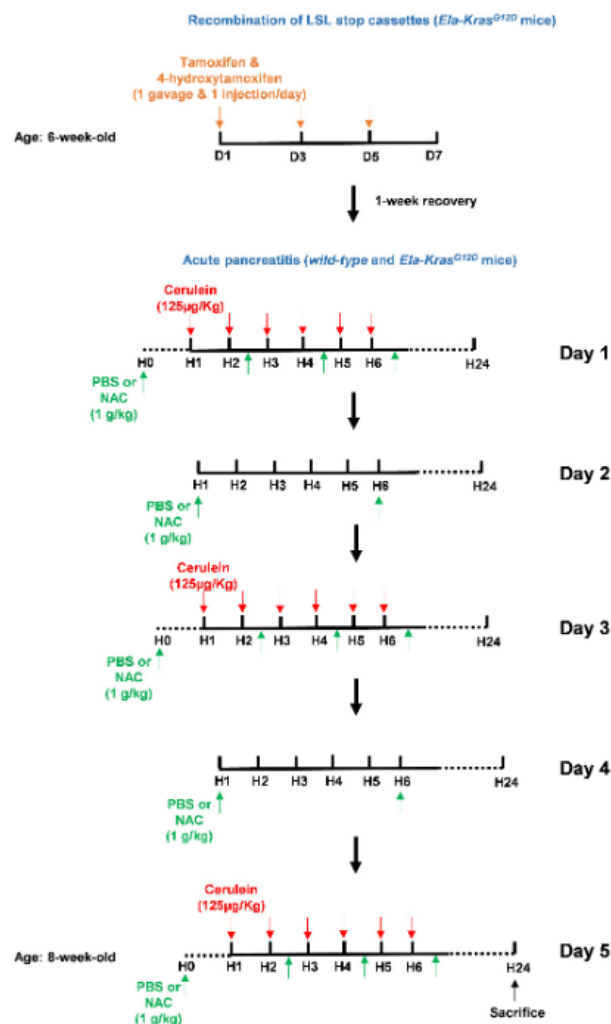


Figure 3. Illustration of the tamoxifen and cerulein regimens as well as NAC treatments. To initiate pancreas tumorigenesis, 6-week-old *Ela-Kras*^{G12D} mice were first treated once a day with tamoxifen (gavage) and 4-hydroxytamoxifen (subcutaneous injection), on day (D) 1, 3 and 5 (orange arrows), to induce recombination of the LSL stop cassette and allow the expression of *Kras*^{G12D} from its endogenous locus. After tamoxifen injections, mice recovered for 1 week. To induce acute pancreatitis, wild-type (WT) or tamoxifen-treated *Ela-Kras*^{G12D} mice started a 5-day acute pancreatitis regimen. On day (D) 1, 3 and 5, mice received 6-daily intraperitoneal cerulein injections (red arrows) at a frequency of 1 injection/h (H). Cerulein diluted in a PBS volume of 100–150 µL was injected at a concentration of 125 µg/kg/injection. On day (D) 1, 3 and 5, mice received 4 intraperitoneal injections of NAC as indicated (green arrows). On day (D) 2 and 4, mice received 2 intraperitoneal injections of NAC as indicated (green arrows). Each NAC dose was 1 g/kg in a volume of 100–150 µL diluted in PBS. For vehicle-treated mice, intraperitoneal injections of 100–150 µL PBS were given instead of NAC. Mice were then sacrificed by cervical dislocation after 24 h.

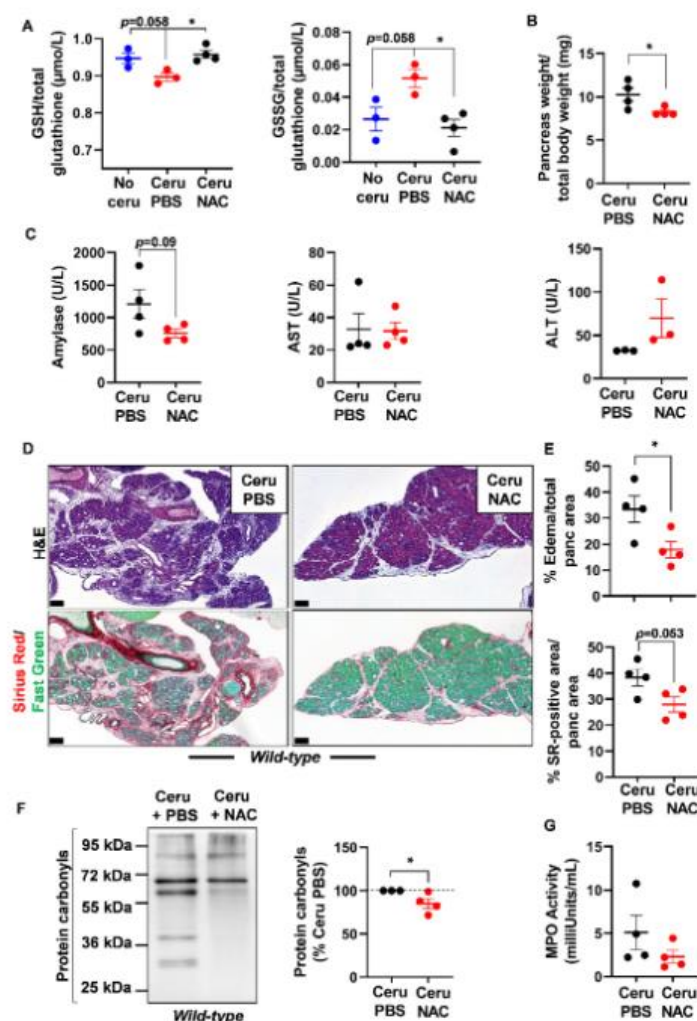


Figure 4. N-acetylcysteine treatment improves acute pancreatitis hallmarks in *wild-type* mice. **(A)** Reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) measurements in pancreas lysates of *wild-type* (WT) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$), cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$) or untreated (No ceru; $n = 3$). **(B)** Pancreas weight normalized to total body weight in *wild-type* (WT) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). **(C)** Measurement of plasma amylase, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels in *wild-type* (WT) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$ –4) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$ –4). **(D)** Hematoxylin and eosin (H&E) staining and Sirius Red (SR) staining on the pancreata of *wild-type* (WT) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$), or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Bars: 100 μm . **(E)** Whole-tissue quantifications for edema and SR-positive areas from panel D. **(F)** Western blot for the oxidative damage marker, protein carbonyls, on pancreas lysates of *wild-type* (WT) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). **(G)** Myeloperoxidase (MPO) activity on pancreas lysates of *wild-type* (WT) mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance for Panel A was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (* $p < 0.05$). Statistical significance for panels

B–G was tested by Student's *t*-test (* $p < 0.05$). Dixon's Q test was applied to remove outlier samples, before conducting statistical analysis. A statistical tendency was considered when p -values were $0.05 < p < 0.1$. All quantifications in this figure show biological replicates.

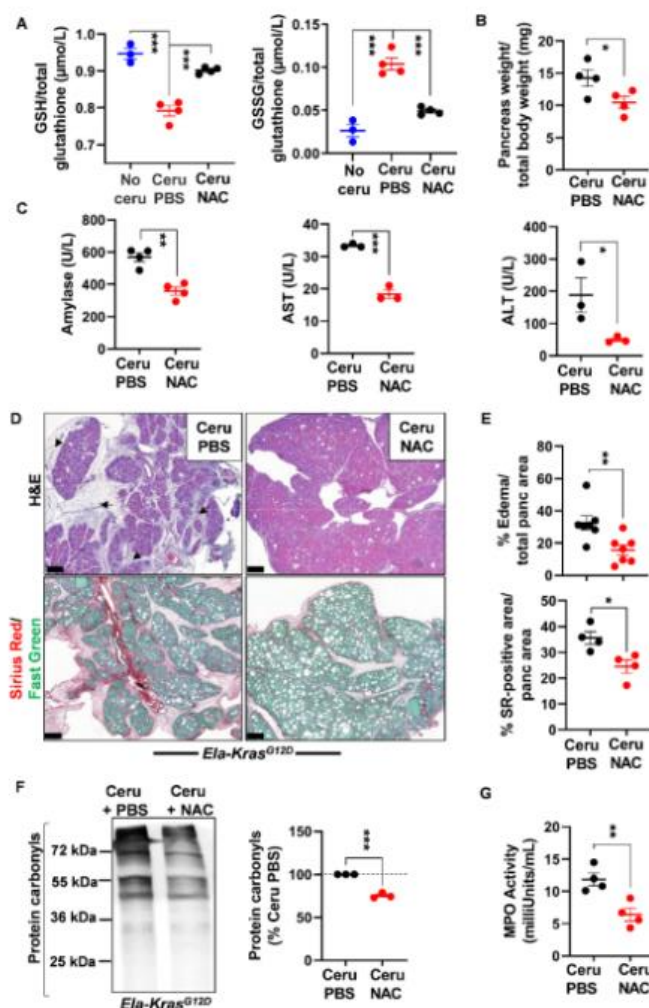


Figure 5. N-acetylcysteine treatment improves acute pancreatitis hallmarks in *Ela-Kras^{G12D}* mice. (A) Reduced glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) measurements in pancreas lysates of *Ela-Kras^{G12D}* mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$), cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$) or untreated (No ceru; $n = 3$). (B) Pancreas weight normalized to total body weight in *Ela-Kras^{G12D}* mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). (C) Measurement of plasma amylase, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels in *Ela-Kras^{G12D}* mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$ –4) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$ –4). (D) Hematoxylin and eosin (H&E) staining and Sirius Red (SR) staining on the pancreata of *Ela-Kras^{G12D}* mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$ –7) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$ –7). Bars: 200 μm. Black arrows show edematous area. (E) Whole-tissue quantifications for edema- and SR-positive areas from panel D. (F) Western blot for the oxidative damage marker, protein carbonyls,

on pancreas lysates of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$). (G) Myeloperoxidase (MPO) activity on pancreas lysates of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 4$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance for Panel A was tested by one-way ANOVA test and further interactions were analyzed by post hoc test (*** $p < 0.001$). Statistical significance for panels B–G was tested by Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Dixon's Q test was applied to remove outlier samples, before conducting statistical analysis. All quantifications in this figure show biological replicates.

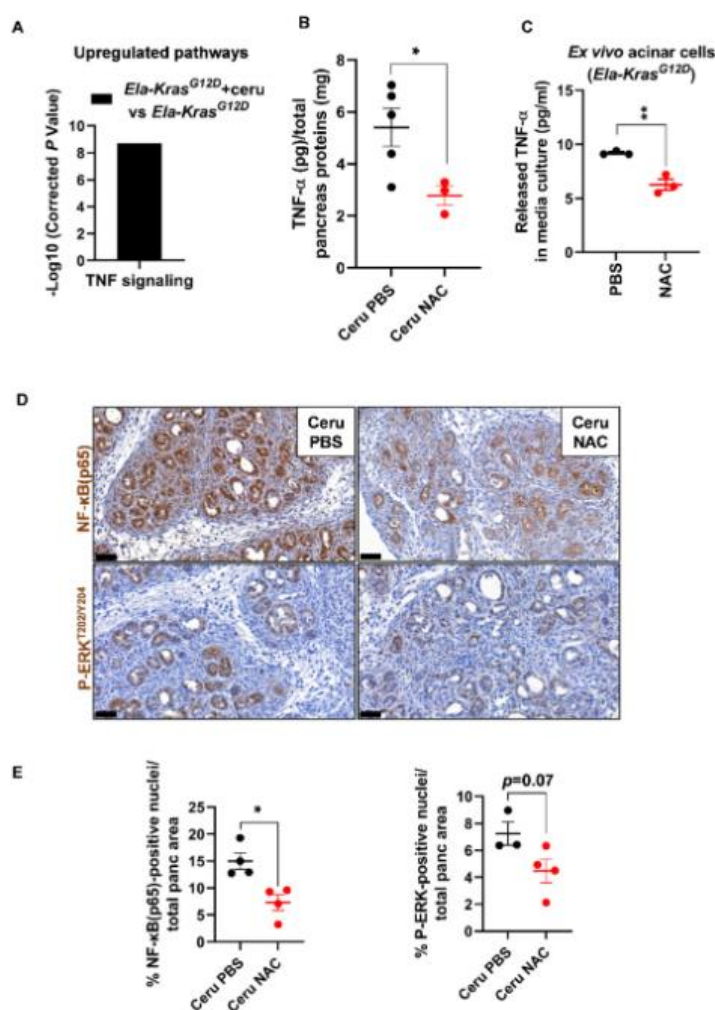


Figure 6. N-acetylcysteine reduces TNF- α production from acinar cells in *Ela-Kras*^{G12D} mice. (A) TNF signaling identified as a major upregulated pathway by KEGG analysis in FACS-sorted acinar cells from *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein for 3 days ($n = 3$). (B) TNF- α protein measurements by ELISA, in pancreas lysates from *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 5$) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 3$). Total pancreas protein concentration was determined by a Bradford assay and used for normalization of TNF- α protein levels. (C) TNF- α protein measurements by ELISA in the culture media of acinar cells isolated from *Ela-Kras*^{G12D} mice

and cultured under conditions mimicking inflammation. Acinar cells were treated with PBS or NAC (5 mM) from the onset of the culture until 3 days later ($n = 3$). Three independent cultures from three different mice were tested. (D) Immunohistochemistry for NF- κ B(p65) and P-ERK^{T202/Y204} on the pancreata of *Ela-Kras*^{G12D} mice treated with cerulein and PBS for 5 days (Ceru PBS; $n = 3$ –4) or cerulein and NAC for 5 days (Ceru NAC; $n = 4$). Bars: 50 μ m. (E) Whole-tissue quantifications for NF- κ B(p65) and P-ERK^{T202/Y204} from panel D. Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance for all panels was tested by Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Dixon's Q test was applied to remove outlier samples, before conducting statistical analysis. A statistical tendency was considered when p -values were $0.05 < p < 0.1$. All quantifications in this figure show biological replicates.

This is the first study comparing the impact of NAC on pancreatitis in mice bearing either *wild-type* or mutated *Kras*^{G12D} alleles. Mutated *Kras*^{G12D} is an essential driver of pancreatic carcinogenesis [4,5]. NAC reproducibly reduced the severity of pancreatitis in both *wild-type* and *Kras*^{G12D}-bearing mice, with a higher efficiency in the later; this better responsiveness is probably due to the higher extent of inflammation and oxidative damages induced by *Kras*^{G12D}, which renders the protective effects of NAC more pronounced and visible. The use of NAC is already approved in the clinics and its prescription to patients suffering from pancreatitis should be safe, with few side-effects. Interestingly, our data suggest that NAC could also be effective in reducing the severity of inflammation during the early tumorigenesis process. However, one limitation of the study is that the main molecular mechanism through which NAC mediates its protective effect is still not clearly elucidated, because NAC impacts a multitude of pathways that renders this identification extremely challenging. Additionally, although thiol-containing compounds were shown to exert anticancer effects on cultured pancreatic cancer cells [44,45], NAC failed to reduce the development of acinar-to-ductal metaplasia and neoplastic lesions in our model of mice bearing *Kras*^{G12D} mutation (data not shown), indicating that it could be used as an adjuvant treatment to relieve inflammation, but not as a therapy for pancreatic cancer.

4. Conclusions

In this paper, we demonstrate that acute pancreatitis induced systemic and pancreatic oxidative damages leading to the activation of an antioxidant defense mechanism in acinar cells, by modulating the expression of redox enzymes. A relevant defense mechanism mobilized by acinar cells was the use of intracellular GSH by GPx1 to neutralize ROS and reduce the oxidative stress response. Providing an extracellular source of thiols by administering NAC to mice increased intracellular GSH pool in the pancreas. NAC also reduced oxidative damages, inflammation hallmarks and pancreatic edema; this was evident especially when pancreatitis and *Kras*^{G12D} mutation were combined. Importantly, the resorption of pancreatic edema is clinically associated with better health outcomes [46]. Edema is a protein-rich fluid that may form plugs and calcify in pancreatic ducts, leading to pressure, duct damages and chronic pain. We therefore consider the use of an edema-eliminating compound such as NAC to be clinically relevant. In addition, NAC treatment seems to be safe without any significant side-effects. It is already prescribed to relieve pulmonary mucus in patients [47] and our study reveals that it could be used similarly to reduce pancreatic edema. However, we do not consider NAC as a complete treatment for pancreatitis or pancreatic cancer, but rather as an adjuvant therapy to alleviate the symptoms of patients suffering from severe pancreatitis or pancreas malignancies. Our study encourages future testing of treatments combining NAC with anti-inflammatory and anticancer drugs in the context of pancreatitis and pancreatic cancer, respectively.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10071107/s1>, Figure S1. Pancreatitis induces a pro-oxidant response in *Ela-Kras*^{G12D} pancreata. Figure S2. Pancreatitis provokes significant redox changes in pancreatic acinar cells. Figure S3. Pancreatitis induces glutathione oxidation in the pancreas. Figure S4. N-acetylcysteine treatment reduces pancreatic edema in *wild-type* pancreata during pancreatitis. Figure S5. N-acetylcysteine treatment reduces pancreatic edema in *Ela-Kras*^{G12D} pancreata during pancreatitis. Figure S6. N-

acetylcysteine treatment reduces systemic oxidative damage in *wild-type* and *Ela-Kras^{G12D}* pancreata during pancreatitis. Figure S7. N-acetylcysteine treatment reduces the expression of pro-oxidant and pro-inflammatory genes in primary acinar cells from *Ela-Kras^{G12D}* pancreata.

Author Contributions: Conceptualization, P.J. and M.A.; methodology, M.-A.M., M.L., H.D. and M.A.; software, M.-A.M. and M.A.; validation, P.J. and M.A.; formal analysis, M.-A.M., P.J. and M.A.; investigation, M.-A.M., M.L., H.D. and M.A.; data curation, M.-A.M. and M.A.; writing—original draft preparation, M.A.; writing—review and editing, M.-A.M., P.J. and M.A.; visualization, M.-A.M., P.J. and M.A.; supervision, P.J. and M.A.; project administration, P.J. and M.A.; funding acquisition, P.J. and M.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Belgian National Fund for Scientific Research. Grant (n°1. B.017.19F) was given to M.A. and grants from the Foundation for Cancer Research (#2018-076) and Télémie (#7.8515.18) were given to P.J. The article processing charges (APC) was funded by the de Duve Institute.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (ethic number: 2017/UCL/MD/020). For human material, the medical ethical committee of the Vrije Universiteit Brussel Hospital approved the use of donor pancreata (ethic approval number: B.U.N. 143201732606).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: RNA-SEQ data can be downloaded from the gene expression omnibus (GEO) database using the following accession numbers: GSE163254 and GSE163263.

Acknowledgments: The authors thank Jean-Nicolas Lodewyckx for technical assistance, Margaux Wulleman for genotyping and providing *Ela-Kras^{G12D}* mice, and Luc Bouwens for providing human pancreas material. M.A.-M. holds a PhD fellowship from Télémie (#7.6509.20). P.J. is senior research associate at the National Fund for Scientific Research, Belgium. M.A. is a research scholar at the National Fund for Scientific Research, Belgium.

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

References

- Habtezion, A.; Gukovskaya, A.S.; Pandol, S.J. Acute Pancreatitis: A Multifaceted Set of Organelle and Cellular Interactions. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1941–1950. [\[CrossRef\]](#)
- Garg, P.K.; Singh, V.P. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 2008–2023. [\[CrossRef\]](#)
- Saluja, A.; Maitra, A. Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1937–1940. [\[CrossRef\]](#)
- Tuveson, D.A.; Shaw, A.T.; Willis, N.A.; Silver, D.P.; Jackson, E.L.; Chang, S.; Mercer, K.L.; Grochow, R.; Hock, H.; Crowley, D.; et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 375–387. [\[CrossRef\]](#)
- Hingorani, S.R.; Petricoin, E.F.; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C.; Jacobetz, M.A.; Ross, S.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D.; Hitt, B.A.; et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **2003**, *4*, 437–450. [\[CrossRef\]](#)
- Guerra, C.; Schuhmacher, A.J.; Canamero, M.; Grippo, P.J.; Verdager, L.; Perez-Gallego, L.; Dubus, P.; Sandgren, E.P.; Barbacid, M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 291–302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chio, I.I.C.; Jafarnejad, S.M.; Ponz-Sarvise, M.; Park, Y.; Rivera, K.; Palm, W.; Wilson, J.; Sangar, V.; Hao, Y.; Ohlund, D.; et al. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 963–976. [\[CrossRef\]](#)
- Cheung, E.C.; DeNicola, G.M.; Nixon, C.; Blyth, K.; Labuschagne, C.F.; Tuveson, D.A.; Vousden, K.H. Dynamic ROS Control by TIGAR Regulates the Initiation and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *37*, 168–182.e4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bansod, S.; Chilvery, S.; Saifi, M.A.; Das, T.J.; Tag, H.; Godugu, C. Borneol protects against cerulein-induced oxidative stress and inflammation in acute pancreatitis mice model. *Environ. Toxicol.* **2021**, *36*, 530–539. [\[CrossRef\]](#)
- Hagar, H.H.; Almubrik, S.A.; Attia, N.M.; Aljasser, S.N. Mesna Alleviates Cerulein-Induced Acute Pancreatitis by Inhibiting the Inflammatory Response and Oxidative Stress in Experimental Rats. *Dig. Dis. Sci.* **2020**, *65*, 3583–3591. [\[CrossRef\]](#)
- Mathan Kumar, M.; Tamizhselvi, R. Protective effect of diallyl disulfide against cerulein-induced acute pancreatitis and associated lung injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *80*, 106136. [\[CrossRef\]](#)

12. Chen, W.; Yuan, C.; Lu, Y.; Zhu, Q.; Ma, X.; Xiao, W.; Gong, W.; Huang, W.; Xia, Q.; Lu, G.; et al. Tanshinone IIA Protects against Acute Pancreatitis in Mice by Inhibiting Oxidative Stress via the Nrf2/ROS Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 5390482. [\[CrossRef\]](#)
13. Huang, C.F.; Yang, C.Y.; Tsai, J.R.; Wu, C.T.; Liu, S.H.; Lan, K.C. Low-dose tributyltin exposure induces an oxidative stress-triggered JNK-related pancreatic beta-cell apoptosis and a reversible hypoinsulinemic hyperglycemia in mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5734. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Urbano, F.; Bugliani, M.; Filippello, A.; Scamporrino, A.; Di Mauro, S.; Di Pino, A.; Scicali, R.; Noto, D.; Rabuazzo, A.M.; Aversa, M.; et al. Atorvastatin but Not Pravastatin Impairs Mitochondrial Function in Human Pancreatic Islets and Rat beta-Cells. Direct Effect of Oxidative Stress. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11863. [\[CrossRef\]](#)
15. Cappelli, A.P.G.; Zoppi, C.C.; Silveira, L.R.; Batista, T.M.; Paula, F.M.; da Silva, P.M.R.; Rafacho, A.; Barbosa-Sampaio, H.C.; Boschero, A.C.; Carneiro, E.M. Reduced glucose-induced insulin secretion in low-protein-fed rats is associated with altered pancreatic islets redox status. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 486–496. [\[CrossRef\]](#)
16. Lee, J.; Lim, J.W.; Kim, H. Lycopene Inhibits Oxidative Stress-Mediated Inflammatory Responses in Ethanol/Palmitoleic Acid-Stimulated Pancreatic Acinar AR42J Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2101. [\[CrossRef\]](#)
17. Houbracken, I.; de Waele, E.; Lardon, J.; Ling, Z.; Heimberg, H.; Rooman, I.; Bouwens, L. Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 731–741.e4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Desai, B.M.; Oliver-Krasinski, J.; De Leon, D.D.; Farzad, C.; Hong, N.; Leach, S.D.; Stoffers, D.A. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 971–977. [\[CrossRef\]](#)
19. Qu, C.; Konieczny, S.F. Pancreatic Acinar Cell 3-Dimensional Culture. *Bio-Protocol* **2013**, *3*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Assi, M.; Derbre, F.; Lefevre-Orfila, L.; Saligaut, D.; Stock, N.; Ropars, M.; Rebillard, A. Maintaining a regular physical activity aggravates intramuscular tumor growth in an orthotopic liposarcoma model. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1037–1053.
21. Buckens, H.; Pirenne, S.; Achouri, Y.; Baldan, J.; Dahou, H.; Bouwens, L.; Lemaigre, F.P.; Jacquemin, P.; Assi, M. Peroxiredoxin-I sustains inflammation during pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
22. Assi, M.; Kenawi, M.; Ropars, M.; Rebillard, A. Interleukin-6, C/EBP-beta and PPAR-gamma expression correlates with intramuscular liposarcoma growth in mice: The impact of voluntary physical activity levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490*, 1026–1032. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Assi, M.; Dauge, N.; Jacquemin, P. DIE-RNA: A Reproducible Strategy for the Digestion of Normal and Injured Pancreas, Isolation of Pancreatic Cells from Genetically Engineered Mouse Models and Extraction of High Quality RNA. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Langmead, B.; Nellore, A. Cloud computing for genomic data analysis and collaboration. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Kim, D.; Pertea, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S.L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R36. [\[CrossRef\]](#)
27. Trapnell, C.; Williams, B.A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M.J.; Salzberg, S.L.; Wold, B.J.; Pachter, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 511–515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Xie, C.; Mao, X.; Huang, J.; Ding, Y.; Wu, J.; Dong, S.; Kong, L.; Gao, G.; Li, C.Y.; Wei, L. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W316–W322. [\[CrossRef\]](#)
29. Assi, M.; Achouri, Y.; Lorient, A.; Dauge, N.; Dahou, H.; Baldan, J.; Libert, M.; Fain, J.S.; Guerra, C.; Bouwens, L.; et al. Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Res.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
30. Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1957–1997. [\[CrossRef\]](#)
31. Sevillano, S.; de Dios, I.; de la Mano, A.M.; Manso, M.A. N-acetylcysteine induces beneficial changes in the acinar cell cycle progression in the course of acute pancreatitis. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 279–289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Sevillano, S.; De la Mano, A.M.; De Dios, I.; Ramudo, L.; Manso, M.A. Major pathological mechanisms of acute pancreatitis are prevented by N-acetylcysteine. *Digestion* **2003**, *68*, 34–40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Sevillano, S.; de la Mano, A.M.; Manso, M.A.; Orfao, A.; De Dios, I. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1639*, 177–184. [\[CrossRef\]](#)
34. Demols, A.; Van Laethem, J.L.; Quertinmont, E.; Legros, F.; Louis, H.; Le Moine, O.; Deviere, J. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. *Pancreas* **2000**, *20*, 161–169. [\[CrossRef\]](#)
35. Esrefoglu, M.; Gul, M.; Ates, B.; Batcioglu, K.; Selimoglu, M.A. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 259–264. [\[CrossRef\]](#)
36. Douiev, L.; Soiferman, D.; Alban, C.; Saada, A. The Effects of Ascorbate, N-Acetylcysteine, and Resveratrol on Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Disorders. *J. Clin. Med.* **2016**, *6*. [\[CrossRef\]](#)

37. Whillier, S.; Raftos, J.E.; Chapman, B.; Kuchel, P.W. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *Redox Rep.* **2009**, *14*, 115–124. [\[CrossRef\]](#)
38. Yang, Y.; Bazhin, A.V.; Werner, J.; Karakhanova, S. Reactive oxygen species in the immune system. *Int. Rev. Immunol.* **2013**, *32*, 249–270. [\[CrossRef\]](#)
39. Dagenais, A.; Frechette, R.; Yamagata, Y.; Yamagata, T.; Carmel, J.F.; Clermont, M.E.; Brochiero, E.; Masse, C.; Berthiaume, Y. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2004**, *286*, L301–L311. [\[CrossRef\]](#)
40. Petrache, I.; Birukova, A.; Ramirez, S.I.; Garcia, J.G.; Verin, A.D. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2003**, *28*, 574–581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Yang, G.; Hamacher, J.; Gorshkov, B.; White, R.; Sridhar, S.; Verin, A.; Chakraborty, T.; Lucas, R. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **2010**, *1*, 29–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Cobo, I.; Martinelli, P.; Flandez, M.; Bakiri, L.; Zhang, M.; Carrillo-de-Santa-Pau, E.; Jia, J.; Sanchez-Arevalo Lobo, V.J.; Megias, D.; Felipe, I.; et al. Transcriptional regulation by NR5A2 links differentiation and inflammation in the pancreas. *Nature* **2018**, *554*, 533–537. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Luo, J.; Xiang, Y.; Xu, X.; Fang, D.; Li, D.; Ni, F.; Zhu, X.; Chen, B.; Zhou, M. High Glucose-Induced ROS Production Stimulates Proliferation of Pancreatic Cancer via Inactivating the JNK Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 6917206. [\[CrossRef\]](#)
45. Karella, D.N.; Kim, S.; K Pandey, M.; Plano, D.; Amin, S.; Lu, J.; Sharma, A.K. Novel Seleno-Aspirinyl Compound AS-10 Induces Apoptosis, G1 Arrest of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells, Inhibits Their NF-kappaB Signaling, and Synergizes with Gemcitabine Cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*. [\[CrossRef\]](#)
46. Yi, S.Y.; Tae, J.H. Pancreatic abscess following scrub typhus associated with multiorgan failure. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 3523–3525. [\[CrossRef\]](#)
47. Qi, Q.; Ailiyaer, Y.; Liu, R.; Zhang, Y.; Li, C.; Liu, M.; Wang, X.; Jing, L.; Li, Y. Effect of N-acetylcysteine on exacerbations of bronchiectasis (BENE): A randomized controlled trial. *Respir. Res.* **2019**, *20*, 73. [\[CrossRef\]](#)

II. La régulation dynamique de l'expression de KRAS et de ses effecteurs détermine la capacité d'initier la tumorigenèse dans les cellules acinaires du pancréas.

Dans l'article intitulé « *Dynamic Regulation of Expression of KRAS and Its Effectors Determines the Ability to Initiate Tumorigenesis in Pancreatic Acinar Cells* », j'ai contribué à la réalisation des expériences en fournissant divers échantillons et à la gestion des données.



Dynamic Regulation of Expression of KRAS and Its Effectors Determines the Ability to Initiate Tumorigenesis in Pancreatic Acinar Cells

Mohamad Assi¹, Younes Achouri¹, Axelle Lorient¹, Nicolas Dauguet¹, Hajar Dahou¹, Jonathan Baldan², Maxime Libert¹, Jean S. Fain¹, Carmen Guerra³, Luc Bouwens², Mariano Barbacid³, Frédéric P. Lemaigre¹, and Patrick Jacquemin¹

ABSTRACT

Pancreatic acinar cells are a cell type of origin for pancreatic cancer that become progressively less sensitive to tumorigenesis induced by oncogenic *Kras* mutations after birth. This sensitivity is increased when *Kras* mutations are combined with pancreatitis. Molecular mechanisms underlying these observations are still largely unknown. To identify these mechanisms, we generated the first CRISPR-edited mouse models that enable detection of wild-type and mutant *KRAS* proteins *in vivo*. Analysis of these mouse models revealed that more than 75% of adult acinar cells are devoid of detectable *KRAS* protein. In the 25% of acinar cells expressing *KRAS* protein, transcriptomic analysis highlighted a slight upregulation of the *RAS* and *MAPK* pathways. However, at the protein level, only marginal pancreatic expression of essential *KRAS* effectors, including C-RAF, was observed. The expression of *KRAS* and its effectors gradually decreased after birth. The low sensitivity

of adult acinar cells to *Kras* mutations resulted from low expression of *KRAS* and its effectors and the subsequent lack of activation of *RAS*/*MAPK* pathways. Pancreatitis triggered expression of *KRAS* and its effectors as well as subsequent activation of downstream signaling; this induction required the activity of *EGFR*. Finally, expression of C-RAF in adult pancreas was required for pancreatic tumorigenesis. In conclusion, our study reveals that control of the expression of *KRAS* and its effectors regulates the sensitivity of acinar cells to transformation by oncogenic *Kras* mutations.

Significance: This study generates new mouse models to study regulation of *KRAS* during pancreatic tumorigenesis and highlights a novel mechanism through which pancreatitis sensitizes acinar cells to *Kras* mutations.

Introduction

The development of genetically engineered mouse models (GEMM) greatly helped to show that *Kras* mutation constitutes a prominent initiating event in pancreatic cancer (1–4). In these GEMM, tumors phenocopied the histologic features of human malignancies. More recently, lineage tracing experiments demonstrated that acinar cells are a cell type of origin of pancreatic cancer (5). Interestingly, adult acinar cells become progressively less sensitive to *Kras* mutations compared with early postnatal acinar cells (6). This sensitivity is increased in the presence of pancreatitis and when mutations of *Kras* and *p53* are combined (6, 7).

During pancreatitis, *Kras*-mutated acinar cells undergo acinar-to-ductal metaplasia (ADM), eventually leading to the formation of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC; ref. 6). However, the mechanisms through which pancreatitis sensitizes acinar cells to mutant *KRAS* remain

largely unexplored. The expression of oncogenic *KRAS* and of *KRAS* signaling effectors at the protein level could be determining, because a high *KRAS*^{G12D} dosage is critical for early human pancreatic tumorigenesis (8). Therefore, we hypothesized that pancreatitis could sensitize acinar cells to *Kras* mutations by modulating an expression program encompassing *KRAS* and possibly essential signaling effectors. Here, using novel mouse models, transcriptomic and biochemical analyses, we provide evidence supporting that pancreatitis induces expression of *KRAS* protein and its key effectors, to enable activation of *KRAS* signaling and initiate tumorigenesis.

Materials and Methods

For additional and detailed Materials and Methods, please see Supplementary Materials and Methods. This section contains information regarding the conditions of tissue staining/labeling (Supplementary Table S1), mouse lines and injection protocols (Supplementary Table S2), conditions of Western blot experiments (Supplementary Table S3), and primers used in this study (Supplementary Table S4).

Generation of CRISPR-edited *Kras*^{Cit/Cit} and *Kras*^{Cit-G12D/+} mouse models

All procedures described previously were approved by the animal welfare committee of the University of Louvain Medical School (Brussels, Belgium; ethic number: 2017/UCL/MD/020). *Kras*^{Cit/Cit} and *Kras*^{Cit-G12D/+} mice were generated to detect expression and localization of *KRAS* and *KRAS*^{G12D} proteins on tissue sections using anti-GFP antibody, as citrine is an improved variant of YFP. Citrine-*KRAS* expression plasmids have been used previously to study *KRAS* biology in cell culture studies (9–11). A targeting construct containing the

¹Université catholique de Louvain, de Duve Institute, Brussels, Belgium.

²Cell Differentiation Laboratory, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium.

³Molecular Oncology Program, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Patrick Jacquemin, Université catholique de Louvain, de Duve Institute, Brussels 1200, Belgium. Phone: 322-764-7531; E-mail: patrick.jacquemin@uclouvain.be

Cancer Res 2021;81:2679–89

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2976

©2021 American Association for Cancer Research.

Citrine cDNA flanked by sequences of the *Kras* locus located on both sides of the ATG start codon (see Fig. 1A) was obtained by PCR using HiFi KAPA (KK2602, Roche). A linker sequence (TCC GGA CTC AGA TCT CGA GCT) was added between the *Citrine* and *Kras* sequences. The *Citrine-Kras* (*Cit-K*) construct, in which the *Citrine* and *Kras* coding sequences are in the same reading frame, was cloned in pcDNA3.1 (+). Selected clones were validated by Sanger sequencing. To generate the *Citrine-Kras^{G12D}* (*Cit-K^{G12D}*)-targeting construct, we performed directed mutagenesis on the previously cloned *Cit-K* sequence according to the manufacturer's instructions (200523, Agilent). Sanger sequencing was performed on selected clones to detect the GGT-to-GAT mutation. The following primers were used for mutagenesis: forward, 5'-GTG GTG GTT GGA GCT GAT GGC GTA GGC AAG AGC-3'; and reverse, 5'-GCT CTT GCC TAC GCC ATC AGC TCC AAC CAC CAC-3'.

CRISPR/Cas9 technology was used to insert the *Cit-K* construct in the *Kras* locus by homologous recombination. *Cit-K*-targeting plasmid (10–20 ng/μL), recombinant Cas9 protein (100 ng/μL; 1081059, Integrated DNA technologies), and annealed specific crRNA/tracrRNA (2.4 pmol/μL, 5'-CTGCTGAAAATGACTGAGTATA-3'; Integrated DNA technologies) were injected in IDTE buffer (11–01–02–02, Integrated DNA technologies) into the male pronucleus of B6D2F2 mouse zygotes using FemtoJet 4i Injector (Eppendorf). Zygotes were transferred into CD1 pseudopregnant females. Correct insertions were detected in the descendants by PCR and sequencing of PCR products. Breeding between heterozygous *Kras^{Cit/+}* mice generated homozygous *Kras^{Cit/Cit}* mice. To generate the *Kras^{Cit-G12D/+}* mouse line, the *Cit-K^{G12D}* construct was inserted within the *LSL-Kras^{G12D}* locus in frame with the *Kras^{G12D}* gene, using CRISPR/Cas9 technology, as described above. *Cit-K^{G12D}*-targeting construct, recombinant Cas9 protein, and annealed specific crRNA/tracrRNA (same sequence than above) were injected into the male pronucleus of *LSL-Kras^{G12D/+}* mouse zygotes. Zygotes were transferred into CD1 pseudopregnant females. Correct insertions were detected in the descendants by PCR and sequencing of PCR products.

Ex vivo culture of dissociated human pancreas

Pancreata from human heart-beating cadaveric donors were processed by the Beta Cell Bank (Brussels, Belgium) affiliated to the Euro-Transplant Foundation (Leiden, the Netherlands). The authors of this manuscript obtained a full written informed consent from donors to authorize the use of pancreata for research purposes. The study was conducted in accordance with the ICH-GCP guideline for good clinical practice. The use of donor pancreata was approved by the medical ethical committee of the Vrije Universiteit Brussel Hospital (Brussels, Belgium; ethic approval number: B.U.N. 143201732606). Culture of the exocrine cell fraction was performed as described previously (12). To induce ADM, cells were cultured for 3 days in Advanced RPMI1640 medium (12633–012, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% FBS (F7524, Sigma Aldrich), 1% penicillin–streptomycin (15070–063, Life Tech) and 0.1 mg/mL soybean trypsin inhibitor (17075–029, Life Tech), at 37°C and 5% CO₂. On the day of isolation (day 0), 100 μL of cells, corresponding to the normal exocrine fraction, were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C, before protein extraction.

IHC and Immunofluorescence

Dissected tissues were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours at 4°C, with gentle rotation, before paraffin embedding. Six-micron-thick sections were first deparaffinized. Then antigen retrieval was performed using citrate (pH 6.0) or Tris-EDTA (pH 9.0) buffers using

microwave (MW), Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific), or pressure cooker (CC; Supplementary Table S1). Sections were washed once with PBS and then permeabilized with PBS/0.3% Triton-100X for 5 minutes, at room temperature. Sections were blocked with solution 1 (3% low-fat milk, 5% BSA, 0.3% Triton-100X in PBS) for 45 minutes, at room temperature. Primary antibodies (Supplementary Table S1) diluted in solution 1 were added and incubated overnight, at 4°C. On the next day, slides were washed with PBS/0.1% Triton-100X and incubated with secondary antibodies diluted in solution 2 (10% BSA, 0.3% Triton-100X) at 37°C, for 1 hour. For IHC, additional incubation with streptavidin–β-peroxidase from horseradish (POD) conjugates at 37°C for 1 hour was performed before DAB staining. Immunofluorescence pictures were taken using Axiovert 200 (Zeiss) or Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope (Zeiss). IHC pictures were selected after scanning performed on Panoramic P250 Flash III (3DHitech). Colocalization analyses and Pearson's coefficient calculations were performed using Zen Software (Zeiss).

Statistical analysis

Data were presented as means ± SEM. Normality and equal variance were checked before conduction of statistical analysis. Comparisons between two groups were performed using an unpaired Student *t* test. Comparison between three or more groups was performed using one-way ANOVA. Significant effects or interactions were further analyzed by Fisher LSD method. For all statistical analysis, the level of significance was set at *P* < 0.05. Analyses were performed using SigmaStat 3.1 and GraphPad Prism 8 softwares. For RNA-sequencing (RNA-seq) data, DESeq2 R package was used to determine significant differential gene expression using a model based on the negative binomial distribution. *P* values were corrected using the Benjamini and Hochberg approach for controlling the FDR. Genes with a corrected *P* < 0.05 were assigned as differentially expressed (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001).

Accession number

The sequencing data discussed in this study have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) database and are accessible through GEO series accession numbers: GSE163039, GSE163254, and GSE163263.

Results

The expression of KRAS is restricted to a small percentage of pancreatic acinar cells

The lack of antibodies enabling to detect KRAS protein on tissue sections severely hampers the characterization of the mechanisms of differential tissue sensitivity to oncogenic *Kras* mutations (13). Therefore, we generated new mouse models in which a *citrine* gene (an improved version of YFP) is fused in frame in the wild-type (WT) *Kras* gene (*Cit-K* allele) or mutated *Kras^{G12D}* gene in *LSL-Kras^{G12D}* mice (*Cit-K^{G12D}* allele; Fig. 1A and B; ref. 4). In these models, the resulting citrine-KRAS (*Cit-K*) and citrine-KRAS^{G12D} (*Cit-K^{G12D}*) fusion proteins are expressed under the control of the regulatory elements of the endogenous *Kras* locus and can be detected using anti-GFP antibody. *Kras^{Cit-G12D/+}* mice were crossed with *Ela^{Cre}* mice, in which the CreER recombinase is specifically expressed in the acinar cells, to obtain *Ela^{Cre} Kras^{Cit-G12D/+}* (*Ela^{Cre} K^{Cit-G12D/+}*) mice. In the latter, acinar expression of *Cit-K^{G12D}* protein is only achieved after tamoxifen injections. We validated these models by showing that *Cit-K* and *Cit-K^{G12D}* are expressed, bind GTP, and localize to the cell membrane, like KRAS

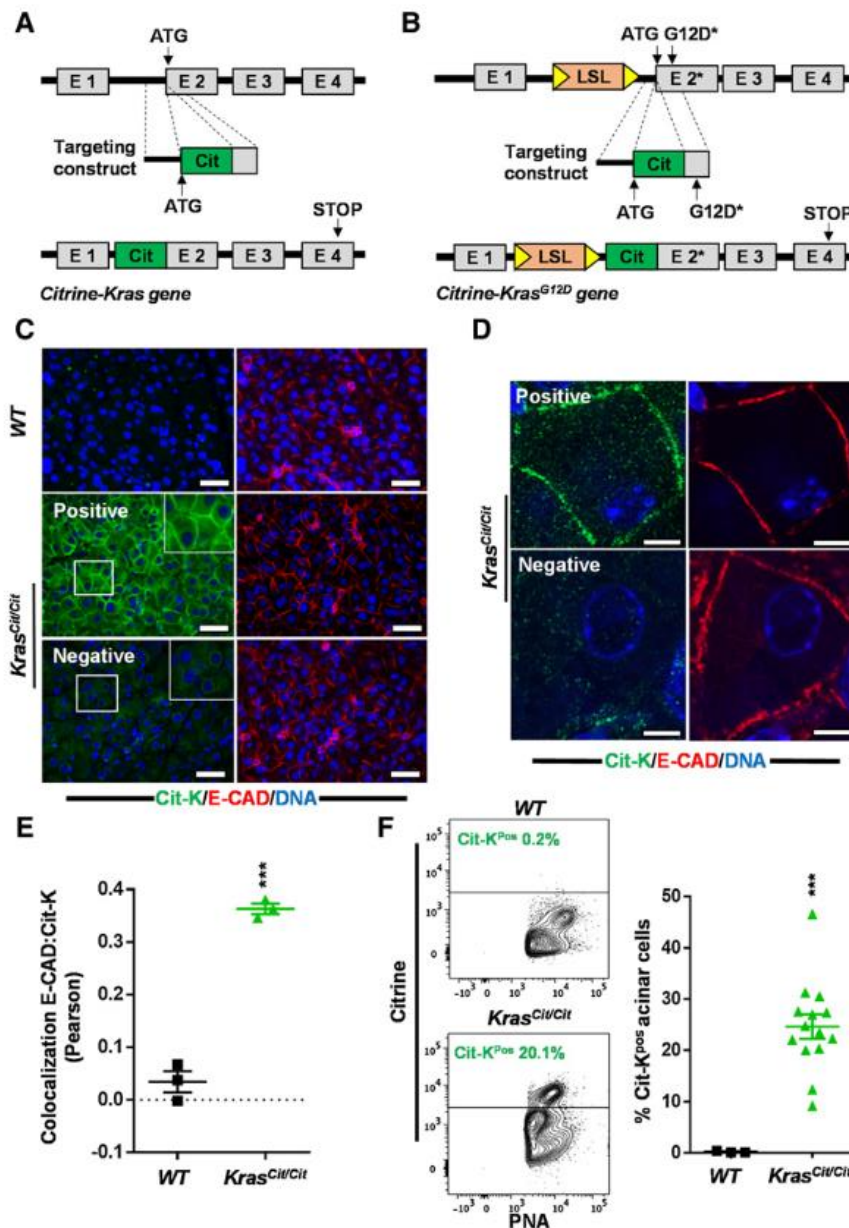


Figure 1. KRAS is expressed at the plasma membrane of a small fraction of pancreatic acinar cells. **A** and **B**, Strategy for generating *Kras*^{Cit/Cit} and *Kras*^{Cit-G12D/+} mouse models using CRISPR/Cas9. **C**, Cit-K (detected using anti-GFP antibody) and E-cadherin (E-CAD) immunofluorescent labeling on pancreas sections of 8-week-old WT and *Kras*^{Cit/Cit} mice (n = 6). No Cit-K labeling was seen in WT. In *Kras*^{Cit/Cit} mice, some acinar cells (positive) showed Cit-K labeling at the membrane colocalizing with E-cadherin, while other acinar cells (negative) did not show detectable Cit-K. DAPI stains nuclear DNA. Bars, 50 μ m. **D**, Confocal images from 8-week-old *Kras*^{Cit/Cit} mice pancreata showing a positive and negative acinar cell expressing or not Cit-K at the plasma membrane (n = 6). Bars, 5 μ m. **E**, Pearson correlation coefficient for Cit-K and E-cadherin colocalization at the plasma membrane (n = 3). **F**, Typical contour plots of FACS-sorted acinar cells from 8-week-old WT (n = 3) and *Kras*^{Cit/Cit} (n = 14) pancreata and graph summarizing the results of the different experiments. Peanut agglutinin (PNA) lectin was used to label acinar cells. PNA-negative cells (no acinar cells) detected at the left side of FACS panels were cut off to focus only on PNA-positive events (acinar cells). The percentages refer to Cit-K-positive (Cit-K^{Pos}) acinar cells compared with acinar PNA-labeled cells. The age of mice is indicated at the time of sacrifice. Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance was tested by Student *t* test. ***, *P* < 0.001.

and KRAS^{G12D} (Supplementary Figs. S1A–S1E and S2A–S2E), and that Cit-K^{G12D} was oncogenic (Supplementary Fig. S3A–S3E).

Analysis of normal pancreas in *Kras*^{Cit/Cit} mice revealed a heterogeneous expression of Cit-K protein (Supplementary Fig. S4A); a majority of acinar cells displayed little or no Cit-K, whereas endocrine and ductal cells clearly expressed Cit-K protein (Supplementary Fig. S4B and S4C). In positive acinar cells, Cit-K labeling was located at the plasma membrane (Fig. 1C–E). Cit-K^{G12D} was also detected at the plasma membrane (Supplementary Fig. S5A–S5D), indicating that the *Kras*^{G12D} mutation did not significantly affect the dynamics of KRAS expression and subcellular localization in acinar cells. Intriguingly, we observed higher cytosolic levels of the Cit-K/Cit-K^{G12D} fusion proteins, compared with the KRAS/KRAS^{G12D} proteins. However, this did not impact the embryonic development, postnatal growth, and fertility of citrine-tagged mice (Supplementary Figs. S1E and S2E). FACS analysis of *Kras*^{Cit/Cit} pancreata (14), which generate a stronger citrine signal due to the presence of two citrine alleles, revealed that only 24.6% ± 2.4% of acinar cells express Cit-K protein (Cit-K^{Pos}; Fig. 1F), indicating that the majority of acinar cells do not express KRAS protein. We confirmed, by qRT-PCR experiments, the identity of Cit-K^{Pos} and Cit-K^{Low/Neg} acinar populations (Supplementary Fig. S6A–S6C). In *ElaC^{ER} Kras^{Cit-G12D/+}* mice, we observed a lower fluorescence intensity and a higher noise-to-signal ratio in FACS quantification, which is explained by the presence of a single citrine-tagged allele, and the basal low expression of Cit-K^{G12D}; this probably led to the inclusion of auto-fluorescent cells in our FACS quantification that overestimated the percentage of Cit-K^{G12D}^{Pos} acinar cells (FACS data available in Supplementary Fig. S7A and S7B). To overcome this issue, we then quantified their number on immunolabeled sections of pancreas. This indicated that Cit-K^{G12D} was expressed in 11.6% ± 2.4% of acinar cells (Supplementary Fig. S5D). Our RNA-seq data indicated that the LSL cassette of the *Kras* gene is deleted at a frequency of 60%, and allowed us to conclude that Cit-K (24.6%) and Cit-K^{G12D} (19.3% after correction for LSL recombination) are expressed in a comparable number of acinar cells. Altogether, these results highlight the presence of two acinar populations expressing differential levels of KRAS protein.

The low sensitivity of pancreatic acinar cells to *Kras* mutation is associated with low expression of KRAS and its effectors

The lack of KRAS protein in the majority of acinar cells probably explains why these cells display low sensitivity to *Kras* mutations. Because KRAS protein is detectable in a minor fraction of acinar cells, we first analyzed the transcriptional landscape of Cit-K^{Pos} and Cit-K^{Low/Neg} acinar cells (Fig. 2A; Supplementary Fig. S8A). We found that 70% of the expressed genes were detected in both populations (Fig. 2B). Cit-K^{Low/Neg} acinar cells mainly express genes related to pancreatic secretion, ribosomes, and protein processing in endoplasmic reticulum (Supplementary Fig. S8B). Interestingly, in Cit-K^{Pos} cells, *Kras* mRNA expression and pathways associated with KRAS-driven tumorigenesis including the MAPK/ERK, JAK/STAT, and PI3K/AKT pathways, were upregulated in a statistically significant way (Fig. 2C; Supplementary Fig. S6C). However, this increase at the mRNA level did not translate into efficient pathway activation, as evidenced by the absence of P-ERK and P-STAT3 labeling from Cit-K^{Pos} cells (Fig. 2D). Importantly, *in silico* analysis of two independent studies on human pancreas confirmed the presence of two subpopulations of acinar cells sharing a molecular signature similar to that of Cit-K^{Low/Neg} and Cit-K^{Pos} acinar cells (15, 16). These subpopulations express differential levels of KRAS: acinar cells expressing lower KRAS levels

showed high expression of digestive enzymes, while acinar cells expressing higher KRAS levels showed an enrichment in genes of the MAPK pathway (Supplementary Fig. S9A–S9C).

Next, we investigated if *Kras*^{G12D} mutation affects the activation of KRAS-related pathways. To do so, we compared the transcriptomes of acinar cells from *ElaC^{ER};YFP* and *ElaC^{ER} Kras^{G12D/+};YFP* (*ElaC^{ER} K^{G12D/+};YFP*) mice, in which acinar cells express YFP under the control of the ROSA26 locus. We found no upregulation of the ERK/MAPK, JAK/STAT, and PI3K/AKT pathways in the presence of *Kras*^{G12D} mutation (Supplementary Fig. S10A and S10B). Accordingly, P-ERK was undetectable by immunolabeling in acinar cells of *Kras^{Cit/Cit}*, *ElaC^{ER} K^{G12D/+}*, or *ElaC^{ER} K^{Cit-G12D/+}* pancreas (Supplementary Fig. S11A and S11B).

In WT and *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* pancreas, no change in *Kras*/*Kras*^{G12D} mRNA levels was detected (Supplementary Fig. S12A). From the abovementioned results, we hypothesized that effectors downstream of KRAS in the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways are not or only marginally expressed, at the protein level, in the pancreas. In WT and *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* pancreas, MEK1/2 and/or ERK1/2 were detectable but the expression of C-RAF was very low; the phosphorylation of C-RAF, MEK1/2, and ERK1/2 was low too (Fig. 3A; Supplementary Fig. S12B and S12C). Similarly, components of a molecular scaffold conveying the MAPK signal (17), namely KSR-1, GEF-H1, PP2Aa, and PP2Ac were very weakly expressed (Fig. 3B; Supplementary Fig. S13A–S13C). Concerning the PI3K/AKT pathway, p85 (PI3K regulatory subunit), p110β (PI3K catalytic subunit), and AKT were detected, whereas we found a weak expression of p110α (PI3K catalytic subunit), which interacts directly with KRAS and is essential for the formation of pancreatic neoplastic lesions (Fig. 3A; ref. 18). This low expression of critical KRAS effectors is probably responsible for the limited number of low-grade PanIN, which are observed when *Kras* mutations are induced in adult *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* mice (Supplementary Fig. S14A and S14B).

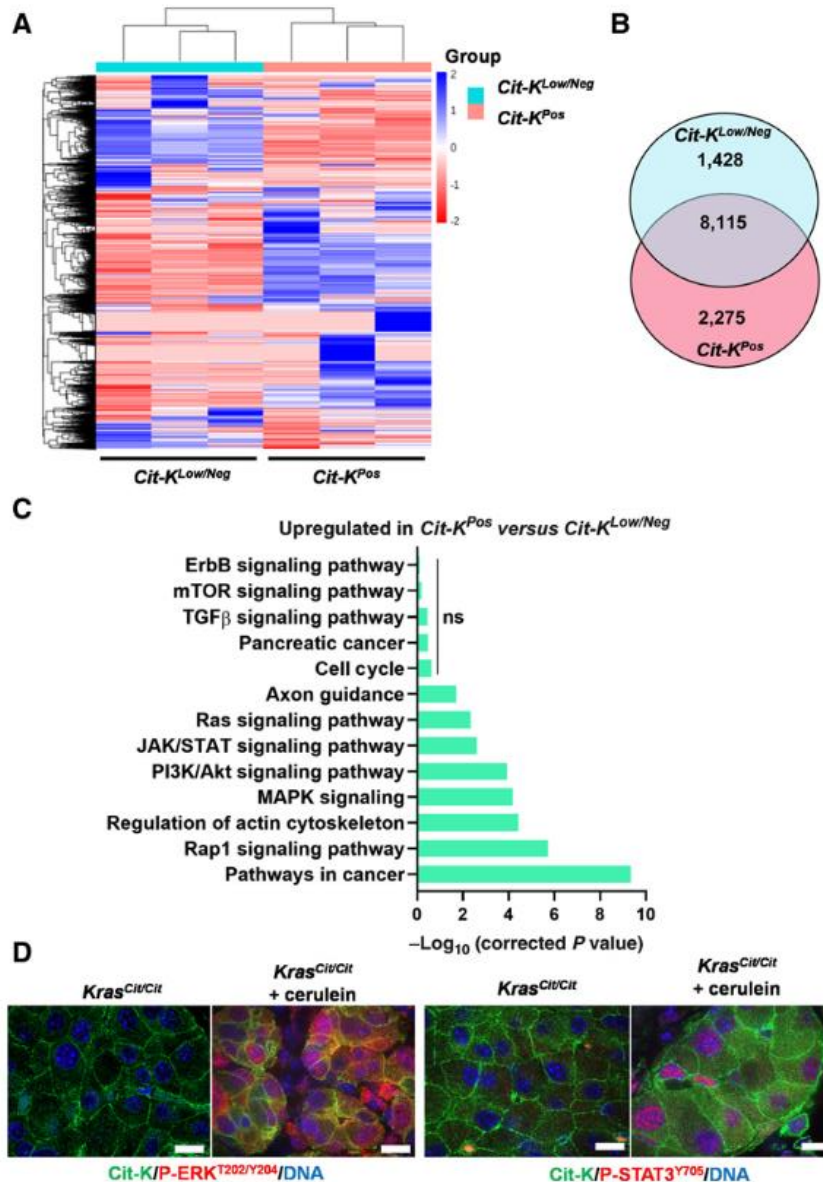
Interestingly, the low expression of KRAS and its effectors seems to be pancreas specific, because lungs, an organ that spontaneously develops tumors in the presence of *Kras* mutations (19), expressed high basal levels of KRAS and its effectors in mouse and humans (Supplementary Fig. S15A–S15C). For example, C-RAF expression, which is essential for lung tumor development, was 50-fold higher in adult lungs compared with adult pancreas (Supplementary Fig. S15C; ref. 20). Cit-K labeling in lungs confirmed the wide expression pattern of KRAS in this organ (Supplementary Fig. S16A and S16B). Together, our data suggest that the low protein expression of KRAS and critical effectors of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways leads to a weak responsiveness to *Kras* mutations in the pancreas.

Pancreatitis stimulates the expression of KRAS and its downstream effectors

To investigate how pancreatitis cooperates with oncogenic *Kras* mutations to promote tumorigenesis, we hypothesized that pancreatitis induces the expression of KRAS and its downstream effectors. Therefore, acute pancreatitis was generated by cerulein injection. Pancreatitis resulted in a 2.5-fold increase in *Kras* (*Kras* and *Kras*^{G12D}) mRNA (Supplementary Fig. S12A), and 3.4-fold increase in KRAS (KRAS and KRAS^{G12D}) protein in both WT and *Kras*^{G12D} backgrounds (Fig. 3A; Supplementary Fig. S12C). This was associated with a parallel 2.7- and 2.9-fold increase in the percentage of acinar cells expressing Cit-K or Cit-K^{G12D}, respectively, as estimated by FACS and/or tissue quantification (Fig. 3C and D; Supplementary Fig. S17A–S17C), indicating a similar increase in KRAS and KRAS^{G12D} expression in the presence of pancreatitis. These data were supported by immunodetection of

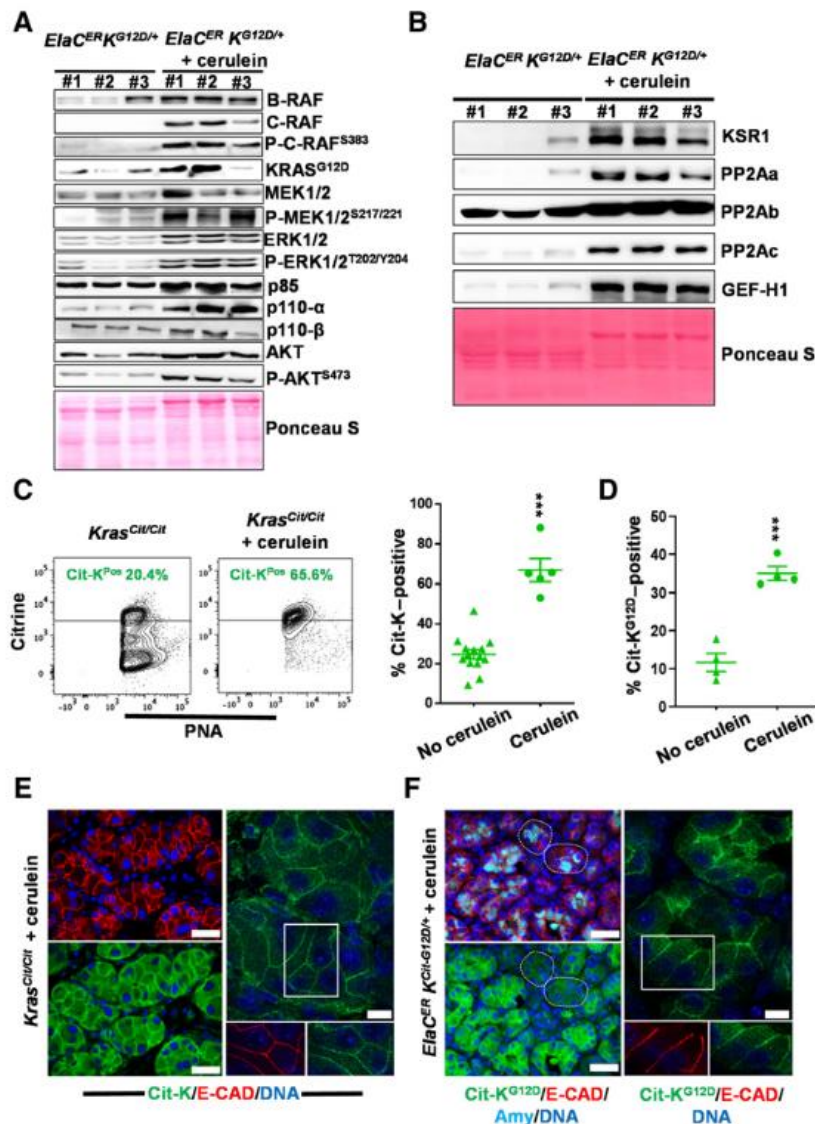
Figure 2.

Transcriptional signature of Cit-K^{Pos} and Cit-K^{Low/Neg} acinar cells. **A**, Heat-map showing differentially expressed genes from FACS-sorted Cit-K^{Pos} and Cit-K^{Low/Neg} acinar cells. **B**, Venn diagram representing the number of genes that are commonly or specifically expressed by Cit-K^{Pos} and Cit-K^{Low/Neg} acinar populations. **C**, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis of RNA-seq data listing upregulated pathways related to KRAS-driven tumorigenesis in Cit-K^{Pos} compared with Cit-K^{Low/Neg}. ns, not significant. **D**, Confocal images showing immunolabeling for Cit-K (green), P-ERK^{T202/Y204} (red), and P-STAT3^{Y705} (red) in Cit-K^{Pos} pancreatic acinar cells from 8-week-old *Kras*^{Cit/Cit} mice treated or not with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery. P-ERK^{T202/Y204} and P-STAT3^{Y705} signals were not detected in acinar cells unless after cerulein treatment. Bars, 50 μ m. The age of mice is indicated at the time of sacrifice. ns, nonsignificant.



membrane-located Cit-K and Cit-K^{G12D} on pancreas sections from *Kras*^{Cit/Cit} and *ElaC^{ER} Kras^{G12D/+}* mice treated with cerulein in an acute setting (Fig. 3E and F). Using the *PdxCre* *K^{Cit-G12D/+}* model, we found that in the presence of pancreatitis, Cit-K^{G12D} expression was significantly increased in PanIN compared with metaplastic acini, suggesting the need for a higher expression of mutated KRAS to achieve neoplastic transformation (Supplementary Fig. S18A and S18B). These experiments allow us to conclude that the increase in KRAS^{G12D} expression seen by Western blot at early stages (1 week of cerulein treatment), when only metaplasia is present, is mainly due to an increase in the number of KRAS^{G12D}-expressing cells rather than an increase in the expression level of KRAS^{G12D} by the cells.

Cerulein treatment of *ElaC^{ER} Kras^{G12D/+}* mice was associated with a drastic 46- and 4.5-fold increase in the expression of C-RAF and p110 α (Fig. 3A; Supplementary Fig. S12C), although *c-Raf* mRNA levels remained unchanged (Supplementary Fig. S19A). Expression of C-RAF was significantly higher in *Kras^{G12D}* mice, compared with WT mice; however, this observation did not apply to KRAS (Supplementary Fig. S12C). We also observed a 15-, 14-, and 18-fold increase of KSR-1, GEF-H1, and PP2Aa in the cerulein-treated *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* pancreata and in cultures of dissociated pancreata from *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* mice (Fig. 3B; Supplementary Fig. S13A–S13C); this *ex vivo* culture spontaneously recapitulates the *in vivo* effects of cerulein treatment on ADM (21).

**Figure 3.**

Inflammation increases the number of KRAS-expressing cells and the expression level of KRAS downstream effectors. **A** and **B**, Western blots on total pancreatic protein lysates from adult 8-week-old *ElaCER K^{G12D/+}* mice treated ($n = 8$) or not ($n = 7$) with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery. Before cerulein injections, 6-week-old *ElaCER K^{G12D/+}* mice were treated with tamoxifen to induce KRAS^{G12D} expression from its endogenous locus. Ponceau S staining was used as loading control. Quantifications are available in Supplementary Figs. S12, S13, and S19. **C**, Left, typical contour plots of FACS-sorted acinar cells from digested 8-week-old *Kras^{Cit/Cit}* pancreata of adult mice treated ($n = 5$) or not ($n = 14$) with cerulein for 3 days, followed by 1 day of recovery. Peanut agglutinin (PNA) lectin was used to specifically label acinar cells. Right, graph summarizing the results of the different FACS experiments. The average percentage of acinar cells expressing Cit-K following cerulein administration was $66.8\% \pm 0.1\%$. **D**, Graph summarizing the percentage of Cit-K^{G12D}-positive acinar cells in *ElaCER K^{Cit-120/+}* pancreata of 8-week-old mice untreated or treated with cerulein for 3 days, followed by 1 day of recovery. Cit-K^{G12D}-positive cells were quantified on immunolabeled pancreas sections. The average percentage of acinar cells expressing Cit-K^{G12D} following cerulein treatment was $35.0\% \pm 1.8\%$; after correction for LSL recombination, this percentage is $58.3\% \pm 5.4\%$. **E**, Immunolabeling for Cit-K and E-cadherin (E-CAD) on pancreas sections from 8-week-old *Kras^{Cit/Cit}* mice ($n = 4$) treated with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery setting. The Cit-K labeling colocalized with E-cadherin at the cell membrane. Bars, 50 μ m. Panels on the right are confocal pictures. Bars, 10 μ m. **F**, Immunolabeling for Cit-K^{G12D}, E-cadherin, and amylase (Amy) on pancreas sections from 8-week-old *ElaCER K^{G12D/+}* mice ($n = 3$) treated with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery. Cit-K^{G12D} was located at the plasma membrane of metaplastic acinar cells. Bars, 50 μ m. The dotted circles delineate acinar cells devoid of Cit-K^{G12D}. Panels on the right are confocal pictures. Bars, 10 μ m. The age of mice is indicated at the time of sacrifice. Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance was tested by Student *t* test. ***, $P < 0.001$.

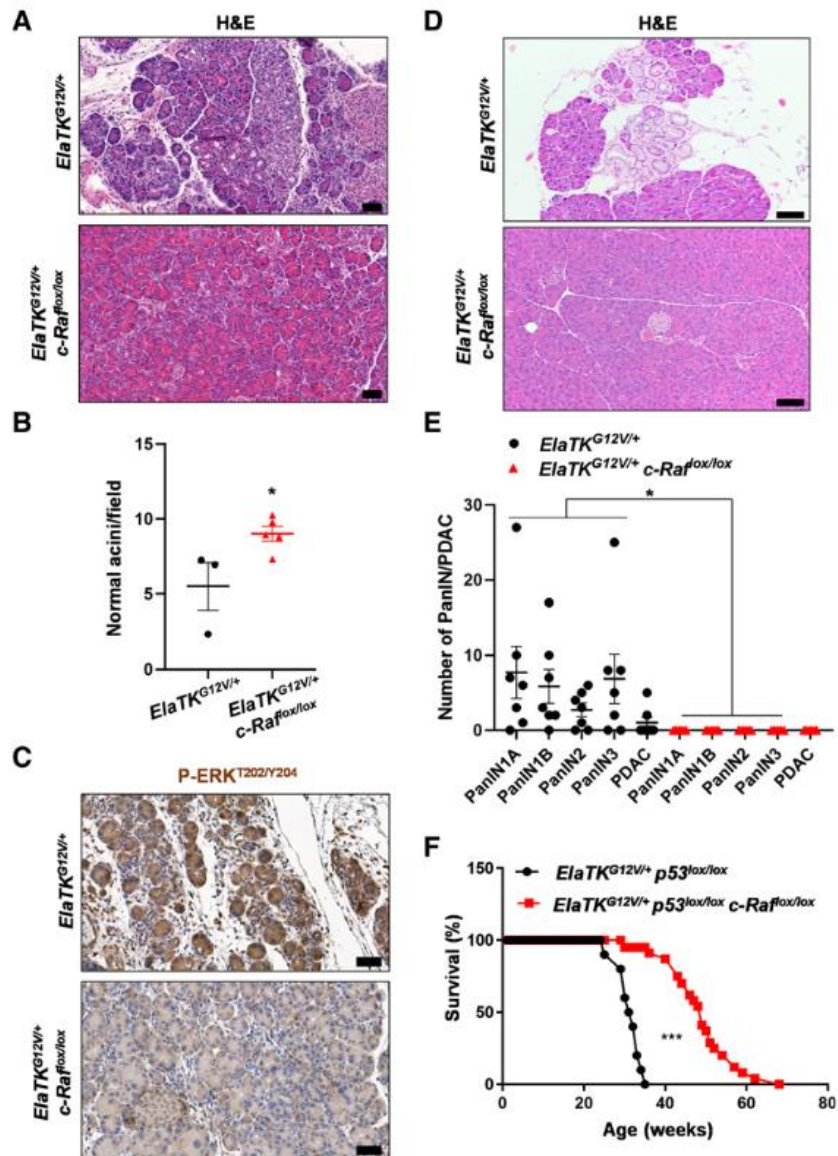
Transcriptome analysis indicated that acute pancreatitis induced a strong upregulation of KRAS-related pathways, including the MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways; the corrected *P* values (Supplementary Fig. S10A and S10B) were statistically much higher than those obtained when comparing the acinar $\text{Cit-K}^{\text{Low/Neg}}$ and $\text{Cit-K}^{\text{Pos}}$ cells (Fig. 2C). Accordingly, we found a 12-, 20-, and 6-fold increase in P-C-RAF, P-MEK1/2, and P-ERK1/2 levels, respectively, and a 3-fold increase in P-AKT level (Fig. 3A; Supplementary Figs. S12C and S19B). ERK activation was also confirmed by immunostaining in $\text{ElaC}^{\text{ER}} \text{K}^{\text{G12D/+}}$ mice treated with cerulein in a chronic setting (Supplementary Fig. S19C).

Our results indicate that the two central KRAS effectors C-RAF and p110 α are increased following pancreatitis. It has been shown that

p110 α is required for PanIN initiation when it is genetically inactivated during embryogenesis or when it is pharmacologically inhibited in adult mice (18). However, C-RAF is dispensable for pancreatic tumorigenesis when it is genetically inactivated in pancreatic progenitor cells (22, 23). To study the role of C-RAF when deleted during adulthood, we inactivated its expression in *Kras*-mutated acinar cells using $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ mice. In the presence of acute pancreatitis, the ablation of *c-Raf* reduced acinar metaplasia by 50% (Fig. 4A and B) and inhibited ERK activation (Fig. 4C). When chronic pancreatitis was induced for 3 months, followed by 8 months of recovery before sacrifice, *c-Raf* ablation prevented the development of advanced PanIN and PDAC (Fig. 4D and E). Although the survival of $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}} \text{p53}^{\text{lox/lox}}$ mice was not affected when

Figure 4.

Ablation of *c-Raf* reduces ADM and prevents the development of PanIN from adult acinar cells. **A**, Hematoxylin & eosin (H&E) staining on 13-week-old $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}}$ (*n* = 3) and $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ (*n* = 5) pancreata treated with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery. Bars, 50 μm . Before cerulein injections, doxycycline was removed during 4 weeks at 8 weeks of age to induce $\text{KRAS}^{\text{G12V}}$ expression from its endogenous locus. **B**, Quantification of the number of normal acini in $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}}$ (*n* = 3) and $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ (*n* = 5) mice from experiments shown in **A**. **C**, P-ERK staining on pancreata from 13-week-old $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}}$ and $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ mice treated with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery. Bars, 50 μm . **D**, Hematoxylin and eosin pictures from 56-week-old $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}}$ (*n* = 7) and $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ (*n* = 7) mice treated with cerulein for 3 months and sacrificed after 8 months of recovery (chronic setting). **E**, Quantification of PanIN and PDAC in $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}}$ (*n* = 7) and $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ (*n* = 6) mice from experiments shown in **D**. **F**, Survival of $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{p53}^{\text{lox/lox}}$ (black circles; *n* = 10) and $\text{ElaTK}^{\text{G12V/+}} \text{p53}^{\text{lox/lox}} \text{c-Raf}^{\text{lox/lox}}$ (red boxes; *n* = 24) mice treated with cerulein once daily until humane endpoint. The age of mice is indicated at the time of sacrifice. Data are mean $\pm$ SEM. Statistical significance was tested by Student *t* test. *, *P* < 0.05; ***, *P* < 0.001.



Kras^{G12V} mutation and *c-Raf* ablation took place in pancreatic progenitor cells (23), survival was extended when *Kras*^{G12V} mutation and *c-Raf* ablation were induced in adult mice (Fig. 4F). Because PanIN development and KRAS signaling are similarly activated by *Kras*^{G12D} and *Kras*^{G12V} mutants (24), our results may be extended to the G12D model and highlight an important role of C-RAF in PDAC initiation from adult acinar cells. We conclude that pancreatitis sensitizes acinar cells to *Kras* mutations by increasing the expression of KRAS and its main effectors, such as C-RAF, at the protein level.

EGFR signaling controls the expression of KRAS effectors

EGFR is essential for the tumorigenic activity of mutated *Kras* in pancreas, as shown by the lack of KRAS-induced PanIN formation

from acinar cells in which *Egfr* has been inactivated (25, 26). This prompted us to hypothesize that adult mouse pancreas expresses low levels of EGFR and upstream KRAS effectors and that EGFR is important for the expression of KRAS effectors.

We found that EGFR, P-EGFR, GRB2, SOS1, and SOS2 were almost absent from adult pancreas, but were induced by 35-, 23-, 16-, 43-, and 68-fold, respectively, in the presence of acute pancreatitis (Fig. 5A; Supplementary Fig. S20A and S20B). To address the function of EGFR signaling, we treated cultures of dissociated pancreata from *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* mice with the EGFR inhibitor gefitinib. As expected, EGFR, SOS1, SOS2, KRAS^{G12D}, C-RAF, and p110 α expression was induced after 3 days of culture, in the absence of inhibitor (Fig. 5B); Sox9 was chosen as a marker of metaplasia (27). Gefitinib inhibited the

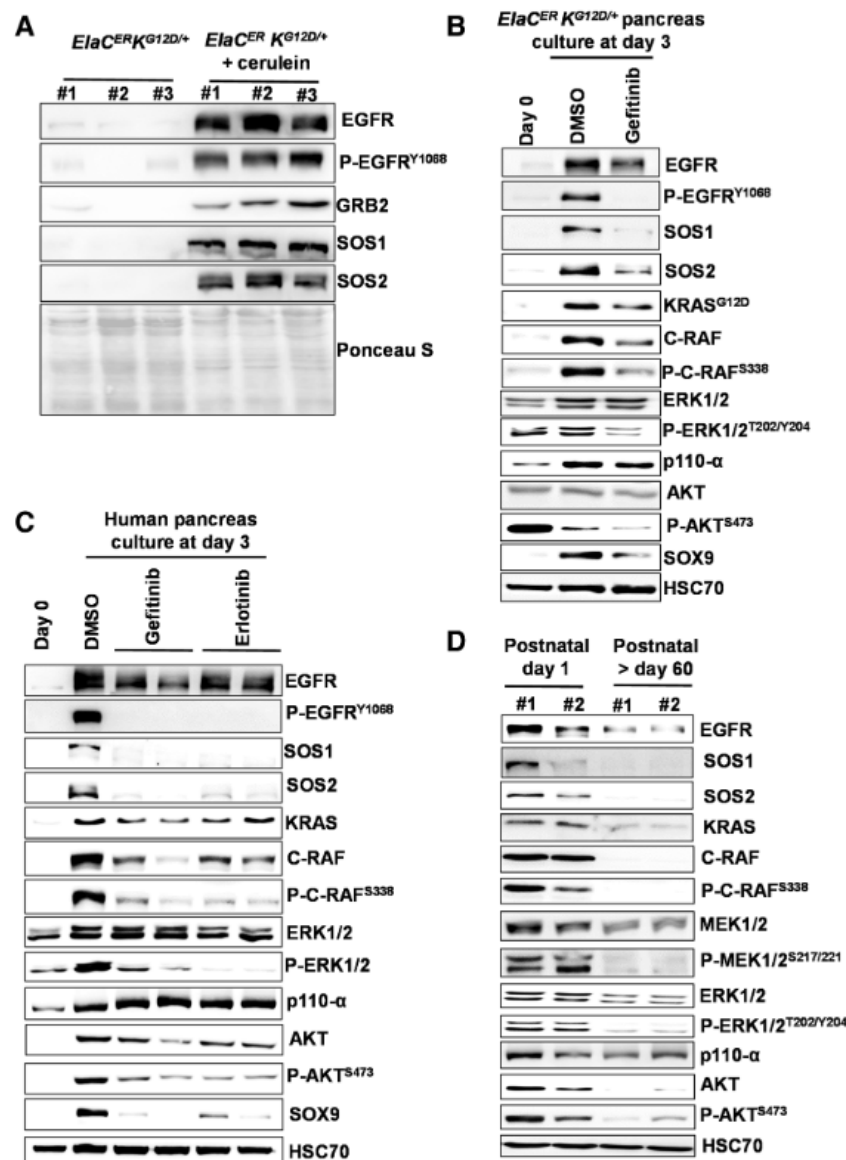


Figure 5.

EGFR controls the expression of upstream and downstream effectors of KRAS signaling. **A**, Western blots on total pancreatic protein extracts from 8-week-old adult *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* mice treated ($n = 3$) or not ($n = 3$) with cerulein for 5 days, followed by 2 days of recovery. Ponceau S was used as loading control. **B**, Western blots on total protein extracts from 8-week-old *ElaC^{ER} K^{G12D/+}* pancreas culture. Day 0 represents freshly isolated normal acini, and day 3 represents metaplastic acini. Gefitinib (5 μ M/L) was added to the medium at the onset of the culture and renewed every 24 hours. DMSO, used to solubilize gefitinib, was added to the control condition at 0.05% ($n = 5$). Sox9 was chosen as a marker of metaplasia (27). **C**, Western blots on total protein extracts from pancreas culture of adult human donors. Gefitinib (5 μ M/L) or erlotinib (10 μ M/L) was added to the medium from the start of the culture and renewed every 24 hours. A total of 0.1% DMSO was added in the control condition ($n = 3$). **D**, Western blots on total pancreas protein extracts from WT mice at days 1 to 10 and day 60, after birth ($n = 4-10$). HSC70 was used as a loading control. The age of mice is indicated at the time of sacrifice. Quantifications are available in Supplementary Data.

phosphorylation of EGFR and C-RAF, and significantly reduced the induction of EGFR, SOS1, SOS2, C-RAF, and p110 α (Fig. 5B; Supplementary Fig. S21A). We extended our approach to human pancreas cultures, and observed an induction of KRAS and its effectors at day 3, which was significantly inhibited in the presence of gefitinib or erlotinib, two EGFR inhibitors (Fig. 5C; Supplementary Fig. S21B).

Interestingly, we also observed that mouse pancreata at postnatal day 1 show a 2-fold higher expression of EGFR compared with adult pancreata; this was accompanied with higher expression of KRAS and its effectors, with, in particular, a 20-fold higher expression of C-RAF (Fig. 5D; Supplementary Fig. S22A). These results likely explain why early postnatal acinar cells from newborns are more sensitive to oncogenic *Kras* mutations compared with adult acinar cells (6). Altogether, these results support that in pancreas, EGFR is required for the oncogenic activity of mutated KRAS by controlling the protein expression of crucial upstream and downstream KRAS effectors.

Discussion

Data from previous studies suggest that the sensitivity of pancreatic acinar cells to an oncogenic *Kras* mutation decreases with their differentiation stage (28–31). The sensitivity of acinar cells to *Kras* mutation is most important during embryonic development, and it gradually decreases after birth. At adult stage, this sensitivity is strongly increased in the presence of an inflammatory stimulus, such as that induced by pancreatitis (6, 28–31). Once the early neoplastic lesions have formed, it seems that other mechanisms may slow down tumor progression, such as senescence, which acts as a barrier that prevents progression of low-grade PanIN into more aggressive lesions (32). Here also, pancreatitis contributes to PDAC progression by eliminating this senescence barrier (32). The molecular mechanisms through which pancreatitis sensitizes acinar cells to *Kras* mutations are still largely unknown. We believe that the elucidation of these mechanisms depends, at least partly, on our ability to detect KRAS on tissue sections. In the absence of immunolabeling-grade KRAS antibody, we developed in this work the first mouse models that enable the detection of WT and mutant KRAS in tissues and used these models to characterize the abovementioned mechanisms.

Using our models, we found that WT and mutant KRAS proteins are only expressed in a minority of adult acinar cells. This indicates that the adult pancreas contains two populations of phenotypically indistinguishable acinar cells, one expressing KRAS and the other not expressing it (or at an undetectable level). Taking advantage of the properties of our models, we separated these populations to compare their transcriptome and found that they have distinct transcriptional signatures. Acinar cells that do not express KRAS seem to be more dedicated to the production of digestive enzymes and their secretion, whereas KRAS-expressing cells show an enrichment in genes related to KRAS signaling. An important confirmation of the existence of these two acinar cell populations was provided by two studies of RNA sequencing performed on human pancreas (15, 16). A first population seems more dedicated to digestive functions; it expresses low levels of KRAS and high levels of acinar genes, and is similar to the acinar cells expressing low KRAS protein levels described in our study. The second is enriched in genes related to KRAS and MAPK/ERK pathway but expresses low levels of acinar genes and, thus, is similar to our KRAS-expressing cells (15, 16). Future studies will be needed to determine whether KRAS-expressing acinar cells are more prone to initiate tumorigenesis.

The absence of KRAS protein in a majority of acinar cells explains why the pancreas shows a low sensitivity to *Kras* mutations. Capital-

izing on this result, we further explored why the minority of KRAS-expressing cells do not effectively activate KRAS-dependent pathways, like the MAPK/ERK pathway, when *Kras* is mutated. We found that the protein expression of crucial KRAS effectors, mainly C-RAF, was missing or only expressed at marginal levels. Our results take a fresh look at data from the literature, mainly obtained using cultured cell lines, which inappropriately claim that these effectors are widely expressed. However, emerging evidences confirm our data by showing that the effectors SOS1, SOS2, and C-RAF have the lowest abundance among all effectors of the RAS/MAPK pathway (33).

We also discovered that pancreatitis leads to a significant increase in the protein expression of KRAS and its effectors. This is in line with previous studies, which described the existence of a biological threshold for the expression and activity of KRAS that needs to be reached to initiate tumorigenesis (34–36). Our study reveals that this observation also extends to the expression levels of KRAS effectors. Accordingly, we confirmed that pancreatitis induces pancreatic neoplasia through upregulating the expression of C-RAF, as the ablation of the latter hampered tumorigenesis from adult acinar cells. The fact that protein expression of KRAS and its effectors is correlated with the sensitivity of acinar cells to *Kras* mutations, is supported by our observation that pancreata from newborns, which develop more lesions in response to *Kras* mutations than adult pancreata (6), express higher levels of KRAS and its effectors, as compared with adult pancreata. Another supporting independent observation comes from Collins and colleagues showing that increased protein expression of oncogenic KRAS in an adult pancreas, from an ectopic promoter, is associated with a significant and rapid development of PanIN and PDAC, without requiring experimental pancreatitis (37). Contrariwise, the models in which oncogenic KRAS is expressed from its own promoter require experimental pancreatitis to observe a significant and rapid development of PanIN and PDAC (6).

Our results also provide an explanation for the role played by EGFR in pancreatic tumorigenesis (25, 26). We found that the weak protein expression of upstream and downstream effectors, in pancreas, renders ineffective the initiation of *Kras*-related tumorigenesis. In this context, pancreatitis increases the expression and activation of EGFR, which in turn promotes the expression of KRAS effectors, including C-RAF. Indeed, the expression and activation of EGFR can be maintained through a positive feed-forward loop activated by inflammation. This loop seems to include EGFR, KRAS effectors, and the transcription factors Sox9 and NFATc1 (35, 38, 39). Our data connect EGFR activation with the expression levels of KRAS effectors in mice but also in humans, indicating a similar regulation in both species. The ability of EGFR to increase the levels of KRAS effectors explains its essential role in mutant KRAS-driven pancreatic tumorigenesis (25, 26).

According to our results, it appears that the mechanisms of tolerance to oncogenic stress are tissue specific. In the skin, the epidermis resists oncogenic *Pik3ca* mutations by inducing the differentiation of progenitor cells, leading to the suppression of abnormal cell growth (40); it also tolerates oncogenic *Hras* mutations via a selective translational mechanism that inhibits cell renewal (41). In the pancreas, the mechanism found here is passive as it depends on the low abundance of multiples key KRAS effectors, resulting in an ineffective KRAS signaling. We do not exclude that this passive mechanism coexists with a more active mechanism, which would aim, for example, to curb the activity of KRAS signaling.

In conclusion, our study reveals that the expression of KRAS protein and its effectors is heterogeneous in adult pancreas, and that it is induced by pancreatitis. Low concentration of several constituents of the KRAS pathway is associated with an ineffective signaling, and

consequently, the occurrence of a *Kras* mutation does not translate into increased signaling activity. Comparable regulations could affect other genes frequently mutated in cancer, such as other members of the RAS family, namely HRAS and NRAS, and other effectors, such as B-RAF. Together, our observations underline the need to consider oncogene expression levels when investigating tumorigenic mechanisms, and pave the way for future anticancer strategies targeting the control of oncogene expression.

Authors' Disclosures

No disclosures were reported.

Authors' Contributions

M. Assi: Conceptualization, data curation, software, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing. **Y. Achouri:** Resources, data curation, investigation, methodology. **A. Lloriet:** Data curation, software, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, writing—review and editing. **N. Dauguet:** Data curation, software, formal analysis, validation, visualization, methodology. **H. Dahou:** Data curation, investigation, methodology. **J. Baldan:** Resources, data curation. **M. Libert:** Resources, data curation. **J.S. Fain:** Software, methodology. **C. Guerra:** Resources, data curation, software, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, writing—review and editing. **L. Bouwens:** Resources, data curation, methodology. **M. Barbacid:** Resources, data curation, software, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. **F.P. Lemaigre:** Formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. **P. Jacquemin:** Conceptualization, resources, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, writing—original draft, project administration, writing—review and editing.

Acknowledgments

The authors thank Mourad El Kaddouri and Jean-Nicolas Lodewyckx for expert technical assistance, and Doris Stoffers and Tyler Jacks for providing mouse strains. This work was supported by grants from the Foundation for Cancer Research (#2016-089, #2018-078, and #2018-076 to F.P. Lemaigre and P. Jacquemin) and Télévie (#7.4595.15 and #7.4502.16 to F.P. Lemaigre and P. Jacquemin). M. Assi is Research Assistant at the National Fund for Scientific Research (FRS-FNRS, Belgium). P. Jacquemin is Senior Research Associate at FRS-FNRS, Belgium.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received September 2, 2020; revised January 14, 2021; accepted February 16, 2021; published first February 18, 2021.

References

- Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* 2004;5:375–87.
- Waters AM, Der CJ. KRAS: The critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8:a031435.
- Notta F, Hahn SA, Real FX. A genetic roadmap of pancreatic cancer: still evolving. *Gut* 2017;66:2170–8.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–50.
- Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL, Morris JP 4th, et al. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;22:737–50.
- Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Perez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007;11:291–302.
- Lee AY, Dubois CL, Sarai K, Zarei S, Schaeffer DF, Sander M, et al. Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2019;68:487–98.
- Mueller S, Engleitner T, Maresch R, Zukowska M, Lange S, Kaltenbacher T, et al. Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 2018;554:62–8.
- Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, et al. Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* 2013;497:638–42.
- Schmick M, Vartak N, Papke B, Kovacevic M, Truxius DC, Rossmannek L, et al. KRAS localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport. *Cell* 2014;157:459–71.
- Chandra A, Grecco HE, Pisupati V, Perera D, Cassidy L, Skoulidis F, et al. The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol* 2011;14:148–58.
- Houbracken I, de Waele E, Lardon J, Ling Z, Heimberg H, Rooman I, et al. Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* 2011;141:731–41.
- Waters AM, Ozkan-Dagliyan I, Vaseva AV, Fer N, Strathern LA, Hobbs GA, et al. Evaluation of the selectivity and sensitivity of isoform- and mutation-specific RAS antibodies. *Sci Signal* 2017;10:eaao3332.
- Assi M, Dauguet N, Jacquemin P. DiE-RNA: A reproducible strategy for the digestion of normal and injured pancreas, isolation of pancreatic cells from genetically engineered mouse models and extraction of high quality RNA. *Front Physiol* 2018;9:129.
- Tosti L, Hang Y, Debnath O, Tiesmeyer S, Trefzer T, Steiger K, et al. Single nucleus and in situ RNA sequencing reveals cell topographies in the human pancreas. *Gastroenterology* 2020;S0016-5085:35399–3.
- Segerstolpe A, Palasantza A, Eliasson P, Andersson EM, Andreasson AC, Sun X, et al. Single-cell transcriptome profiling of human pancreatic islets in health and type 2 diabetes. *Cell Metab* 2016;24:593–607.
- Cullis J, Meiri D, Sandi MJ, Radulovich N, Kent OA, Medrano M, et al. The RhoGEF GEF-H1 is required for oncogenic RAS signaling via KSR-1. *Cancer Cell* 2014;25:181–95.
- Baer R, Cintas C, Dufresne M, Cassant-Sourdy S, Schonhuber N, Planque L, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110alpha. *Genes Dev* 2014;28:2621–35.
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, et al. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 2003;4:111–20.
- Blasco RB, Francoz S, Santamaria D, Canamero M, Dubus P, Charron J, et al. c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2011;19:652–63.
- Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ Jr, et al. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* 2005;132:3767–76.
- Eser S, Reiff N, Messer M, Seidler B, Gottschalk K, Dobler M, et al. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell* 2013;23:406–20.
- Blasco MT, Navas C, Martin-Serrano G, Grana-Castro O, Lechuga CG, Martin-Diaz L, et al. Complete regression of advanced pancreatic ductal adenocarcinomas upon combined inhibition of EGFR and C-RAF. *Cancer Cell* 2019;35:573–87.
- Zafra MP, Parsons MJ, Kim J, Alonso-Curbelo D, Goswami S, Schatoff EM, et al. An in vivo Kras allelic series reveals distinct phenotypes of common oncogenic variants. *Cancer Discov* 2020;10:1654–71.
- Ardito CM, Gruner BM, Takeuchi KK, Lubeseder-Martellato C, Teichmann N, Mazur PK, et al. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 2012;22:304–17.
- Navas C, Hernandez-Porras I, Schuhmacher AJ, Sibilia M, Guerra C, Barbacid M. EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;22:318–30.

27. Prevot PP, Simion A, Grimont A, Colletti M, Khalilieh A, Van den Steen G, et al. Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut* 2012;61:1723–32.
28. De La O JP, Emerson LL, Goodman JL, Froebe SC, Illum BE, Curtis AB, et al. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18907–12.
29. Habbe N, Shi G, Meguid RA, Fendrich V, Esni F, Chen H, et al. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18913–8.
30. Gidekel Friedlander SY, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, et al. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* 2009;16:379–89.
31. Storz P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:296–304.
32. Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernandez-Porras I, Canamero M, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 2011;19:728–39.
33. Shi T, Niepel M, McDermott JE, Gao Y, Nicora CD, Chrisler WB, et al. Conservation of protein abundance patterns reveals the regulatory architecture of the EGFR-MAPK pathway. *Sci Signal* 2016;9:rs6.
34. Ji B, Tsou L, Wang H, Gaiser S, Chang DZ, Daniluk J, et al. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology* 2009;137:1072–82.
35. Huang H, Daniluk J, Liu Y, Chu J, Li Z, Ji B, et al. Oncogenic K-Ras requires activation for enhanced activity. *Oncogene* 2014;33:532–5.
36. Daniluk J, Liu Y, Deng D, Chu J, Huang H, Gaiser S, et al. An NF-kappaB pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J Clin Invest* 2012;122:1519–28.
37. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galban S, Galban CJ, et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest* 2012;122:639–53.
38. Grimont A, Pinho AV, Cowley MJ, Augereau C, Mawson A, Giry-Laterrière M, et al. SOX9 regulates ERBB signalling in pancreatic cancer development. *Gut* 2015;64:1790–9.
39. Chen NM, Singh G, Koenig A, Liou GY, Storz P, Zhang JS, et al. NFATc1 links EGFR signaling to induction of Sox9 transcription and acinar-ductal transdifferentiation in the pancreas. *Gastroenterology* 2015;148:1024–34.
40. Ying Z, Sandoval M, Beronja S. Oncogenic activation of PI3K induces progenitor cell differentiation to suppress epidermal growth. *Nat Cell Biol* 2018;20:1256–66.
41. Cai EY, Kufeld MN, Schuster S, Arora S, Larkin M, Germanos AA, et al. Selective translation of cell fate regulators mediates tolerance to broad oncogenic stress. *Cell Stem Cell* 2020;27:270–83.

III. L'expression de la protéine KRAS est progressivement réduite au cours de l'embryogenèse et à l'âge adulte.

Dans l'article intitulé « *KRAS protein expression becomes progressively restricted during embryogenesis and in adulthood* », j'ai contribué à la réalisation d'expériences, à l'acquisition de données et à l'analyse et interprétation des résultats.



OPEN ACCESS

EDITED BY
De-Li Shi,
Sorbonne University, France

REVIEWED BY
Ian Prior,
University of Liverpool, United Kingdom
Miharu Maeda,
Akita University, Japan

*CORRESPONDENCE
Patrick Jacquemin,
patrick.jacquemin@uclouvain.be

†These authors share first authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Morphogenesis and Patterning,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

RECEIVED 15 July 2022

ACCEPTED 29 August 2022

PUBLISHED 27 September 2022

CITATION

Minati M-A, Assi M, Libert M, Cordi S,
Lemaigre F and Jacquemin P (2022),
KRAS protein expression becomes
progressively restricted during
embryogenesis and in adulthood.
Front. Cell Dev. Biol. 10:995013.
doi: 10.3389/fcell.2022.995013

COPYRIGHT

© 2022 Minati, Assi, Libert, Cordi,
Lemaigre and Jacquemin. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

KRAS protein expression becomes progressively restricted during embryogenesis and in adulthood

Marie-Albane Minati[†], Mohamad Assi[†], Maxime Libert,
Sabine Cordi, Frédéric Lemaigre and Patrick Jacquemin*

Université catholique de Louvain, de Duve Institute, Liver and Pancreas Differentiation Unit, Brussels, Belgium

KRAS mutants are common in many cancers and wild-type KRAS is essential in development as its absence causes embryonic lethality. Despite this critical role in development and disease, the normal expression pattern of KRAS protein is still largely unknown at the tissue level due to the lack of valid antibodies. To address this issue, we used the *citrine-Kras* mouse model in which the Citrine-KRAS (Cit-K) fusion protein functions as a validated surrogate of endogenous KRAS protein that can be detected on tissue sections by immunolabeling with a GFP antibody. In the embryo, we found expression of KRAS protein in a wide range of organs and tissues. This expression tends to decrease near birth, mainly in mesenchymal cells. During transition to the adult stage, the dynamics of KRAS protein expression vary among organs and detection of KRAS becomes restricted to specific cell types. Furthermore, we found that steady state KRAS protein expression is detectable at the cell membrane and in the cytoplasm and that this subcellular partitioning differed among cell types. Our results reveal hitherto unanticipated dynamics in developmental, tissular, cell-specific and subcellular expression of KRAS protein. They provide insight into the reason why specific cell-types are sensitive to KRAS mutations during cancer initiation.

KEYWORDS

KRAS, development, epithelial cells, mesenchymal cells, mouse models

1 Introduction

The RAS family is composed of three genes, *Nras*, *Hras* and *Kras*, that encode four proteins called NRAS, HRAS and two splice isoforms of KRAS, namely KRAS4A and KRAS4B. RAS are small GTPases that cycle between “on/off” states with the help of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs) which stimulate the active GTP-bound and inactive GDP-bound states, respectively (Barbacid, 1987; Lowy & Willumsen, 1993). The GTP-GDP exchange which regulates KRAS activity occurs at the plasma membrane (Stephen et al., 2014; Simanshu et al., 2017) where KRAS is anchored through prenylation. This membrane localization is essential for

its activity (Cox et al., 2015) and results in the activation of downstream signaling pathways, such as the RAF-MEK-ERK signaling cascade (Simanshu et al., 2017). Trafficking of Kras between different cellular compartments has also been described as a process regulating its activity (Prior & Hancock, 2012). It should be noted that these studies are based on the use of tagged forms of KRAS which are overexpressed in cell lines and may behave differently from endogenous KRAS (Prior & Hancock, 2012).

The role of RAS in homeostasis, embryonic development, cancer, and genetic disorders gained the attention of researchers already in the eighties. Particularly, the role of *Ras* genes in embryonic development was first assessed using knockout mouse models. Mice lacking NRAS and HRAS showed normal viability and growth (Umanoff et al., 1995; Ise et al., 2000), while those lacking KRAS presented with a severe growth defect and died *in utero* around E15.5 (Korea et al., 1997; Johnson et al., 1997). Rescue experiments identified partial functional overlap between KRAS and HRAS or NRAS (Nakamura et al., 2008). Further analysis of *Kras*^{cit} embryos revealed that they displayed features of anemia, fetal liver defect (decellularization) (Johnson et al., 1997), motor neuronal defect (cell death) and ventricular myocardium atrophy (Korea et al., 1997). All these studies highlight KRAS as a master regulator of embryonic mouse development.

The expression pattern of the mouse *Kras* gene characterized by Northern blotting and quantitative real-time PCR revealed substantial variations in *Kras* expression among different organs and during development, from embryogenesis to adulthood (Leon et al., 1987; Nowlaczyl et al., 2017). At the protein level, despite the importance of KRAS in health and disease, the lack of KRAS antibodies functional for tissue immunostaining prevented the characterization of KRAS protein expression and subcellular localization *in vivo* (Waters et al., 2017). Therefore, understanding RAS-driven developmental defects and tumor initiation remains complex.

To fill this gap of knowledge, we assessed KRAS protein expression at different stages of mouse embryonic development and in adults, using the *Kras*^{Cit} mouse model, which has been recently developed by our lab (Assi et al., 2021). This model expresses a fusion protein called Citrine-KRAS (Cit-K), in which the fluorescent protein Citrine is fused in-frame with KRAS, and is transcribed under the control of the endogenous *Kras* promoter. Therefore, Cit-K faithfully reproduces the tissular expression pattern of KRAS protein, as well as its subcellular localization which can be assessed easily on tissue sections using a GFP antibody; importantly, Cit-K binds GTP and does not impact embryonic development, postnatal growth, and fertility of mice that homozygously express Cit-Kras (*Kras*^{Cit/Cit}) (Assi et al., 2021). In the present paper, using this mouse model, we identified a dynamic organ- and cell-specific KRAS protein expression profile throughout mouse development and in adults.

TABLE 1 Antibody used.

Antibodies	Origin	Dilution	Reference
α-actinin	Mouse	1/750	Sigma (A7811)
CD31	Rat	1/250	Dianova (D130)
E-CADHERIN	Mouse	1/1000	BD Biosciences (610182)
GFP	Goat	1/250	Abcam (ab6673)
HNF4	Mouse	1/350	R&D systems (PP-H1415-00)
NeuN	Mouse	1/100	Merck (MAB377)
SOX2	Rabbit	1/100	Abcam (ab97959)
SOX9	Rabbit	1/500	Home Made
VIMENTIN	Rabbit	1/100	Cell signaling (5741)

2 Materials and methods

2.1 Mice

All procedures described in this study were performed with the approval of the animal welfare committee of the UCLouvain Health Sciences Sector (Brussels, Belgium; ethic number: 2021/UCL/MD/054).

Kras^{Cit} mice expressing Cit-K have been described (Assi et al., 2021).

2.2 Embryo and organ collection

Embryos were collected at E13.5, E15.5 and E17.5 and were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 6–10 h before embedding in paraffin. Tissues dissected from 8-week-old mice were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 4–6 h before embedding in paraffin.

2.3 Immunofluorescent labeling

Six-μm tissue sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed by heating the slides for 20 min in Tris-EDTA (pH 9) buffer in Lab Vision PT Module (Thermo Fisher Scientific). Sections were rinsed 5 min in phosphate-buffered saline (PBS), and permeabilized in PBS, 0.3% Triton X-100 (Sigma Aldrich) for 5 min at room temperature. After permeabilization, tissue sections were blocked in PBS, 3% low-fat milk, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100 (blocking buffer) for 45 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and incubated with the samples overnight at 4°C. Primary antibodies and antibody dilution are listed in Table 1. Then, slides were washed with 0.1% Triton X-100 in PBS. Secondary antibodies were diluted in PBS, 10% bovine serum albumin, 0.3% Triton X-100, applied at 1/1000 dilution and incubated for 1 h at 37°C. Finally, sections

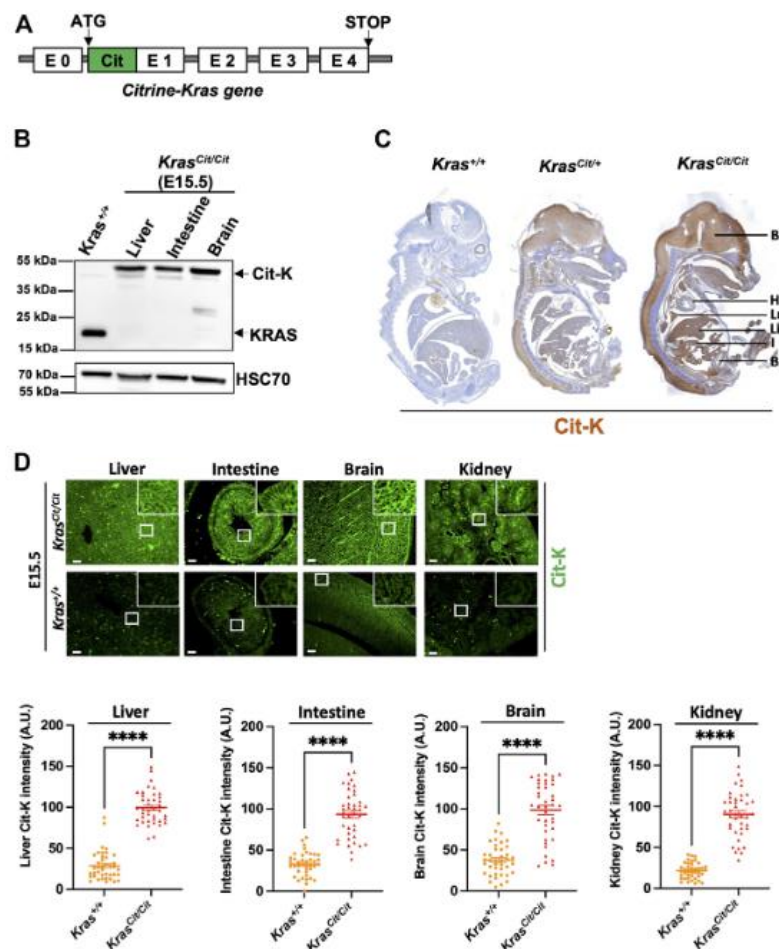


FIGURE 1

Citrine-KRAS (Cit-K) fusion protein is expressed in E15.5 *Kras^{Cit/Cit}* embryos. (A) Construction of the *Kras^{Cit/Cit}* mouse model generation using the CRISPR/Cas9 technology. (B) Western blot on liver, intestine, and brain protein lysates of E15.5 *Kras^{Cit/Cit}* embryos. A KRAS antibody has been used to detect both KRAS and Cit-K. Heat shock cognate protein 70 (HSC70) has been used as loading control. Wild-type KRAS is detected to ~22 kDa and Citrine-KRAS is detected to ~48 kDa, as expected. The *Kras^{+/+}* line corresponds to a protein extract from cells expressing wild-type *Kras* to show wild-type KRAS at the expected size of ~22 kDa. (C) Immunohistochemistry using a GFP antibody (brown) on a whole section of E15.5 *Kras^{+/+}*, *Kras^{Cit/+}* and *Kras^{Cit/Cit}* embryos counterstained with hematoxylin (blue). As expected, weak background was observed on the *Kras^{+/+}* embryo, while the staining was most intense on the *Kras^{Cit/Cit}* embryo. BL, bladder; Br, brain; H, heart; I, intestine; Li, liver; Lu, lung. (D) Cit-K immunolabeling on E15.5 organ sections of *Kras^{+/+}* and *Kras^{Cit/Cit}* embryos. With the exception of intense non-specific labeling in tissue-resident red blood cells, no Cit-K labeling is observed in *Kras^{+/+}* embryos. Graphs represent Cit-K intensity measured by FIJI software. One dot represents the mean of three measures of signal intensity on one cell. Data are represented as mean $\pm$ SEM of 40 cells ($n = 4$ mice). Statistical significance was tested by Student's *t*-test. ****, $p < 0.0001$. A.U. arbitrary unit.

were treated with the lipofuscin autofluorescence quencher (TrueBlack 23007, VWR) for 10 s. GFP labeling of *Kras^{+/+}* tissue sections served as control to monitor the background level. Micrographs were taken with an Axiovert 200 fluorescent microscope (Zeiss) using the AxioVision software or with Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software. Quantifications were performed on at least 3-5 fields per stage/organ using the FIJI (ImageJ) or ZEN softwares.

2.4 Analysis of KRAS subcellular localization

To study the subcellular localization of KRAS at the adult stage, immunofluorescence labeling for Cit-K, E-CADHERIN and DNA was performed on lung, intestine, pancreas and kidney sections of 8-week-old *Kras^{Cit/Cit}* mice. Pictures of the sections were taken with the Cell Observer Spinning Disk Confocal Microscope using the ZEN software. To quantify the

subcellular location of Cit-K, ZEN software was used: membrane *versus* cytoplasmic localization of Cit-K (green) was assessed semi-quantitatively by superimposing it to the signal intensity of E-CADHERIN (red; membrane) and DAPI (blue; nucleus), the area between E-CADHERIN and DAPI labeling being considered as cytoplasmic. Red, green and blue signal intensities were quantified along a line crossing the cell from one side to the other and passing through the nucleus. A discrete score of 0, 1, or 2 was assigned according to the signal intensity: 0 [0–50 arbitrary units (A.U.)], 1 (50–100 A.U.), and 2 (100–150 A.U.). Quantifications were performed on 10 cells per cell type.

2.5 Western blotting

E15.5 embryonic or 8-week-old adult tissues from *Kras^{Cit/Cit}* or *wild-type* mice were lysed and sonicated in lysis buffer composed of 50 mM Tris-Cl, 150 mM Sodium Chloride, 0.25% Sodium Deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM Sodium Orthovanadate, 2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and containing Protease inhibitor (11836153001, Sigma Aldrich). Samples were kept on ice during the procedure. Then, samples were centrifuged (14000 g, 15 min, at 4°C) to pellet cell debris. Proteins were quantified using a Bradford assay. Samples containing 30 or 50 µg total proteins were separated on 12.5% SDS polyacrylamide gels. PVDF membranes (ISEQ00010, Millipore) were blocked with a solution of 5% low-fat milk diluted in Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against KRAS (own antibody) (Assi et al., 2020) or HSC70 (Santa Cruz sc-7298) (dilution 1:1000 for all antibodies). Then, membranes were washed with TBS/0.1% Tween-20 and incubated with secondary antibodies for 1 h at RT. After incubation, membranes were washed with TBS/, 0.1% Tween-20 and revealed using SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34577, Thermo Fisher). HSC70 was used as loading control. Pictures were taken with the Fusion Solo S imaging system (Viber). Densitometry was measured using the FIJI software (ImageJ) and the ratio of the protein of interest over HSC70 was calculated.

2.6 Statistical analysis

Data were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance between two groups was calculated using unpaired Student's t-test. For all statistical analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$. Analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant.

3 Results

3.1 KRAS protein is widely expressed during mouse embryogenesis

To determine the expression pattern of KRAS, we used *Kras^{Cit}* mice which produce a Citrine-KRAS (Cit-K) fusion protein under control of the endogenous *Kras* transcriptional regulatory elements (Assi et al., 2021) (Figure 1A). Therefore, detection of Cit-K on paraffin-embedded tissue sections with help of anti-GFP antibodies (citrine is an improved version of YFP) is a faithful substitute for detection of endogenous KRAS protein.

We generated homozygous *Kras^{Cit/Cit}*, thereby allowing Cit-K to be detected with the best efficiency. Western blot analyses on embryonic organs, including liver, intestine and brain revealed the presence of Cit-K at the expected molecular weight (Figure 1B). Immunohistochemistry on *Kras^{Cit/Cit}* E15.5 embryos showed that most organs express Cit-K protein, whereas no specific signal was detected in *Kras^{+/+}* controls (Figure 1C): a high level of expression was particularly seen in the brain, the lung, the liver, and the intestine. Notably, no/very weak expression was observed in the heart and the inner layer of the bladder. Immunofluorescent labeling of Cit-K on several organs confirmed the wide expression of KRAS (Figure 1D). The specificity of the immunostaining and immunofluorescent labeling in the *Kras^{Cit/Cit}* embryos was confirmed by comparing it with the much lower level of staining and autofluorescence detected in *Kras^{+/+}* embryos (Figures 1C,D). Since Cit-K serves as a surrogate for KRAS, these analyses document for the first time the broad expression profile of KRAS protein during embryonic mouse development.

3.2 KRAS protein expression gradually decreases in the mesenchymal compartment during mouse embryonic development

To study how the expression of KRAS evolves during embryonic development and cell differentiation, we first investigated Cit-K expression during lung development at E13.5, E15.5 and E17.5. By comparing these 3 stages, we observed a decrease of Cit-K expression over time (Figures 2A,B). This decrease mainly affected the lung mesenchyme: quantification of labeling obtained with anti-VIMENTIN and anti-E-CADHERIN antibodies showed that Cit-K expression remained constant in lung E-CADHERIN-positive epithelial cells (Supplementary Figure S1A,B), but significantly decreased in VIMENTIN-positive mesenchyme during progression of embryogenesis (Figures 2A,B).

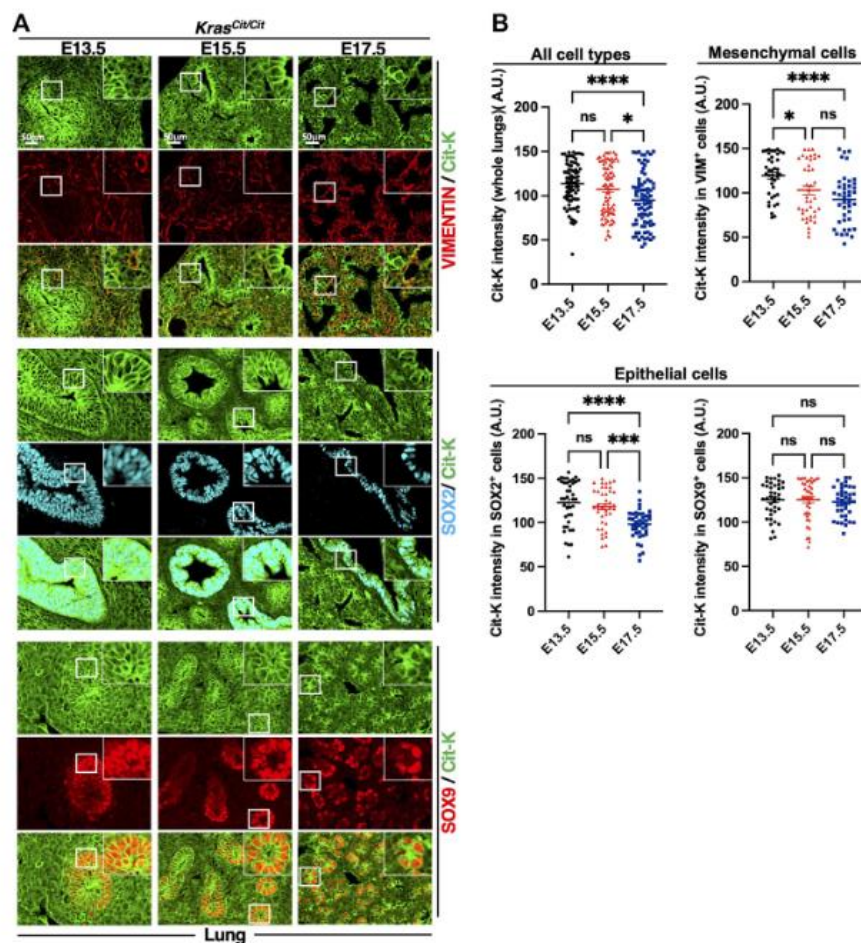


FIGURE 2

Cit-K is expressed in the developing lung. (A) Cit-K, VIMENTIN (VIM), SOX2 and SOX9 immunolabelling performed on lung sections of *Kras*^{Cit/Cit} embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (B) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity. One dot represents the mean of three measures of signal intensity of one cell. Data are represented as mean $\pm$ SEM of 80 or 40 cells ($n = 4$ embryos). Statistical significance was tested by Student's *t*-test. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant. A.U., arbitrary unit.

The embryonic lung can be divided into a proximal and a distal portion, according to the expression of two SRY-box transcription factors, SOX2 and SOX9; SOX2 is found in the proximal airway epithelium whereas SOX9 is present in the distal lung epithelium (Hawkins et al., 2016). To investigate how KRAS expression evolved in the epithelium of both portions, we performed co-labeling of Cit-K and SOX factors. We observed that Cit-K expression decreased in the SOX2⁺ cells but stayed constant in SOX9⁺ cells (Figures 2A,B).

In intestine and kidney, progressive decrease of Cit-K expression was observed during embryogenesis, and, like in the lung, the decrease was predominant in the mesenchymal compartment (Figures 3A–D). Similar conclusions could be drawn from the analysis of the developing heart (Figures

4A,B). In contrast, in the nervous system, namely in the brain or dorsal root ganglia, the dynamics of Cit-K expression appeared different: brain neurons labeled for the marker NeuN showed increased Cit-K expression during development, whereas a decrease was detected in dorsal root ganglia (Figures 4C,D).

Finally, we investigated KRAS expression in the embryonic liver. Cit-K expression showed a transient decrease in the mesenchyme between E13.5 and E15.5, but no additional reduction was detected at E17.5. In the epithelial compartment (Supplementary Figure S1C,D), Cit-K expression remained constant at all three stages tested in the SOX9⁺ (cholangiocytes) and HNF4⁺ (hepatoblasts and hepatocytes) cells (Figures 5A,B).

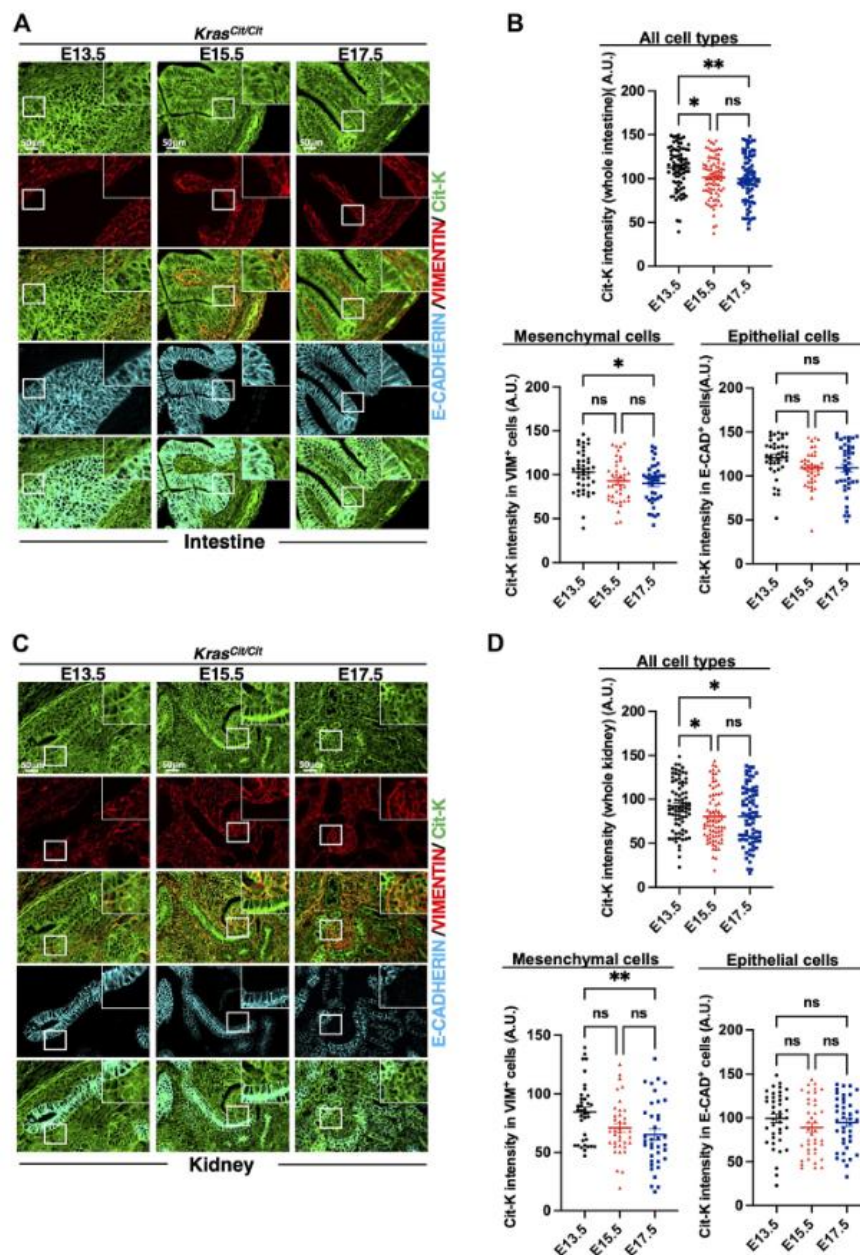
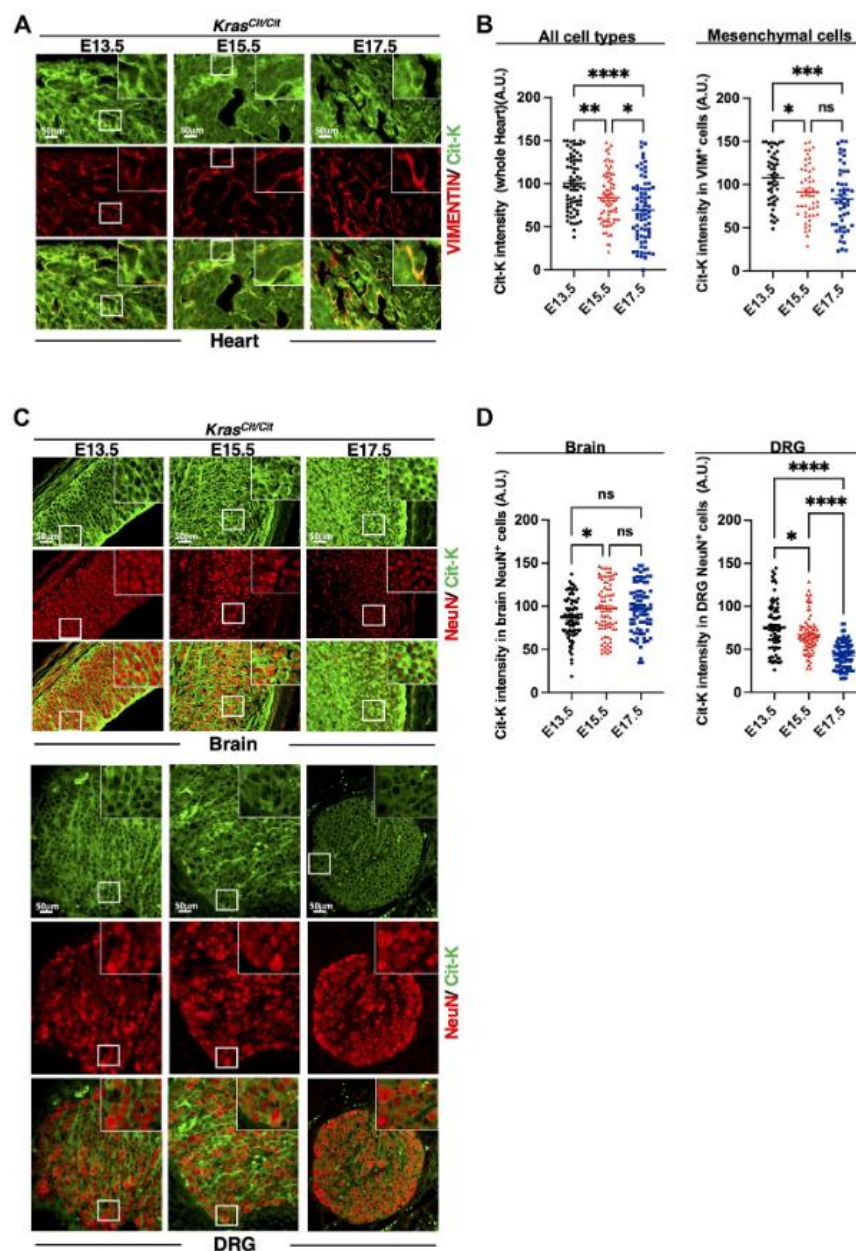


FIGURE 3

Cit-K expression is found in the developing intestine and kidney. (A,C) Immunolabeling for Cit-K, VIMENTIN (VIM) and E-CADHERIN (E-CAD) performed on embryonic intestine (A) and kidney (C) sections of *Kras^{Cit/K}* embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (B,D) Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in mesenchymal (VIM⁺) and epithelial (E-CAD⁺) cells of the embryonic intestine (B) and kidneys (D). One dot represents the mean of three measures of signal intensity of one cell. Data are represented as mean $\pm$ SEM of 80 ($n = 4$ embryos). Statistical significance was tested by Student's *t*-test. *, $p < 0.05$; ns, not significant. A.U., arbitrary unit.

**FIGURE 4**

Cit-K expression is present in heart, dorsal root ganglion (DRG), and brain. **(A)** Immunolabeling for Cit-K and VIMENTIN (VIM) on heart sections of *Kras^{Cit/Cit}* embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. **(B)** Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in whole heart tissue and mesenchymal (VIM⁺) cells. Data are represented as mean $\pm$ SEM of 80 ($n = 4$ embryos). **(C)** Immunolabeling for Cit-K and NeuN (epithelial neuronal cell) on brain and dorsal root ganglion (DRG) sections of *Kras^{Cit/Cit}* embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. Comparison between DRG sections of *Kras^{+/+}* and *Kras^{Cit/Cit}* embryos (not shown) indicate that strong Cit-K labelling observed in nervous fibers is non-specific and can be explained by the auto-fluorescence of nervous fibers. **(D)** Quantification by FIJI software of Cit-K signal intensity in epithelial neuronal (NeuN⁺) cells. One dot represents the mean of three measures of signal intensity in one cell. Data are represented as mean $\pm$ SEM of 80 cells ($n = 4$ embryos). Statistical significance was tested by Student's t-test. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ and ns, not significant. A.U. arbitrary unit.

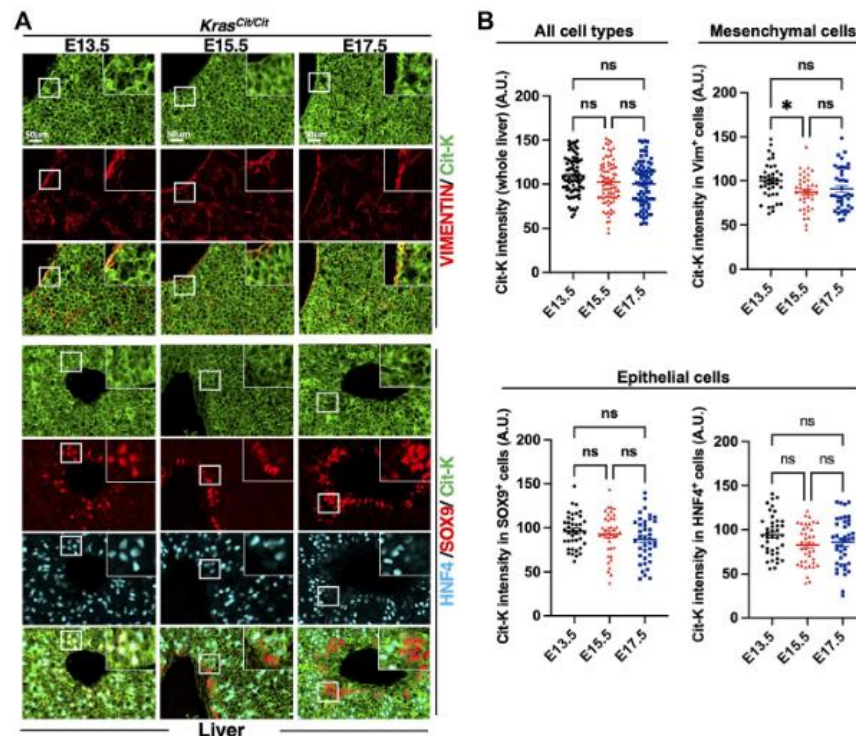


FIGURE 5

Cit-K is expressed in embryonic liver. (A) Immunolabeling for Cit-K, VIMENTIN (VIM), SRY-box transcription factor 9 (SOX9), and Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) performed on liver sections of *Kras^{Clt/Clt}* embryos at E13.5, E15.5 and E17.5. (B) Quantification by Fiji software of Cit-K signal intensity in the whole liver, mesenchymal (VIM⁺) cells, and two types of liver epithelial cells (SOX9⁺ or HNF4⁺ cells). One dot represents the mean of three measures of signal intensity in one cell. Data are represented as mean $\pm$ SEM of 80 or 40 cells ($n = 4$ embryos). Statistical significance was tested by Student's *t*-test. *, $p < 0.05$; ns, not significant. A.U. arbitrary unit.

We concluded that KRAS protein expression in development is dynamic and tissue-specific, and that overall it is maintained in epithelial cells but tends to become progressively reduced in the mesenchymal compartment of several organs.

3.3 In adult tissues, KRAS protein expression is found in specific cell types

Next, we studied how the pattern and levels of expression of KRAS evolved from the embryonic to the adult stage, and thus characterized Cit-K expression in several adult tissues and compared it with the embryonic period. We observed that Cit-K expression was maintained at a high level in E-CADHERIN⁺ epithelial cells of lung and intestine (Figure 6A). Cit-K expression in VIMENTIN⁺ mesenchymal cells of the intestine was lower after birth as compared to E17.5, resulting in a ratio of the intensity of epithelial Cit-K labeling on mesenchymal Cit-K labeling that increases over time (Figure 6A). In lung, this ratio remained unchanged between E17.5 and adult stage.

In kidney, this ratio decreased because of persistent high expression of Cit-K in the VIMENTIN⁺ glomerular cells and lowering expression in epithelia (Figures 6A,B). Conversely, the epithelial Cit-K/mesenchymal Cit-K ratio increased in liver between E17.5 and adults (Figures 6A,B); this increase resulted from stable Cit-K expression in the VIMENTIN⁺ compartment, essentially comprising the periportal mesenchyme, associated with rising Cit-K expression in the biliary epithelial cells. Importantly, Cit-K expression dropped after birth in hepatocytes, while Cit-K expression was observed in sinusoidal cells (Supplementary Figure S2A–C).

Cit-K expression in heart was in sharp contrast to that in other organs, because it decreased drastically after birth (Figures 6A,C); this result was also confirmed by Western blotting (Figure 6D). Low Cit-K expression remained detectable in VIMENTIN⁺ cells, while Cit-K was nearly not detected in the cardiomyocytes (Supplementary Figure S3A). Finally, Cit-K was absent in adult smooth and skeletal muscles (Supplementary Figure S3B and not shown). Taken together, our results reveal a highly dynamic and cell-type specific profile of KRAS protein

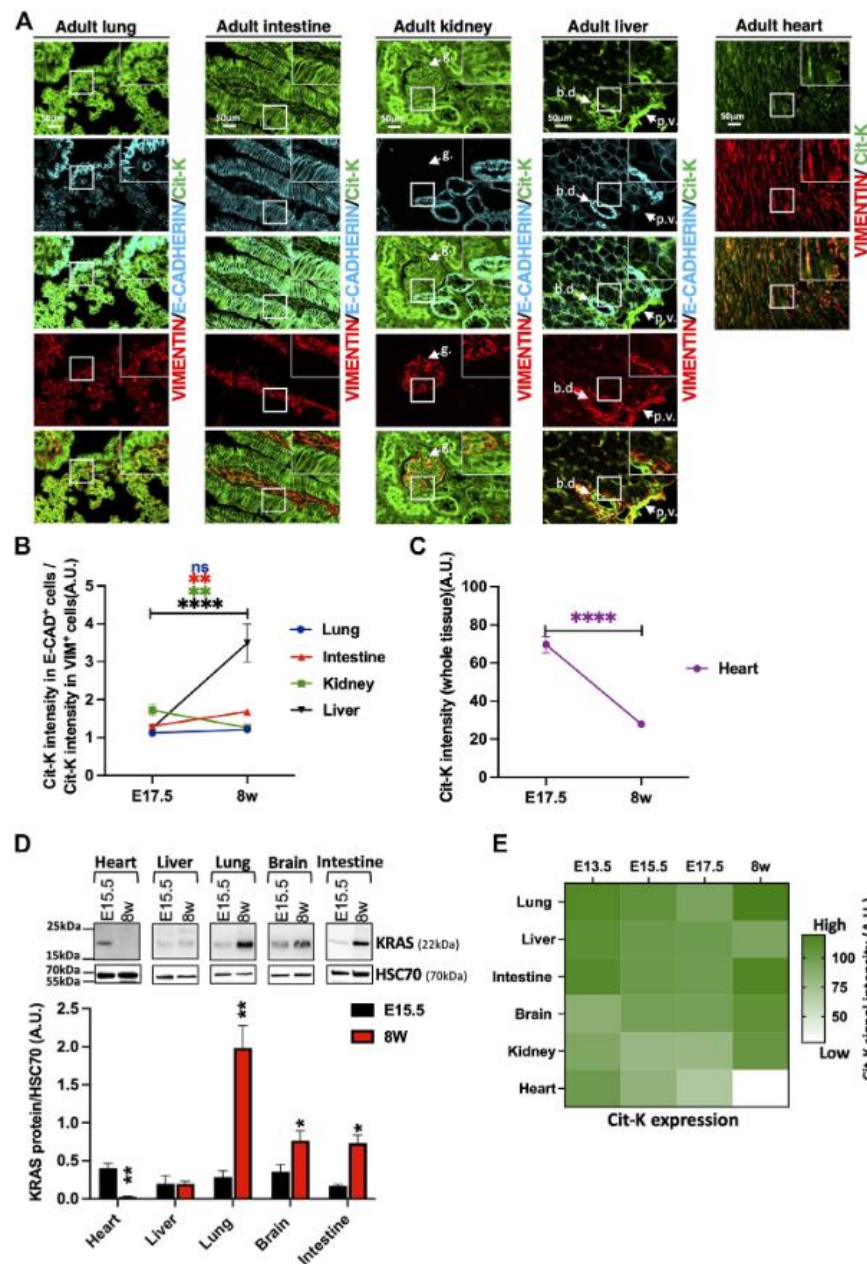


FIGURE 6

KRAS shows an organ- and cell type-specific expression pattern in adult mice. (A) Immunolabelling performed on lung, intestine, kidney, liver, and heart sections of 8-week-old *Kras*^{Cit/Cit} mice for Cit-K, E-CADHERIN, as epithelial cell marker, and VIMENTIN (VIM), as mesenchymal cell marker. g, glomerulus; bd, bile duct; pv, portal vein. (B) Graph representing the ratio between the intensity of Cit-K labeling in epithelial E-CAD⁺ cells and that in mesenchymal VIM⁺ cells at E17.5 and the adult stage (8w, 8 weeks). Data are represented as mean ± SEM of 40 cells (n = 4 mice). (C) Graph representing the Cit-K signal intensity (right) in the heart during embryogenesis and at the adult stage. Data are represented as mean ± SEM of 40 cells (n = 4 mice). (D) Western blot analysis on total heart, liver, lung, brain and intestine lysate from E15.5 embryos (n = 4) and adult CD1 mice. A KRAS antibody has been used to detect KRAS. Heat shock cognate protein 70 (HSC70) has been used as loading control. Measure was performed by FIJI software, and statistical significance between E17.5 and 8w or E15.5 and 8w were tested by Student's t-test. Data are represented as mean ± SEM. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; ****, p < 0.0001; ns, not significant. A.U. arbitrary unit. (E) Heatmap summarizing the Cit-K expression levels observed in the different organs at the different developmental stages indicated. The heatmap generated with Graphpad Prism was constructed from the mean levels of Cit-K expression measured in the different tissues at different times. A.U. arbitrary unit.

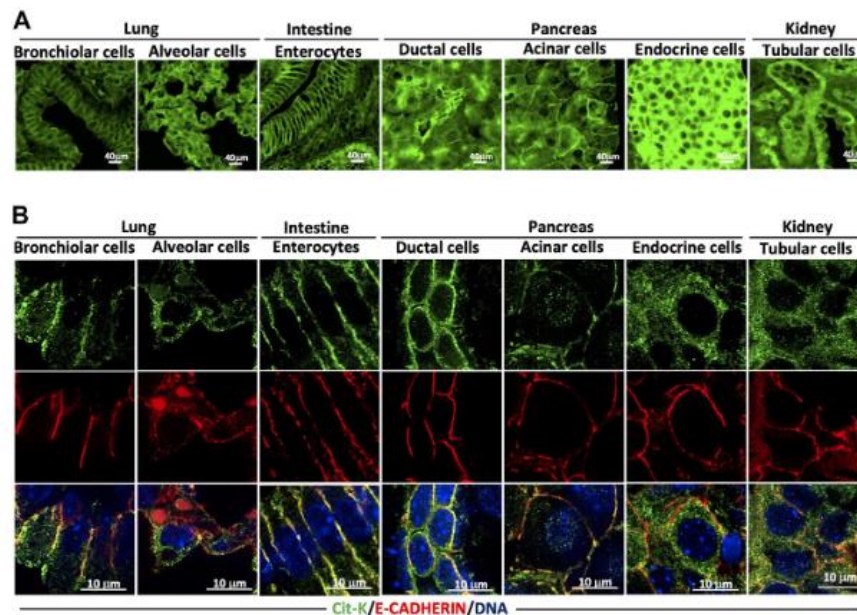


FIGURE 7

The cellular localization of KRAS varies according to the cell type. (A) Immunolabelling performed on lung, intestine, pancreas, and kidney sections of 8-week-old *Kras^{cit/cit}* mice for Cit-K. (B) Confocal images of Cit-K and E-CADHERIN (E-CAD; used as a cell membrane marker) immunolabelling performed on lung, intestine, pancreas, and kidney sections of 8-week-old *Kras^{cit/cit}* mice. DAPI was used to visualize cell nuclei.

expression which varies substantially from one organ to the other during growth from the prenatal to the adult period (Figure 6E).

3.4 KRAS protein expression is detected at the cell membrane and in the cytoplasm

Many *in vitro* studies have shown that KRAS has to be localized to the cell membrane to activate its downstream signaling pathways (reviewed in Haidar & Jacquemin, 2021). However, we found that the steady-state localization of Cit-K was predominant at the membrane in a number of tissues, and cytoplasmic in others. Our observations above (see for example the kidney in Figure 6A) suggest that this is not always the case *in vivo*. Low magnification pictures at first sight indicated that lung bronchiolar cells and intestinal enterocytes showed KRAS enrichment at the cell membrane, while alveolar cells, pancreatic endocrine cells and renal tubular cells showed the presence of significant amount of KRAS in their cytoplasm (Figure 7A). Indeed, confocal imaging of co-labeling with GFP, E-CADHERIN, and DAPI enabled us to subcellularly locate Cit-K and to semi-quantitatively assess its subcellular distribution, as described in Materials and Methods. This revealed that in the bronchiolar cells and enterocytes, Cit-K was preferentially present at the cell membrane, while in the

alveolar, endocrine and tubular cells, Cit-K was equally partitioned between the membrane and the cytoplasm (Figure 7B). Double immunolabeling for Cit-K and for a marker of lysosomes, endoplasmic reticulum, and mitochondria indicated that Cit-K does not colocalize with these cellular organelles (Supplementary Figure S4).

4 Discussion

Since its discovery more than 40 years ago, multiple functions have been attributed to KRAS, including in cell proliferation, differentiation and apoptosis. From immunostaining studies performed shortly after its discovery (Chesa et al., 1987; Furth et al., 1987), it was assumed that KRAS was expressed ubiquitously; however, these studies have not been confirmed, and their conclusions were challenged when the capacity of available anti-KRAS antibodies to immunostain KRAS on tissues was questioned (Waters et al., 2017).

Previous KRAS expression data obtained by Northern or Western blotting came from bulk samples, preventing a clear idea of its expression pattern at the cell level. To address this issue in the absence of valid antibodies, we used the *Kras^{cit}* mouse model which allows to detect the expression of KRAS using a GFP antibody (Assi et al., 2021). It should be noted that our *Kras^{cit}*

mouse model detects both splicing isoforms of KRAS, KRAS4 and KRAS4B. As the *Kras^{Cit}* fusion gene is located in the endogenous *Kras* locus, the resulting mRNA is expected to be spliced identically to endogenous *Kras* mRNA, yielding Cit-K4A and Cit-K4B proteins in an identical expression ratio to KRAS4A and KRAS4B proteins.

Our results show that KRAS is widely expressed in embryonic tissues. As embryogenesis progresses, its expression becomes tissue-restricted; this restriction is most prominent in the mesenchymal compartment, allowing us to conclude that KRAS expression is epithelial-enriched as birth approaches. After birth, this trend continues and is also accompanied by preferential expression in specific cell types. Low KRAS expression in the mesenchyme may explain why KRAS is weakly expressed in sarcomas and why KRAS mutations are rare in this type of cancer (AACR Project GENIE Consortium, 2017). From a functional point of view, it would be interesting to study whether the effectors downstream of KRAS are identical between epithelial and mesenchymal cell types. This could help understanding why KRAS gene amplification is associated with epithelial-to-mesenchymal transition and the degree of dedifferentiation in pancreatic cancer (Mueller et al., 2018).

A comparison of *Kras* mRNA (Leon et al., 1987) and Cit-K expression confirms the presence of *Kras* mRNA and KRAS protein in many organs. This comparison also confirms the absent or very low expression in skeletal muscle. In contrast, this study revealed significant expression of *Kras* mRNA in the heart. This difference compared to our study can be explained by the fact that we do not observe any expression in the cardiomyocytes, but that an expression is indeed detected in other cell types of the heart (e.g. in CD31⁺ cells) or by the presence of post-transcriptional regulatory mechanisms. The absence of KRAS expression in cardiomyocytes is surprising as a heart defect is probably the cause of the death in *Kras^{-/-}* embryos (Korea et al., 1997). This can be explained either by an early expression of KRAS in the cardiomyocytes (before e13.5) or by the defect of another organ which affects the developing heart.

Interestingly, we observe KRAS expression in liver sinusoidal cells, a specialized endothelial cell type found notably in the organ. This observation may be linked to the discovery that KRAS mutations in these cells specifically lead to the development of hepatic vascular cavernomas (Janardhan et al., 2020), a benign tumor of the liver characterized by the presence of dilated endothelial-lined vascular spaces.

Our data show KRAS protein expression in several tissues. Muscle cells are a notable exception, regardless of their type (skeletal, cardiac, or smooth), as they exhibit low or undetectable KRAS expression. This suggests that the presence of a thin ventricular myocardium observed in *Kras^{-/-}* embryos (Koera et al., 1997) results from a non-cell autonomous mechanism or from dysfunction of another organ that indirectly impacts cardiomyocyte function.

KRAS activity requires its location at the cell membrane, but our study reveals that KRAS can be observed in significant amounts in the cytoplasm in a subset of cell types. This is in sharp contrast with cultured cell lines where KRAS is essentially membrane-bound. Therefore, our *Kras^{Cit}* mouse model represents an interesting tool to investigate the subcellular location of KRAS in tissues in a physiological or pathophysiological setting. In that context, the induction of enzymes that catalyze post-translational modifications of KRAS necessary for its membrane localization was shown to be highly context-dependent (Assi et al., 2020). Moreover, cytoplasmic expression of KRAS was associated with resistance of pancreatic acinar cells to tumor-promoting KRAS mutations: KRAS mutants were expressed, but not properly located for exerting their function (Assi et al., 2020). We therefore speculate that our present data showing KRAS predominantly in the cytoplasm of pancreatic endocrine cells provides an explanation to the insulin-producing β cells' refractoriness to KRAS-mediated transformation (Gidekel Friedlander et al., 2009). A limitation of our study is the use of a fusion protein which could be processed differently and present a different trafficking from the endogenous form; still our validation of the Cit-K fusion protein (Assi et al., 2021) does not support this.

In conclusion, our results unravel the developmental, tissular, cell-specific and subcellular expression profile of KRAS protein, and provide insight into the mechanisms conferring sensitivity to KRAS mutations during tumor initiation. They also underscore the usefulness of *Kras^{Cit}* mice, and suggest the development of similar approaches to investigate the biology of the other two members of the RAS family, NRAS and HRAS.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Animal welfare committee of the UCLouvain Health Sciences Sector.

Author contributions

M-AM, MA and PJ contributed to conception and design of the study. M-AM, MA, ML and SC performed the data acquisition. M-AM performed the statistical analysis. M-AM, MA and PJ performed the data analysis and data interpretation. M-AM wrote the first draft of the manuscript. M-AM, MA, and

PJ contributed to manuscript revision. FL critically revised the manuscript. All authors approve the submitted version.

Funding

This work was supported by grants from the Foundation for Cancer Research (#2018–078, and #2018–076 to F.P. Lemaigre and P. Jacquemin) and Télévie (#7.4595.15 and #7.4502.16 to F.P. Lemaigre and P. Jacquemin). MM and ML hold a Télévie fellowship. MA is Research Assistant at the National Fund for Scientific Research (FRS-FNRS, Belgium). P. Jacquemin is Research Director at FRS-FNRS, Belgium.

Acknowledgments

The authors thank the members of the LPAD laboratory for help and discussions, Jean-Nicolas Lodewyckx and Hajar Dahou for mouse genotyping, and Bruno Maricq for their help in mouse care.

References

- AACR Project GENIE Consortium (2017). AACR Project GENIE: Powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discov.* 7 (8), 818–831. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0151
- Assi, M., Achouri, Y., Lorient, A., Dauguet, N., Dahou, H., Baldan, J., et al. (2021). Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Res.* 81 (10), 2679–2689. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-2976
- Assi, M., Pirlot, B., Stroobant, V., Thissen, J.-P., and Jacquemin, P. (2020). A novel KRAS antibody highlights a regulation mechanism of post-translational modifications of KRAS during tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (17), 6361. doi:10.3390/ijms21176361
- Barbacid, M. (1987). Ras GENES. *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1), 779–827. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.004023
- Chesa, P. G., Rettig, W. J., Melamed, M. R., Old, L. J., and Niman, H. L. (1987). Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: Lack of association with proliferation and malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (10), 3234–3238. doi:10.1073/pnas.84.10.3234
- Cox, A. D., Der, C. J., and Phillips, M. R. (2015). Targeting RAS membrane association: Back to the future for anti-RAS drug discovery? *Clin. Cancer Res.* 21 (8), 1819–1827. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3214
- Furth, M. E., Aldrich, T. H., and Cordon-Cardo, C. (1987). Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1 (1), 47–58.
- Gidekel Friedlander, S. Y., Chu, G. C., Snyder, E. L., Gurnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., et al. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* 16 (5), 379–389. doi:10.1016/j.ccr.2009.09.027
- Haidar, M., and Jacquemin, P. (2021). Past and future strategies to inhibit membrane localization of the kras oncogene. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (24), 13193. doi:10.3390/ijms222413193
- Hawkins, F., Rankin, S. A., Kotton, D. N., and Zorn, A. M. (2016). "The genetic programs regulating embryonic lung development and induced pluripotent stem cell differentiation," in *Fetal and Neonatal lung development*. Editors A. Jobe, J. Whitsett, and S. Abman (Cambridge University Press), 1–21. doi:10.1017/CBO9781139680349.002

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.995013/full#supplementary-material>

- Janardhan, H. P., Meng, X., Dresser, K., Hutchinson, L., and Trivedi, C. M. (2020). KRAS or BRAF mutations cause hepatic vascular cavernomas treatable with MAP2K-MAPK1 inhibition. *J. Exp. Med.* 217 (7), e20192205. doi:10.1084/jem.20192205
- Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., et al. (1997). K-Ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15(10):1151–1159.
- Leon, J., Guerrero, I., and Pellicer, A. (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol. Cell. Biol.* 7 (4), 1535–1540. doi:10.1128/mcb.7.4.1535
- Lowy, D. R., and Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1), 851–891. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.004223
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., et al. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 554 (7690), 62–68. doi:10.1038/nature25459
- Nakamura, K., Ichise, H., Nakao, K., Hatta, T., Otani, H., Sakagami, H., et al. (2008). Partial functional overlap of the three ras genes in mouse embryonic development. *Oncogene* 27 (21), 2961–2968. doi:10.1038/sj.onc.1210956
- Newlaczyl, A. U., Coulson, J. M., and Prior, I. A. (2017). Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. *Sci. Rep.* 7, 41297. doi:10.1038/srep41297
- Prior, I. A., and Hancock, J. F. (2012). Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2), 145–153. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.002
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., and McCormick, F. (2017). RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell* 170 (1), 17–33. doi:10.1016/j.cell.2017.06.009
- Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. G., and McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* 25 (3), 272–281. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.017
- Waters, A. M., Ozkan-Dagliyan, I., Vaseva, A. v., Fer, N., Strathern, L. A., Hobbs, G. A., et al. (2017). Evaluation of the selectivity and sensitivity of isoform- and mutation-specific RAS antibodies. *Sci. Signal.* 10 (498), eaao3332. doi:10.1126/scisignal.aao3332

Références

- ¹ Barnard FR (1921). One look is worth a thousand words. Advertisement in Printers' Ink.
- ² Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e219-e219.
- ³ Batterham, R. L., Le Roux, C. W., Cohen, M. A., Park, A. J., Ellis, S. M., Patterson, M., ... & Bloom, S. R. (2003). Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8), 3989-3992.
- ⁴ Katsuura, G., Asakawa, A., & Inui, A. (2002). Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*, 23(2), 323-329.
- ⁵ Napolitano, T., Silvano, S., Vieira, A., Balaji, S., Garrido-Utrilla, A., Friano, M. E., ... & Collombat, P. (2018). Role of ghrelin in pancreatic development and function. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20, 3-10.
- ⁶ Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, 20(10), 1218-1249.
- ⁷ Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- ⁸ Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- ⁹ Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 388(10039), 73-85.
- ¹⁰ Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), 9694.
- ¹¹ Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039-1049.
- ¹² Luchini, C., Capelli, P., & Scarpa, A. (2016). Pancreatic ductal adenocarcinoma and its variants. *Surgical Pathology Clinics*, 9(4), 547-560.
- ¹³ Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., ... & Hruban, R. H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern Pathology*, 16(9), 902-912.
- ¹⁴ Cooper, C. L., O'Toole, S. A., & Kench, J. G. (2013). Classification, morphology and molecular pathology of premalignant lesions of the pancreas. *Pathology*, 45(3), 286-304.

-
- ¹⁵ Singhi, A. D., Koay, E. J., Chari, S. T., & Maitra, A. (2019). Early detection of pancreatic cancer: opportunities and challenges. *Gastroenterology*, 156(7), 2024-2040.
- ¹⁶ Overbeek, K. A., Cahen, D. L., Canto, M. I., & Bruno, M. J. (2016). Surveillance for neoplasia in the pancreas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(6), 971-986.
- ¹⁷ Carpenter, E. S., Elhossiny, A. M., Kadiyala, P., Li, J., McGue, J., Griffith, B. D., ... & Pasca di Magliano, M. (2023). Analysis of donor pancreata defines the transcriptomic signature and microenvironment of early neoplastic lesions. *Cancer Discovery*, 13(6), 1324-1345.
- ¹⁸ Marstrand-Daucé, L., Lorenzo, D., Chassac, A., Nicole, P., Couvelard, A., & Haumaitre, C. (2023). Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9946.
- ¹⁹ Pinho, A. V., Chantrill, L., & Rooman, I. (2014). Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 345(2), 203-209.
- ²⁰ Prévot, P. P., Simion, A., Grimont, A., Colletti, M., Khalaileh, A., Van den Steen, G., ... & Jacquemin, P. (2012). Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut*, 61(12), 1723-1732.
- ²¹ Nipper, M., Xu, Y., Liu, J., Yin, X., Liu, Z., Ye, Z., ... & Wang, P. (2024). TGFβ and Hippo Signaling Pathways Coordinate to Promote Acinar to Ductal Metaplasia in Human Pancreas. *Cells*, 13(2), 186.
- ²² Ren, B., Liu, X., & Suriawinata, A. A. (2019). Pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor lesions: histopathology, cytopathology, and molecular pathology. *The American Journal of Pathology*, 189(1), 9-21.
- ²³ Kim, M. P., & Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 161-168.
- ²⁴ Morris IV, J. P., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 10(10), 683-695.
- ²⁵ Whatcott, C. J., Diep, C. H., Jiang, P., Watanabe, A., LoBello, J., Sima, C., ... & Han, H. (2015). Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(15), 3561-3568.
- ²⁶ Öhlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D. (2014). Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1503-1523.
- ²⁷ Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 418-429.
- ²⁸ Feig, C., Jones, J. O., Kraman, M., Wells, R. J., Deonaraine, A., Chan, D. S., ... & Fearon, D. T. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes

with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20212-20217.

²⁹ Zhang, Z., Zhang, H., Shi, L., Wang, D., & Tang, D. (2022). Heterogeneous cancer-associated fibroblasts: A new perspective for understanding immunosuppression in pancreatic cancer. *Immunology*, 167(1), 1-14.

³⁰ Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A. S., Ponz-Sarvise, M., ... & Tuveson, D. A. (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 214(3), 579-596.

³¹ Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., ... & Tuveson, D. A. (2019). IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGF β to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, 9(2), 282-301.

³² Elyada, E., Bolisetty, M., Laise, P., Flynn, W. F., Courtois, E. T., Burkhart, R. A., ... & Tuveson, D. A. (2019). Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. *Cancer Discovery*, 9(8), 1102-1123.

³³ Huang, H., Wang, Z., Zhang, Y., Pradhan, R. N., Ganguly, D., Chandra, R., ... & Brekken, R. A. (2022). Mesothelial cell-derived antigen-presenting cancer-associated fibroblasts induce expansion of regulatory T cells in pancreatic cancer. *Cancer Cell*, 40(6), 656-673.

³⁴ Beatty, G. L., Werba, G., Lyssiotis, C. A., & Simeone, D. M. (2021). The biological underpinnings of therapeutic resistance in pancreatic cancer. *Genes & Development*, 35(13-14), 940-962.

³⁵ Khalaf, N., El-Serag, H. B., Abrams, H. R., & Thrift, A. P. (2021). Burden of pancreatic cancer: from epidemiology to practice. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 19(5), 876-884.

³⁶ Lynch, S. M., Vrieling, A., Lubin, J. H., Kraft, P., Mendelsohn, J. B., Hartge, P., ... & Stolzenberg-Solomon, R. Z. (2009). Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *American Journal of Epidemiology*, 170(4), 403-413.

³⁷ Larsson, S. C., Permert, J., Håkansson, N., Näslund, I., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2005). Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *British Journal of Cancer*, 93(11), 1310-1315.

³⁸ Taunk, P., Hecht, E., & Stolzenberg-Solomon, R. (2016). Are meat and heme iron intake associated with pancreatic cancer? Results from the NIH-AARP diet and health cohort. *International Journal of Cancer*, 138(9), 2172-2189.

³⁹ Wong, M. C., Jiang, J. Y., Liang, M., Fang, Y., Yeung, M. S., & Sung, J. J. (2017). Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Scientific Reports*, 7(1), 3165.

⁴⁰ Klein, A. P. (2023). Familial pancreatic cancer. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery*, 951-956.

-
- ⁴¹ Anand, N., Sampath, K., & Wu, B. U. (2013). Cyst features and risk of malignancy in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 913-921.
- ⁴² Park, S. M., Kim, K. B., Han, J. H., Kim, N., Kang, T. U., Swan, H., & Kim, H. J. (2023). Incidence and risk of pancreatic cancer in patients with acute or chronic pancreatitis: a population-based cohort study. *Scientific Reports*, 13(1), 18930.
- ⁴³ Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*, 381(1), 269-277.
- ⁴⁴ Whitcomb, D. C., Frulloni, L., Garg, P., Greer, J. B., Schneider, A., Yadav, D., & Shimosegawa, T. (2016). Chronic pancreatitis: an international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. *Pancreatology*, 16(2), 218-224.
- ⁴⁵ Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(3), 349-358.
- ⁴⁶ Hart, P. A., & Conwell, D. L. (2020). Chronic pancreatitis: managing a difficult disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 115(1), 49.
- ⁴⁷ Algül, H., Treiber, M., Lesina, M., & Schmid, R. M. (2007). Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas—a potential role for pancreatic stellate cells?. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 4(8), 454-462.
- ⁴⁸ Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., ... & Lolla, L. (2017). Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 32(2), 185-203.
- ⁴⁹ Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., ... & Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), 730-733.
- ⁵⁰ Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001008.
- ⁵¹ Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 828-851.
- ⁵² Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, 25(3), 272-281.
- ⁵³ Waters, A. M., & Der, C. J. (2017). KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a031435.
- ⁵⁴ Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 517-531.
- ⁵⁵ Ahearn, I., Zhou, M., & Philips, M. R. (2018). Posttranslational modifications of RAS proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(11), a031484.

-
- ⁵⁶ Bivona, T. G., Quatela, S. E., Bodemann, B. O., Ahearn, I. M., Soskis, M. J., Mor, A., ... & Philips, M. R. (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Molecular Cell*, 21(4), 481-493.
- ⁵⁷ Jang, H., Abraham, S. J., Chavan, T. S., Hitchinson, B., Khavrutskii, L., Tarasova, N. I., ... & Gaponenko, V. (2015). Mechanisms of membrane binding of small GTPase K-Ras4B farnesylated hypervariable region. *Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9465-9477.
- ⁵⁸ Haidar, M., & Jacquemin, P. (2021). Past and future strategies to inhibit membrane localization of the kras oncogene. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13193.
- ⁵⁹ Whitley, M. J., Tran, T. H., Rigby, M., Yi, M., Dharmaiah, S., Waybright, T. J., ... & Simanshu, D. K. (2024). Comparative analysis of KRAS4a and KRAS4b splice variants reveals distinctive structural and functional properties. *Science Advances*, 10(7), eadj4137.
- ⁶⁰ Salmón, M., Paniagua, G., Lechuga, C. G., Fernández-García, F., Zarzuela, E., Álvarez-Díaz, R., ... & Barbacid, M. (2021). KRAS4A induces metastatic lung adenocarcinomas in vivo in the absence of the KRAS4B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(30), e2023112118.
- ⁶¹ Zhang, Z., Zhang, H., Liao, X., & Tsai, H. I. (2023). KRAS mutation: The booster of pancreatic ductal adenocarcinoma transformation and progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1147676.
- ⁶² Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., ... & Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature*, 370(6490), 527-532.
- ⁶³ Cuevas, B. D., Abell, A. N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, 26(22), 3159-3171.
- ⁶⁴ Dai, M., Jahanzaib, R., Liao, Y., Yao, F., Li, J., Teng, X., ... & Cheng, W. (2022). Prognostic value of KRAS subtype in patients with PDAC undergoing radical resection. *Frontiers in Oncology*, 12, 1074538.
- ⁶⁵ Nusrat, F., Khanna, A., Jain, A., Jiang, W., Lavu, H., Yeo, C. J., ... & Nevler, A. (2024). The Clinical Implications of KRAS Mutations and Variant Allele Frequencies in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, 13(7), 2103.
- ⁶⁶ Yousef, A., Yousef, M., Chowdhury, S., Abdilleh, K., Knafl, M., Edelkamp, P., ... & Zhao, D. (2024). Impact of KRAS mutations and co-mutations on clinical outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *NPJ Precision Oncology*, 8(1), 27.
- ⁶⁷ Hobbs, G. A., Baker, N. M., Miermont, A. M., Thurman, R. D., Pierobon, M., Tran, T. H., ... & Der, C. J. (2020). Atypical KRASG12R mutant is impaired in PI3K signaling and macropinocytosis in pancreatic cancer. *Cancer Discovery*, 10(1), 104-123.
- ⁶⁸ Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., di Magliano, M. P., & Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*, 186(8), 1729-1754.

-
- ⁶⁹ Kim, H., Kim, M., Im, S. K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 147-159.
- ⁷⁰ Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., ... & Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*, 11(3), 291-302.
- ⁷¹ Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., ... & Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & Development*, 15(24), 3243-3248.
- ⁷² Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., ... & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437-450.
- ⁷³ Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., ... & Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469-483.
- ⁷⁴ Assi, M., Achouri, Y., Lorient, A., Dauguet, N., Dahou, H., Baldan, J., ... & Jacquemin, P. (2021). Dynamic regulation of expression of KRAS and its effectors determines the ability to initiate tumorigenesis in pancreatic acinar cells. *Cancer Research*, 81(10), 2679-2689.
- ⁷⁵ Lee, A. Y., Dubois, C. L., Sarai, K., Zarei, S., Schaeffer, D. F., Sander, M., & Kopp, J. L. (2018). Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*, gutjnl-2017.
- ⁷⁶ Kim, H. (2008). Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut and liver*, 2(2), 74.
- ⁷⁷ Hyun, J. J., & Lee, H. S. (2014). Experimental models of pancreatitis. *Clinical Endoscopy*, 47(3), 212-216.
- ⁷⁸ Thrower, E. C., Osgood, S., Shugrue, C. A., Kolodecik, T. R., Chaudhuri, A. M., Reeve Jr, J. R., ... & Gorelick, F. S. (2008). The novel protein kinase C isoforms- δ and- ϵ modulate caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(6), G1344-G1353.
- ⁷⁹ Fleming, A. K., & Storz, P. (2017). Protein kinase C isoforms in the normal pancreas and in pancreatic disease. *Cellular Signalling*, 40, 1-9.
- ⁸⁰ Gukovskaya, A. S., Vaquero, E., Zaninovic, V., Gorelick, F. S., Lusi, A. J., Brennan, M. L., ... & Pandolfi, S. J. (2002). Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 122(4), 974-984.
- ⁸¹ Aghdassi, A. A., Mayerle, J., Christochowitz, S., Weiss, F. U., Sandler, M., & Lerch, M. M. (2011). Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4, 1-16.

-
- ⁸² Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., ... & Bachet, J. B. (2018). FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(25), 2395-2406.
- ⁸³ Groot, V. P., Rezaee, N., Wu, W., Cameron, J. L., Fishman, E. K., Hruban, R. H., ... & He, J. (2018). Patterns, timing, and predictors of recurrence following pancreatectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Surgery*, 267(5), 936-945.
- ⁸⁴ Adamska, A., Domenichini, A., & Falasca, M. (2017). Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1338.
- ⁸⁵ Dbouk, M., Katona, B. W., Brand, R. E., Chak, A., Syngal, S., Farrell, J. J., ... & Goggins, M. (2022). The multicenter cancer of pancreas screening study: impact on stage and survival. *Journal of Clinical Oncology*, 40(28), 3257.
- ⁸⁶ Hu, Z. I., & O'Reilly, E. M. (2023). Therapeutic developments in pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1-18.
- ⁸⁷ Mavros, M. N., Moris, D., Karanickolas, P. J., Katz, M. H., O'Reilly, E. M., & Pawlik, T. M. (2021). Clinical trials of systemic chemotherapy for resectable pancreatic cancer: a review. *JAMA Surgery*, 156(7), 663-672.
- ⁸⁸ Kolbeinsson, H. M., Chandana, S., Wright, G. P., & Chung, M. (2023). Pancreatic cancer: A review of current treatment and novel therapies. *Journal of Investigative Surgery*, 36(1), 2129884.
- ⁸⁹ Wei, D., Wang, L., Zuo, X., Maitra, A., & Bresalier, R. S. (2024). A small molecule with big impact: MRTX1133 targets the KRASG12D mutation in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 30(4), 655-662.
- ⁹⁰ Hallin, J., Engstrom, L. D., Hargis, L., Calinisan, A., Aranda, R., Briere, D. M., ... & Christensen, J. G. (2020). The KRASG12C inhibitor MRTX849 provides insight toward therapeutic susceptibility of KRAS-mutant cancers in mouse models and patients. *Cancer Discovery*, 10(1), 54-71.
- ⁹¹ Weiss, J., Yaeger, R. D., Johnson, M. L., Spira, A., Klempner, S. J., Barve, M. A., ... & Ou, S. I. (2021). LBA6 KRYSTAL-1: Adagrasib (MRTX849) as monotherapy or combined with cetuximab (Cetux) in patients (Pts) with colorectal cancer (CRC) harboring a KRASG12C mutation. *Annals of Oncology*, 32, S1294.
- ⁹² Ma, Y., Schulz, B., Trakooljul, N., Al Ammar, M., Sekora, A., Sender, S., ... & Murua Escobar, H. (2022). Inhibition of KRAS, MEK and PI3K Demonstrate Synergistic Anti-Tumor Effects in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancers*, 14(18), 4467.
- ⁹³ Yao, T., Xiao, H., Wang, H., & Xu, X. (2022). Recent advances in PROTACs for drug targeted protein research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10328.
- ⁹⁴ Buckley, D. L., & Crews, C. M. (2014). Small-molecule control of intracellular protein levels through modulation of the ubiquitin proteasome system. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(9), 2312-2330.

-
- ⁹⁵ Gadd, M. S., Testa, A., Lucas, X., Chan, K. H., Chen, W., Lamont, D. J., ... & Ciulli, A. (2017). Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nature Chemical Biology*, 13(5), 514-521.
- ⁹⁶ Salami, J., & Crews, C. M. (2017). Waste disposal—An attractive strategy for cancer therapy. *Science*, 355(6330), 1163-1167.
- ⁹⁷ Chamberlain, P. P., & Hamann, L. G. (2019). Development of targeted protein degradation therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 15(10), 937-944.
- ⁹⁸ Bond, M. J., Chu, L., Nalawansa, D. A., Li, K., & Crews, C. M. (2020). Targeted degradation of oncogenic KRASG12C by VHL-recruiting PROTACs. *ACS Central Science*, 6(8), 1367-1375.
- ⁹⁹ Liu, Z., Hu, M., Yang, Y., Du, C., Zhou, H., Liu, C., ... & Xie, Y. (2022). An overview of PROTACs: a promising drug discovery paradigm. *Molecular Biomedicine*, 3(1), 46.
- ¹⁰⁰ Pant, S., Wainberg, Z. A., Weekes, C. D., Furqan, M., Kasi, P. M., Devoe, C. E., ... & O'Reilly, E. M. (2024). Lymph-node-targeted, mKRAS-specific amphiphile vaccine in pancreatic and colorectal cancer: the phase 1 AMPLIFY-201 trial. *Nature Medicine*, 1-12.
- ¹⁰¹ Case, R. M. (1978). Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biological Reviews*, 53(2), 211-347.
- ¹⁰² Webster, P. D., Black Jr, O., Mainz, D. L., & Singh, M. (1977). Pancreatic acinar cell metabolism and function. *Gastroenterology*, 73(6), 1434-1449.
- ¹⁰³ Sans, M. D., Lee, S. H., D'Alecy, L. G., & Williams, J. A. (2004). Feeding activates protein synthesis in mouse pancreas at the translational level without increase in mRNA. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(3), G667-G675.
- ¹⁰⁴ Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry*, 267(21), 6321-6330.
- ¹⁰⁵ Hershey, J. W., & Merrick, W. C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. *cold spring harbor monograph series*, 39, 33-88.
- ¹⁰⁶ Merrick, W. C. (2000). The protein biosynthesis elongation cycle. *Translational Control of Gene Expression*, 89.
- ¹⁰⁷ Hinnebusch, A. G. (2017). Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(8), 589-611.
- ¹⁰⁸ Lasfargues, C., Martineau, Y., Bousquet, C., & Pyronnet, S. (2012). Changes in translational control after pro-apoptotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 177-190.
- ¹⁰⁹ Connor, J. H., Weiser, D. C., Li, S., Hallenbeck, J. M., & Shenolikar, S. (2001). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), 6841-6850.

-
- ¹¹⁰ Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123(4), 569-580.
- ¹¹¹ Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S., Raught, B., Taunton, J., ... & Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal*, 25(12), 2781-2791.
- ¹¹² Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18(16), 1926-1945.
- ¹¹³ Shin, S., Solorzano, J., Liauzun, M., Pyronnet, S., Bousquet, C., & Martineau, Y. (2022). Translational alterations in pancreatic cancer: a central role for the integrated stress response. *NAR cancer*, 4(4), zcac031.
- ¹¹⁴ Brito Querido, J., Díaz-López, I., & Ramakrishnan, V. (2023). The molecular basis of translation initiation and its regulation in eukaryotes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-19.
- ¹¹⁵ Kwan, T., & Thompson, S. R. (2019). Noncanonical translation initiation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(4), a032672.
- ¹¹⁶ Andreev, D. E., Loughran, G., Fedorova, A. D., Mikhaylova, M. S., Shatsky, I. N., & Baranov, P. V. (2022). Non-AUG translation initiation in mammals. *Genome Biology*, 23(1), 111.
- ¹¹⁷ Godet, A. C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., & Prats, A. C. (2019). IRES trans-acting factors, key actors of the stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 924.
- ¹¹⁸ Wek, R. C. (2018). Role of eIF2 α kinases in translational control and adaptation to cellular stress. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7), a032870.
- ¹¹⁹ Sans, M. D., Xie, Q., & Williams, J. A. (2004). Regulation of translation elongation and phosphorylation of eEF2 in rat pancreatic acini. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 144-151.
- ¹²⁰ Hellen, C. U. (2018). Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10), a032656.
- ¹²¹ Shen, P. S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M. H., ... & Frost, A. (2015). Rqc2p and 60 S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science*, 347(6217), 75-78.
- ¹²² Pelletier, J., Thomas, G., & Volarević, S. (2018). Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 51-63.
- ¹²³ Kang, J., Brajanovski, N., Chan, K. T., Xuan, J., Pearson, R. B., & Sanij, E. (2021). Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 323.

-
- ¹²⁴ Friedrich, J. K., Panov, K. I., Cabart, P., Russell, J., & Zomerdijs, J. C. (2005). TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29551-29558.
- ¹²⁵ Miller, G., Panov, K. I., Friedrich, J. K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I., & Zomerdijs, J. C. (2001). hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *The EMBO journal*, 20(6), 1373-1382.
- ¹²⁶ Al-Ashtal, H. A., Rubottom, C. M., Leeper, T. C., & Berman, A. J. (2021). The LARP1 La-Module recognizes both ends of TOP mRNAs. *RNA biology*, 18(2), 248-258.
- ¹²⁷ Hochstoeger, T., & Chao, J. A. (2023, June). Towards a molecular understanding of the 5' TOP motif in regulating translation of ribosomal mRNAs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press.
- ¹²⁸ Philippe, L., Vasseur, J. J., Debart, F., & Thoreen, C. C. (2018). La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Research*, 46(3), 1457-1469.
- ¹²⁹ Goodfellow, S. J., & Zomerdijs, J. C. (2012). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Epigenetics: Development and Disease*, 211-236.
- ¹³⁰ Lafontaine, D. L. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), 11-19.
- ¹³¹ Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 79-94.
- ¹³² Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 574-581.
- ¹³³ Ruggiano, A., Foresti, O., & Carvalho, P. (2014). ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *Journal of Cell Biology*, 204(6), 869-879.
- ¹³⁴ Harding, H. P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., & Ron, D. (2002). Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 575-599.
- ¹³⁵ Ron, D., & Harding, H. P. (2012). Protein-folding homeostasis in the endoplasmic reticulum and nutritional regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a013177.
- ¹³⁶ Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.
- ¹³⁷ Wek, R. C., & Cavener, D. R. (2007). Translational control and the unfolded protein response. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2357-2372.
- ¹³⁸ Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., & Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*, 11, 5-13.

-
- ¹³⁹ Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M., & Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO journal*, 17(19), 5708-5717.
- ¹⁴⁰ Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271-274.
- ¹⁴¹ Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6755-6767.
- ¹⁴² Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 89-102.
- ¹⁴³ Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., ... & Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular Cell*, 6(6), 1355-1364.
- ¹⁴⁴ Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3787-3799.
- ¹⁴⁵ Chapman, A., Li, E., & Kornfeld, S. (1979). The biosynthesis of the major lipid-linked oligosaccharide of Chinese hamster ovary cells occurs by the ordered addition of mannose residues.
- ¹⁴⁶ Liu, T., Stetson, B., Turco, S. J., Hubbard, S. C., & Robbins, P. W. (1979). Arrangement of glucose residues in the lipid-linked oligosaccharide precursor of asparaginyl oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 254(11), 4554-4559.
- ¹⁴⁷ Mohanty, S., P Chaudhary, B., & Zoetewey, D. (2020). Structural insight into the mechanism of N-linked glycosylation by oligosaccharyltransferase. *Biomolecules*, 10(4), 624.
- ¹⁴⁸ Viinikangas, T., Khosrowabadi, E., & Kellokumpu, S. (2021). N-Glycan biosynthesis: Basic principles and factors affecting its outcome. *Antibody Glycosylation*, 237-257.
- ¹⁴⁹ Castello, A., Fischer, B., Frese, C. K., Horos, R., Alleaume, A. M., Foehr, S., ... & Hentze, M. W. (2016). Comprehensive identification of RNA-binding domains in human cells. *Molecular Cell*, 63(4), 696-710.
- ¹⁵⁰ Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions?. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 41(3), 415-427.
- ¹⁵¹ Ottoz, D. S., & Berchowitz, L. E. (2020). The role of disorder in RNA binding affinity and specificity. *Open Biology*, 10(12), 200328.
- ¹⁵² Qi, Y., Wang, M., & Jiang, Q. (2022). PABPC1—mRNA stability, protein translation and tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 12, 1025291.

-
- ¹⁵³ Parker, F., Maurier, F., Delumeau, I., Duchesne, M., Faucher, D., Debussche, L., ... & Tocque, B. (1996). A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*.
- ¹⁵⁴ Kennedy, D., French, J., Guitard, E., Ru, K., Tocque, B., & Mattick, J. (2002). Characterization of G3BPs: Tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP120 binding studies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 84(1), 173-187.
- ¹⁵⁵ Krapp, S., Greiner, E., Amin, B., Sonnewald, U., & Krenz, B. (2017). The stress granule component G3BP is a novel interaction partner for the nuclear shuttle proteins of the nanovirus pea necrotic yellow dwarf virus and geminivirus abutilon mosaic virus. *Virus research*, 227, 6-14.
- ¹⁵⁶ Irvine, K., Stirling, R., Hume, D., & Kennedy, D. (2004). Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol*, 48(10), 1065-1077.
- ¹⁵⁷ Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., & Parker, R. (2016). ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure. *Cell*, 164(3), 487-498.
- ¹⁵⁸ Liu, Z. S., Cai, H., Xue, W., Wang, M., Xia, T., Li, W. J., ... & Li, T. (2019). G3BP1 promotes DNA binding and activation of cGAS. *Nature Immunology*, 20(1), 18-28.
- ¹⁵⁹ Burd, C. G., & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, 265(5172), 615-621.
- ¹⁶⁰ Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R. M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U., ... & Taylor, J. P. (2020). G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules. *Cell*, 181(2), 325-345.
- ¹⁶¹ Reineke, L. C., Kedersha, N., Langereis, M. A., van Kuppeveld, F. J., & Lloyd, R. E. (2015). Stress granules regulate double-stranded RNA-dependent protein kinase activation through a complex containing G3BP1 and Caprin1. *MBio*, 6(2), 10-1128.
- ¹⁶² Vogensen, T., Møller, I. R., & Kristensen, O. (2013). Crystal structures of the human G3BP1 NTF2-like domain visualize FxFG Nup repeat specificity. *PLoS One*, 8(12), e80947.
- ¹⁶³ Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E., & Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of Cell Biology*, 160(6), 823.
- ¹⁶⁴ Schulte, T., Liu, L., Panas, M. D., Thaa, B., Dickson, N., Götte, B., ... & McInerney, G. M. (2016). Combined structural, biochemical and cellular evidence demonstrates that both FGDF motifs in alphavirus nsP3 are required for efficient replication. *Open Biology*, 6(7), 160078.
- ¹⁶⁵ Reineke, L. C., & Lloyd, R. E. (2015). The stress granule protein G3BP1 recruits protein kinase R to promote multiple innate immune antiviral responses. *Journal of Virology*, 89(5), 2575-2589.

-
- ¹⁶⁶ Birney, E., Kumar, S., & Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research*, 21(25), 5803-5816.
- ¹⁶⁷ Götte, B., Panas, M. D., Hellström, K., Liu, L., Samreen, B., Larsson, O., ... & McInerney, G. M. (2019). Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery. *PLoS Pathogens*, 15(6), e1007842.
- ¹⁶⁸ Kang, W., Wang, Y., Yang, W., Zhang, J., Zheng, H., & Li, D. (2021). Research Progress on the Structure and Function of G3BP. *Frontiers in Immunology*, 12, 718548.
- ¹⁶⁹ Laver, J. D., Ly, J., Winn, A. K., Karauskakis, A., Lin, S., Nie, K., ... & Lipshitz, H. D. (2020). The RNA-binding protein Rasputin/G3BP enhances the stability and translation of its target mRNAs. *Cell Reports*, 30(10), 3353-3367.
- ¹⁷⁰ Guitard, E., Parker, F., Millon, R., Abecassis, J., & Tocqué, B. (2001). G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Letters*, 162(2), 213-221.
- ¹⁷¹ Zhang, C. H., Wang, J. X., Cai, M. L., Shao, R., Liu, H., & Zhao, W. L. (2019). The roles and mechanisms of G3BP1 in tumour promotion. *Journal of Drug Targeting*, 27(3), 300-305.
- ¹⁷² French, J., Stirling, R., Walsh, M., & Daniel Kennedy, H. (2002). The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *The Histochemical Journal*, 34, 223-231.
- ¹⁷³ Gallouzi, I. E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., ... & Tazi, J. (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), 3956-3965.
- ¹⁷⁴ Meyer, C., Garzia, A., Morozov, P., Molina, H., & Tuschl, T. (2020). The G3BP1-family-USP10 deubiquitinase complex rescues ubiquitinated 40S subunits of ribosomes stalled in translation from lysosomal degradation. *Molecular Cell*, 77(6), 1193-1205.
- ¹⁷⁵ Atlas, R., Behar, L., Elliott, E., & Ginzburg, I. (2004). The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*, 89(3), 613-626.
- ¹⁷⁶ Bikkavilli, R. K., & Malbon, C. C. (2011). Arginine methylation of G3BP1 in response to Wnt3a regulates β -catenin mRNA. *Journal of Cell Science*, 124(13), 2310-2320.
- ¹⁷⁷ Ortega, Á. D., Willers, I. M., Sala, S., & Cuezva, J. M. (2010). Human G3BP1 interacts with β -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Journal of Cell Science*, 123(16), 2685-2696.
- ¹⁷⁸ Winslow, S., Leandersson, K., & Larsson, C. (2013). Regulation of PMP22 mRNA by G3BP1 affects cell proliferation in breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 12, 1-10.

-
- ¹⁷⁹ Zekri, L., Chebli, K., Tourriere, H., Nielsen, F. C., Hansen, T. V., Rami, A., & Tazi, J. (2005). Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Molecular and Cellular Biology*.
- ¹⁸⁰ Tong, D., Heinze, G., Pils, D., Wolf, A., Singer, C. F., Concin, N., ... & Zeillinger, R. (2010). Gene expression of PMP22 is an independent prognostic factor for disease-free and overall survival in breast cancer patients. *BMC Cancer*, 10(1), 1-7.
- ¹⁸¹ Fischer, J. W., Busa, V. F., Shao, Y., & Leung, A. K. (2020). Structure-mediated RNA decay by UPF1 and G3BP1. *Molecular Cell*, 78(1), 70-84.
- ¹⁸² Zheng, Y., Wu, J., Deng, R., Lin, C., Huang, Y., Yang, X., ... & Yun, J. (2022). G3BP2 regulated by the lncRNA LINC01554 facilitates esophageal squamous cell carcinoma metastasis through stabilizing HDGF transcript. *Oncogene*, 41(4), 515-526.
- ¹⁸³ Gupta, N., Badeaux, M., Liu, Y., Naxerova, K., Sgroi, D., Munn, L. L., ... & Garkavtsev, I. (2017). Stress granule-associated protein G3BP2 regulates breast tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), 1033-1038.
- ¹⁸⁴ Taniuchi, K., Nishimori, I., & Hollingsworth, M. A. (2011). Intracellular CD24 inhibits cell invasion by posttranscriptional regulation of BART through interaction with G3BP. *Cancer Research*, 71(3), 895-905.
- ¹⁸⁵ Zhang, L. N., Zhao, L., Yan, X. L., & Huang, Y. H. (2019). Loss of G3BP1 suppresses proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells via Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 20469-20484.
- ¹⁸⁶ Li, Y., Wang, J., Zhong, S., Li, J., & Du, W. (2020). Overexpression of G3BP1 facilitates the progression of colon cancer by activating β -catenin signaling. *Molecular Medicine Reports*, 22(5), 4403-4411.
- ¹⁸⁷ Takayama, K. I., Suzuki, T., Fujimura, T., Takahashi, S., & Inoue, S. (2018). Association of USP10 with G3BP2 inhibits p53 signaling and contributes to poor outcome in prostate cancer. *Molecular Cancer Research*, 16(5), 846-856.
- ¹⁸⁸ Kim, M. M., Wiederschain, D., Kennedy, D., Hansen, E., & Yuan, Z. M. (2007). Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene*, 26(29), 4209-4215.
- ¹⁸⁹ Takayama, K. I., Suzuki, T., Tanaka, T., Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., ... & Inoue, S. (2018). TRIM25 enhances cell growth and cell survival by modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer. *Oncogene*, 37(16), 2165-2180.
- ¹⁹⁰ Ashikari, D., Takayama, K., Tanaka, T., Suzuki, Y., Obinata, D., Fujimura, T., ... & Inoue, S. (2017). Androgen induces G3BP2 and SUMO-mediated p53 nuclear export in prostate cancer. *Oncogene*, 36(45), 6272-6281.
- ¹⁹¹ Zhang, H., Zhang, S. H., He, H. W., Zhang, C. X., Yu, D. K., & Shao, R. G. (2013). Downregulation of G3BPs inhibits the growth, migration and invasion of human lung

carcinoma H1299 cells by suppressing the Src/FAK-associated signaling pathway. *Cancer Gene Therapy*, 20(11), 622-629.

¹⁹² Prigent, M., Barlat, I., Langen, H., & Dargemont, C. (2000). I κ B α and I κ B α /NF- κ B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 36441-36449.

¹⁹³ Ge, Y., Jin, J., Li, J., Ye, M., & Jin, X. (2022). The roles of G3BP1 in human diseases. *Gene*, 821, 146294.

¹⁹⁴ Anderson, P., Kedersha, N., & Ivanov, P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 861-870.

¹⁹⁵ Glauninger, H., Hickernell, C. J. W., Bard, J. A., & Drummond, D. A. (2022). Stressful steps: Progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules. *Molecular Cell*.

¹⁹⁶ Guillén-Boixet, J., Kopach, A., Holehouse, A. S., Wittmann, S., Jahnel, M., Schlüßler, R., ... & Franzmann, T. M. (2020). RNA-induced conformational switching and clustering of G3BP drive stress granule assembly by condensation. *Cell*, 181(2), 346-361.

¹⁹⁷ Somasekharan, S. P., Zhang, F., Saxena, N., Huang, J. N., Kuo, I. C., Low, C., ... & Sorensen, P. H. (2020). G3BP1-linked mRNA partitioning supports selective protein synthesis in response to oxidative stress. *Nucleic Acids Research*, 48(12), 6855-6873.

¹⁹⁸ Mateju, D., Eichenberger, B., Voigt, F., Eglinger, J., Roth, G., & Chao, J. A. (2020). Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules. *Cell*, 183(7), 1801-1812.

¹⁹⁹ Li, C. H., Ohn, T., Ivanov, P., Tisdale, S., & Anderson, P. (2010). eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PloS One*, 5(4), e9942.

²⁰⁰ Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D., Bashkurov, M., Chen, G. I., ... & Gingras, A. C. (2018). High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies. *Molecular Cell*, 69(3), 517-532.

²⁰¹ Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Oie, M., & Fujii, M. (2013). Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes to Cells*, 18(2), 135-146.

²⁰² Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., ... & Anderson, P. (2016). G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *Journal of Cell Biology*, 212(7).

²⁰³ Warshawsky, H., Leblond, C. P., & Droz, B. (1963). Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautographs. *The Journal of Cell Biology*, 16(1), 1-23.

²⁰⁴ Van Heyningen, H. E. (1964). Secretion of protein by the acinar cells of the rat pancreas, as studied by electron microscopic radioautography. *The Anatomical Record*, 148(3), 485-497.

-
- ²⁰⁵ Caro, L. G. (1961). Electron microscopic radioautography of thin sections: the Golgi zone as a site of protein concentration in pancreatic acinar cells. *The Journal of Cell Biology*, 10(1), 37-45.
- ²⁰⁶ Popova, N. V., & Jücker, M. (2021). The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1743.
- ²⁰⁷ Iadevaia, V., Liu, R., & Proud, C. G. (2014, December). mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 36, pp. 113-120). Academic Press.
- ²⁰⁸ Hong, S., Freeberg, M. A., Han, T., Kamath, A., Yao, Y., Fukuda, T., ... & Inoki, K. (2017). LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife*, 6, e25237.
- ²⁰⁹ Azman, M. S., Alard, E. L., Dodel, M., Capraro, F., Faraway, R., Dermit, M., ... & Mardakheh, F. K. (2023). An ERK1/2-driven RNA-binding switch in nucleolin drives ribosome biogenesis and pancreatic tumorigenesis downstream of RAS oncogene. *The EMBO Journal*, 42(11), e110902.
- ²¹⁰ Valentin-Vega, Y. A., Wang, Y. D., Parker, M., Patmore, D. M., Kanagaraj, A., Moore, J., ... & Taylor, J. P. (2016). Cancer-associated DDX3X mutations drive stress granule assembly and impair global translation. *Scientific Reports*, 6(1), 25996.
- ²¹¹ Lessel, D., Schob, C., Küry, S., Reijnders, M. R., Harel, T., Eldomery, M. K., ... & Kreienkamp, H. J. (2017). De novo missense mutations in DHX30 impair global translation and cause a neurodevelopmental disorder. *The American Journal of Human Genetics*, 101(5), 716-724.
- ²¹² Lennox, A. L., Hoyer, M. L., Jiang, R., Johnson-Kerner, B. L., Suit, L. A., Venkataramanan, S., ... & Sherr, E. H. (2020). Pathogenic DDX3X mutations impair RNA metabolism and neurogenesis during fetal cortical development. *Neuron*, 106(3), 404-420.
- ²¹³ Fonteneau, G., Redding, A., Hoag-Lee, H., Sim, E. S., Heinrich, S., Gaida, M. M., & Grabocka, E. (2022). Stress granules determine the development of obesity-associated pancreatic cancer. *Cancer Discovery*, 12(8), 1984-2005.
- ²¹⁴ Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2016). Mutant KRAS enhances tumor cell fitness by upregulating stress granules. *Cell*, 167(7), 1803-1813.
- ²¹⁵ Kim, W. J., Kim, J. H., & Jang, S. K. (2007). Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A. *The EMBO journal*, 26(24), 5020-5032.
- ²¹⁶ Shin, S. W., Seo, C. Y., Han, H., Han, J. Y., Jeong, J. S., Kwak, J. Y., & Park, J. I. (2009). 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clinical Cancer Research*, 15(17), 5414-5425.
- ²¹⁷ Li, J., Guo, C., & Wu, J. (2019). 15-Deoxy- Δ -12, 14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2), an endogenous ligand of PPAR- γ : function and mechanism. *PPAR research*, 2019.

-
- ²¹⁸ Sanders, D. W., Kedersha, N., Lee, D. S., Strom, A. R., Drake, V., Riback, J. A., ... & Brangwynne, C. P. (2020). Competing protein-RNA interaction networks control multiphase intracellular organization. *Cell*, 181(2), 306-324.
- ²¹⁹ Liu, H., Xu, X. F., Zhao, Y., Tang, M. C., Zhou, Y. Q., Lu, J., & Gao, F. H. (2014). MicroRNA-191 promotes pancreatic cancer progression by targeting USP10. *Tumor Biology*, 35, 12157-12163.
- ²²⁰ Oi, N., Yuan, J., Malakhova, M., Luo, K., Li, Y., Ryu, J., ... & Dong, Z. (2015). Resveratrol induces apoptosis by directly targeting Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1. *Oncogene*, 34(20), 2660-2671.
- ²²¹ Mao, C., Wang, X., Liu, Y., Wang, M., Yan, B., Jiang, Y., ... & Tao, Y. (2018). A G3BP1-interacting lncRNA promotes ferroptosis and apoptosis in cancer via nuclear sequestration of p53. *Cancer Research*, 78(13), 3484-3496.
- ²²² Ward, A. M., Bidet, K., Yinglin, A., Ler, S. G., Hogue, K., Blackstock, W., ... & Garcia-Blanco, M. A. (2011). Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3'UTR structures. *RNA Biology*, 8(6), 1173-1186.
- ²²³ Barra, J., Vendramin, R., & Leucci, E. (2021). Mapping RNA-Protein Interactions. *Functional Analysis of Long Non-Coding RNAs: Methods and Protocols*, 259-272.
- ²²⁴ Lin, Z., Yang, H., Tan, C., Li, J., Liu, Z., Quan, Q., ... & Fang, D. (2013). USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation. *Cell Reports*, 5(6), 1639-1649.
- ²²⁵ Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., & Darnell, R. B. (2009). Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Human Molecular Genetics*, 18(17), 3164-3177.
- ²²⁶ Goldstrohm, A. C., Hall, T. M. T., & McKenney, K. M. (2018). Post-transcriptional regulatory functions of mammalian pumilio proteins. *TRENDS in Genetics*, 34(12), 972-990.
- ²²⁷ Smialek, M. J., Ilaslan, E., Sajek, M. P., Swiercz, A., Janecki, D. M., Kusz-Zamelczyk, K., ... & Jaruzelska, J. (2020). Characterization of RNP Networks of PUM1 and PUM2 Post-Transcriptional Regulators in Tcam-2 Cells, a Human Male Germ Cell Model. *Cells*, 9(4), 984.
- ²²⁸ Armaos, A., Colantoni, A., Proietti, G., Rupert, J., & Tartaglia, G. G. (2021). cat RAPID omics v2.0: going deeper and wider in the prediction of protein-RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W72-W79.
- ²²⁹ Brannan, K. W., Chaim, I. A., Marina, R. J., Yee, B. A., Kofman, E. R., Lorenz, D. A., ... & Yeo, G. W. (2021). Robust single-cell discovery of RNA targets of RNA-binding proteins and ribosomes. *Nature Methods*, 18(5), 507-519.
- ²³⁰ McMahon, A. C., Rahman, R., Jin, H., Shen, J. L., Fieldsend, A., Luo, W., & Rosbash, M. (2016). TRIBE: hijacking an RNA-editing enzyme to identify cell-specific targets of RNA-binding proteins. *Cell*, 165(3), 742-753.

-
- ²³¹ Meyer, K. D. (2019). DART-seq: an antibody-free method for global m6A detection. *Nature Methods*, 16(12), 1275-1280.
- ²³² Sanz, E., Bean, J. C., Carey, D. P., Quintana, A., & McKnight, G. S. (2019). RiboTag: Ribosomal tagging strategy to analyze cell-type-specific mRNA expression in vivo. *Current Protocols in Neuroscience*, 88(1), e77.
- ²³³ Qu, C., & Konieczny, S. F. (2013). Pancreatic acinar cell 3-dimensional culture. *Bio-protocol*, 3(19), e930-e930.
- ²³⁴ Martin, S., Zekri, L., Metz, A., Maurice, T., Chebli, K., Vignes, M., & Tazi, J. (2013). Deficiency of G3BP1, the stress granules assembly factor, results in abnormal synaptic plasticity and calcium homeostasis in neurons. *Journal of Neurochemistry*, 125(2), 175-184.
- ²³⁵ Zhang, H., Zhang, S., He, H., Zhao, W., Chen, J., & Shao, R. G. (2012). GAP 161 targets and downregulates G3BP to suppress cell growth and potentiate cisplatin-mediated cytotoxicity to colon carcinoma HCT 116 cells. *Cancer Science*, 103(10), 1848-1856.
- ²³⁶ Shim, J. H., Su, Z. Y., Chae, J. I., Kim, D. J., Zhu, F., Ma, W. Y., ... & Dong, Z. (2010). Epigallocatechin gallate suppresses lung cancer cell growth through Ras–GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1. *Cancer Prevention Research*, 3(5), 670-679.
- ²³⁷ Zhang, H., Zhang, S., He, H., Zhang, C., Chen, Y., Yu, D., ... & Shao, R. (2014). RasGAP-derived peptide GAP159 enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in HCT116 cells. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(2), 128-134.
- ²³⁸ Freibaum, B. D., Messing, J., Nakamura, H., Yurtsever, U., Wu, J., Kim, H. J., ... & Taylor, J. P. (2024). Identification of small molecule inhibitors of G3BP-driven stress granule formation. *Journal of Cell Biology*, 223(3).