



# Université de Poitiers

## Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2022

### **THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE  
(décret du 25 novembre 2016)**

présentée et soutenue publiquement  
le 12 Octobre 2022 à Poitiers  
par **Guillaume CLÉRY**  
Né le 7 Juin 1994 à Paris

Améliorer le diagnostic des lésions pancréatiques grâce à l'analyse en biologie moléculaire des ponctions-biopsies pancréatiques et de l'ADN tumoral circulant.  
(ADIPAN)

#### COMPOSITION DU JURY

**Président** : Madame le Professeur Christine SILVAIN

**Membres** : Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON  
Monsieur le Professeur David TOUGERON  
Madame le Docteur Claire BOYER  
Madame le Docteur Camille EVRARD

**Directeurs de thèse** : Monsieur le Professeur David TOUGERON et Madame le Docteur Camille EVRARD



# Université de Poitiers

## Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2022

### **THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE  
(décret du 25 novembre 2016)**

présentée et soutenue publiquement  
le 12 Octobre 2022 à Poitiers  
par **Guillaume CLÉRY**  
Né le 7 Juin 1994 à Paris

Améliorer le diagnostic des lésions pancréatiques grâce à l'analyse en biologie moléculaire des ponctions-biopsies pancréatiques et de l'ADN tumoral circulant.  
(ADIPAN)

#### COMPOSITION DU JURY

**Président** : Madame le Professeur Christine SILVAIN

**Membres** : Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON  
Monsieur le Professeur David TOUGERON  
Madame le Docteur Claire BOYER  
Madame le Docteur Camille EVRARD

**Directeurs de thèse** : Monsieur le Professeur David TOUGERON et Madame le Docteur Camille EVRARD

**LISTE DES ENSEIGNANTS**

Année universitaire 2022 – 2023

**SECTION MEDECINE**
**Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers**

- BINET Aurélien, chirurgie infantile
- BOISSON Matthieu, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- BOULETI Claire, cardiologie
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie-virologie
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- COUDROY Rémi, médecine intensive-réanimation – **Assesseur 2<sup>nd</sup> cycle**
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DONATINI Gianluca, chirurgie viscérale et digestive
- DROUOT Xavier, physiologie – **Assesseur recherche**
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie – **Assesseur 2<sup>nd</sup> cycle, stages hospitaliers**
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT-DUSSARDIER Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- ISAMBERT Nicolas, cancérologie
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (*en disponibilité*)
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie – **Assesseur 1<sup>er</sup> cycle**
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, médecine d'urgence
- NASR Nathalie, neurologie
- NEAU Jean-Philippe, neurologie – **Assesseur pédagogique médecine**
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie – **Doyen, Directeur de la section médecine**
- PERAULT-POCHAT Marie-Christine, pharmacologie clinique

- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire – **Assesseur L.AS et 1<sup>er</sup> cycle**
- PERRAUD CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, gastro-entérologie, hépatologie – **Assesseur 3<sup>e</sup> cycle**
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie – **Assesseur 1<sup>er</sup> cycle**
- THILLE Arnaud, médecine intensive-réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

**Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers**

- ALBOUY Marion, santé publique – **Référente égalité-diversité**
- ALLAIN Géraldine, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (*en mission 1 an à/c 01/11/2022*)
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (**en détachement**)
- BILAN Frédéric, génétique
- CAYSSIALS Emilie, hématologie
- CREMNITER Julie, bactériologie-virologie
- DIAZ Véronique, physiologie – **Référente relations internationales**
- EGLOFF Matthieu, histologie, embryologie et cytogénétique
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GACHON Bertrand, gynécologie-obstétrique (*en dispo 1 an à/c du 31/07/2022*)
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie
- GUENEZAN Jérémy, médecine d'urgence
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- JUTANT Etienne-Marie, pneumologie
- KERFORNE Thomas, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire (*en mission 1 an à/c 01/11/2022*)
- LAFAY-CHEBASSIER Claire, pharmacologie clinique
- LIUU Evelyne, gériatrie
- MARTIN Mickaël, médecine interne – **Assesseur 2<sup>nd</sup> cycle**
- PALAZZO Paola, neurologie (*en dispo 3 ans à/c du 01/07/2020*)
- PICHON Maxime, bactériologie-virologie
- PIZZOFERRATO Anne-Cécile, gynécologie-obstétrique
- RANDRIAN Violaine, gastro-entérologie, hépatologie
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire
- VALLEE Maxime, urologie

### **Professeur des universités**

- PELLERIN Luc, biochimie et biologie moléculaire

### **Professeur des universités de médecine générale**

- BINDER Philippe

### **Maître de Conférences des universités de médecine générale**

- MIGNOT Stéphanie

### **Professeur associé des universités des disciplines médicales**

- FRAT Jean-Pierre, médecine intensive-réanimation

### **Maître de Conférences associé des universités des disciplines médicales**

- HARIKA-GERMANEAU Ghina, psychiatrie d'adultes

### **Professeurs associés de médecine générale**

- ARCHAMBAULT Pierrick
- AUDIER Pascal
- BIRAULT François
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- PARTHENAY Pascal

### **Maîtres de Conférences associés de médecine générale**

- BONNET Christophe
- DU BREUILLAC Jean
- JEDAT Vincent

### **Professeurs émérites**

- GIL Roger, neurologie (08/2023)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2023)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2023)
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale (08/2025)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2023)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2024)
- ROBERT René, médecine intensive-réanimation (30/11/2024)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2023)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2023)

### **Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires**

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ALLAL Joseph, thérapeutique (ex-émérite)
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CARRETIER Michel, chirurgie viscérale et digestive (ex-émérite)
- CASTEL Olivier, bactériologie-virologie ; hygiène
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la

### reproduction

- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- EUGENE Michel, physiologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GOMES DA CUNHA José, médecine générale (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie viscérale et digestive
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (ex-émérite)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOURANI Jean-Marc, oncologie
- VANDERMARCC Guy, radiologie et imagerie médicale

## SECTION PHARMACIE

### *Professeurs des universités-praticiens hospitaliers*

- COUET William, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique – **Assesseur pédagogique pharmacie**
- FOUCHER Yohann, santé publique, biostatistiques et épidémiologie
- MARCHAND Sandrine, pharmacologie, pharmacocinétique
- RAGOT Stéphanie, santé publique

### *Professeurs des universités*

- BODET Charles, microbiologie
- CARATO Pascal, chimie thérapeutique
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie
- IMBERT Christine, parasitologie et mycologie médicale
- OLIVIER Jean-Christophe, pharmacie galénique, biopharmacie et pharmacie industrielle
- PAGE Guylène, biologie cellulaire, biothérapeutiques
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique
- SARROUILHE Denis, physiologie humaine – **Directeur de la section pharmacie**

### *Maîtres de conférences des universités-praticiens hospitaliers*

- BARRA Anne, immuno-hématologie
- BINSON Guillaume, pharmacie clinique
- THEVENOT Sarah, hygiène, hydrologie et environnement

### *Maîtres de conférences*

- BARRIER Laurence, biochimie générale et clinique
- BON Delphine, biophysique
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, microbiologie
- CHAUZY Alexia, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, chimie analytique
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie et pharmacométrie (HDR)
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, pharmacochimie
- PAIN Stéphanie, toxicologie (HDR)
- PINET Caroline, physiologie, anatomie humaine
- RIOUX-BILAN Agnès, biochimie – **Référente CNAES – Responsable du dispositif COME'in**
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacotechnie
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire et moléculaire
- WAHL Anne, phytothérapie, herborisation, aromathérapie

### *Maîtres de conférences associés - officine*

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

## CENTRE DE FORMATION UNIVERSITAIRE EN ORTHOPHONIE (C.F.U.O.)

- GICQUEL Ludovic, PU-PH, **directeur du C.F.U.O.**
- VERON-DELOR Lauriane, maître de conférences en psychologie

## ENSEIGNEMENT DE L'ANGLAIS

- DEBAIL Didier, professeur certifié

## CORRESPONDANTS HANDICAP

- Pr PERDRISOT Rémy, section médecine
- Dr RIOUX-BILAN Agnès, section pharmacie

# Remerciements

Au Professeur Christine SILVAIN,

Je tiens tout d'abord à vous remercier une nouvelle fois d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. En effet, vous êtes une figure incontournable de mon internat, puisque c'est vous qui m'avez accueilli dès le premier jour. Puis par la suite, j'ai eu la chance pendant sept mois, un des bénéfices de la pandémie COVID, de partager les « visites du mercredi matin », durant lesquelles j'ai pu de façon privilégiée observer et apprendre de votre pratique qui associe une exigence des connaissances de notre spécialité à des valeurs humaines évidentes. Je vous remercie aussi pour votre écoute et votre aide dans mes divers projets.

Je vous prie donc de bien vouloir croire en mon profond respect et ma sincère gratitude.

Au Professeur David TOUGERON,

Je te suis profondément reconnaissant de m'avoir confié ce sujet de thèse qui m'a passionné.

Je te remercie par la même occasion d'avoir accepté de diriger cette thèse, et ainsi soumettre ce travail à ton expertise et exigence dont la notoriété n'est plus à faire. J'espère que nous serons amenés à collaborer de nouveau, notamment pour la suite du projet ADIPAN.

Je te prie de croire en l'expression de ma haute considération.

Au Professeur Lucie KARAYAN-TAPON,

Je vous prie de croire en ma sincère gratitude d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse, ainsi que d'avoir permis la réalisation du projet ADIPAN grâce à la collaboration de l'ensemble de votre service.

Croyez en mon sincère respect.

Au Docteur Camille EVRARD,

Ces quelques lignes ne suffiront probablement pas à te remercier suffisamment pour ta patience, ta bienveillance et ton optimisme durant toute la rédaction de cette thèse. Ce fut une vraie chance de t'avoir comme directrice de thèse pour mener ce projet à bien. J'espère que mes nombreux mails te manqueront un peu. Je te souhaite de poursuivre avec succès ton parcours universitaire, dont je ne doute pas car tu as toutes les qualités pour y parvenir.

Je te prie de croire en ma très sincère gratitude et mon profond respect.

Au Docteur Claire BOYER,

Je te remercie d'avoir bien voulu être membre de ce jury, ce qui me paraissait être une évidence au vu de ta participation à ADIPAN. Ce fut un plaisir de travailler avec toi ce semestre. Tes connaissances, ton souci des choses bien faites et ta lutte permanente contre les absurdités de l'organisation administrative de l'hôpital public font de toi un médecin que je prends en exemple pour ma pratique future.

Je te prie donc de bien vouloir croire en ma réelle considération et mon respect.

À ma famille,

Mes chers parents et ma sœur adorée, ces quelques lignes n'ont évidemment pas la prétention de pouvoir exprimer toute la gratitude que j'ai de pouvoir vous avoir, et mon amour pour vous. Il faudrait de nombreuses pages pour être exhaustif, et par souci d'écologiste convaincu je ne le serai donc pas. Votre soutien infailible est une force. Vous me l'avez encore prouvé récemment. Merci d'être toujours présents, parfois même avant que j'en ai moi-même conscience.

À deux grandes absentes, mais toujours présentes, Manou et Abie.

À mes amis,

Ceux rencontrés durant le début de ce long parcours en première année de médecine. Alexia, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir tant rire durant cette première année. Marguerite et Aude merci pour votre fidélité. Louis, même si nous sommes rarement sur le même fuseau horaire, tu sais le plaisir que j'ai de te retrouver pour partager une bonne bouteille de vin. Et enfin Alexis, tu es bien la preuve que les premières impressions ne sont pas toujours les bonnes, quel bonheur d'avoir été ton témoin de mariage !

À Claire. Non, ne prends pas peur je serai un peu plus prolifique mais certainement pas assez pour exprimer la gratitude que j'ai de t'avoir comme amie depuis notre périple colombien. Ton rire, tes psychanalyses, tes histoires, et nos escapades sont toujours un délice. Merci au reste de la team « detox », Clarisse et Dag, vous avez su vous imposer comme des incontournables.

À Marianne, le Bénin semble si loin, mais depuis ton amitié n'est devenue que plus précieuse. Merci mon « binôme » historique pour ta fidélité sans faille et ta franchise sans comparaison.

À mes deux colocataires du « TGV », Théo et Victor, bien qu'aucun d'entre nous n'habite désormais dans la même ville, ces deux années à « la Butte » ont été si importantes que vous êtes devenus évidemment bien plus que de simples partageurs de loyer ou membres du planning ménage.

À la bande P6, je ne pourrai évidemment pas citer tout le monde mais appartenir à cette mafia est une chance. Une dédicace particulière tout de même à ceux qui ont rendu le quotidien de l'externat si doux : Nico, Antoine, Augustin, Capucine ou encore Camille C.

À ma famille pictavienne, ces lignes ne pourront pas traduire à quel point votre rencontre a rendu ces années si heureuses, alors je resterai succinct. Vous avoir est une chance que je souhaite à tout le monde. Nathan « my brother from an another mother ». Elvina « mon soleil » (du nord ou du sud je ne sais plus mais mon soleil). Hugo « mon pilier ». Quentin « mon grand-père préféré ». Et the last but not the least, Caroline « ma carotte », mon petit bonbon.

À Thérèse, un semestre aura suffi à vous faire passer de la catégorie « collègue » à « ami » sans l'ombre d'un doute. Vous savez toute la considération que j'ai pour vous et la sincère affection que je vous porte.

À Yosu, merci de m'avoir toujours poussé à rêver plus grand.

À mes collègues,

À l'ensemble de l'équipe médicale et paramédicale du service de gastro-entérologie du CHU de Poitiers,

Merci aux chefs de mes débuts qui m'ont appris la rigueur fondamentale, toujours dans la bienveillance, et souvent avec humour et franc parler: Rayan, Fred, Ginette, Estelle et Coralie. Merci à ceux qui par la suite on participait à la poursuite de ma formation en partageant leur savoir : Anne-Lise, Astrid, Raphaël, Valentin et enfin Violaine.

Enfin merci aux pontes de l'endoscopie, Marc et Monsieur BARRIOZ, pour partager votre expertise, ainsi que vos nombreuses anecdotes.

À mes co-internes de « PouatPouat »,

Je crois que nous avons la chance de pouvoir dire que l'ambiance est douce et l'entraide réelle chez les gastropodes pictaviens.

Une attention particulière pour « mes mamans gastro » Maud C et Maud B en chef de file.

Ainsi que pour Jeanne et Bérénice, merci pour ce dernier semestre où vous ne vous êtes jamais plaint de votre co-interne « diminué ». Enfin Steph, pour ta joie de vivre et ton « mentorat » de ce premier jour de Novembre 2018 en HDS jusqu'à ce dernier semestre.

À l'ensemble de l'équipe soignante du service d'HGE de Niort, votre service est connu pour son professionnalisme et son souci de formation. Ce n'est pas un mythe. Madame LE JEAN-COLIN, Rémy, Catherine, Michel, Benjamin et évidemment Angélique, je vous remercie pour avoir fait de ce deuxième semestre, un semestre incontournable dans ma formation et qui me reste cher.

À l'ensemble de l'équipe soignante du service de réanimation de La Rochelle, vous avez la force de savoir accueillir des « non initiés » à la perfection et de nous transmettre vos connaissances dans un réel climat de joie.

Au Docteur Karine MOUMOUH, merci pour ce semestre à 100 km/h, pour partager un peu de votre expérience dont la renommée n'est plus à faire.

À Tristan ROCHELLE, merci de ton investissement dans ADIPAN et ta patience pour me transmettre quelques notions de biologie moléculaire.

À toutes celles et ceux que je n'ai pas cités et à qui je destine mes meilleures pensées.

Et enfin à ce tendon d'Achille gauche qui m'a offert un temps inespéré de travail à consacrer à cette thèse.

## Abréviations

ACE : antigène carcinoembryonnaire  
ADNcf : ADN libre circulant  
ADNct : ADN tumoral circulant  
AMM : autorisation de mise sur le marché  
AP : adénocarcinome du pancréas  
ASCO : société américaine d'oncologie (*American Society of Clinical Oncology*)  
ASGE: *American Society for Gastrointestinal Endoscopy*  
BER : système *Base Excision Repair*  
CA 19-9 : l'antigène carbohydrate 19-9 ou Cancer antigen 19-9  
CaPaFa : cancer du pancréas familial non syndromique  
CAP: Collège américain des pathologistes (*College of American Pathologists*)  
CAPS: *Cancer of the Pancreas Screening*  
CBNPC : cancer du poumon non à petites cellules  
CCA : carcinome à cellules acineuses du pancréas  
CEA : *carcinoembryonic antigen*  
CNEC : carcinome neuroendocrine du pancréas  
CM : cystadénome mucineux  
CTC : cellules tumorales circulantes  
cfDNA : cell free DNA  
ctDNA : Circulating tumor DNA  
ddPCR : PCR digitale en gouttelettes ou *digital droplet polymerase chain reaction*  
EE: écho-endoscopie digestive haute  
ESGE: *European Society of Gastrointestinal Endoscopy*  
EUS: upper gastrointestinal echo-endoscopy  
EUS-FNB: *fine needle biopsy guided by echo-endoscopy*  
FA: fréquence allélique  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FFPE : *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*  
FNA : aspiration à l'aiguille fine  
FNB : biopsie à l'aiguille fine  
GTP : molécule de guanosine triphosphate  
GTPase : protéine à activité guanosine triphosphate hydrolase  
HBOC: syndrome *Hereditary Breast Ovarian Cancer*  
HRR : système *Homologous Recombination Repair*  
IMC : indice de masse corporelle  
IPMN: *intraductal papillary mucinous neoplasm*  
MAF: *mutated allelic frequency*  
MCN: *mucinous cystic neoplasms of the pancreas*  
MDACC : *MD Anderson Cancer Center*  
miARN(-X) : micro ARN (numéro X)  
MiNEN : néoplasies mixtes endocrine et non endocrine  
MSI : instabilité microsatellitaire  
NCCN : *National Comprehensive Cancer Network*  
NET : neuroendocrine tumor  
NGS : nouvelle génération de séquençage à haut débit ou *Next Generation Sequencing*  
PA : *Pancreatic adenocarcinoma*  
PanIN : néoplasie pancréatique intra-épithéliale  
PARP : poly-ADP-ribose polymérase

PB: pancréatoblastome  
PCR: *polymérase chain reaction*  
PDGF: *platelet-derived growth factor*  
PSC: *Papanicolaou Society of cytopathology*  
RR: risque relatif  
Se : sensibilité ou sensitivity  
Sp : spécificité ou specificity  
TDM-AP: scanner abdomino-pelvien  
TDM- TAP: scanner thoraco-abdomino-pelvien  
TIPMP : tumeur intra canalaire papillaire et mucineuse du pancréas  
TNCD : thésaurus national de cancérologie digestive  
TNEP : tumeurs neuroendocrines du pancréas  
TPPS : tumeur pseudo-papillaire et solide

#### Gènes et voies de signalisation cellulaire:

*ACTA2* : gène codant pour l'actine des muscles lisses  
*ALK* : gène *anaplastic lymphoma kinase*  
*APC* : voie de signalisation *Adenomatous polyposis coli*  
*ASXL1*: gène *ASXL transcriptional regulator 1*  
*ATRX* : gène *ATRX* chromatin remodeler  
*BRAF* : gène *B-Raf proto-oncogene*  
*BRCA1* : gène *BRest CAncer 1*  
*BRCA2* : gène *BRest CAncer 2*  
*CCL13* : gène codant pour le ligand de la chimiokine 13  
*CCL18* : gène codant pour le ligand de la chimiokine 18  
*CFTR* : gène *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*  
*CTNNB1* : gène *Catenin Beta 1*  
*DAXX* : gène *Death domain-associated protein 6*  
*DES* : gène codant pour la desmine  
*DNMT3A*: gène *DNA methyltransferase 3 alpha*  
*EGFR*: gène *Epithelial Growth factor receptor*  
*FAP* : gène codant pour la protéine activatrice des fibroblastes  
*FGFR4*: gène *Fibroblast growth factor receptor 4*  
*GNAS*: gène *Guanine Nucleotide binding protein Alpha Stimulating activity polypeptide*  
*HER2*: gène *Human epithelial growth factor receptor 2*  
*HER4*: gène *Human epithelial growth factor receptor 4*  
*ITGAM* : gène codant pour l'intégrine  
*KRAS* : gène *Kirsten rat sarcoma virus*  
*MEN1* : gène *Multiple Endocrine Neoplasia type 1*  
*MET* : gène *MET proto-oncogene*  
*mTOR* : voie cellulaire *Mammalian Target of Rapamycin*  
*NF1* : gène *neurofibromatose de type 1*  
*NGR1* : gène *Neuregulin 1*  
*NTRK* : gène *Neurotrophic tyrosine receptor kinase*  
*p16/CDKN2A* : gène codant pour une protéine *inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A*  
*PALB2*: gène *Partner And Localizer of BRCA2*  
*PIK3CA*: gène *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha.*  
*PIK3R1*: gène *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*

*PIK3C3*: gène *Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3*  
*PRSSI*: gène *Protease Serine 1*  
*PTEN*: gène *Phosphatase and Tensin homolog*  
*RAF1*: gène *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*  
*RAS/MAPK*: voie de signalisation *RAS-Mitogen-Activated protein kinases*  
*RET*: gène *Receptor tyrosine kinase*  
*RF43*: gène *Ring Finger Protein 43*  
*ROS1*: gène *ROS proto-oncogene 1*  
*RBI*: gène du rétinoblastome  
*SMAD4*: gène *Mothers against decapentaplegic homolog 4*  
*STK11*: gène *Sérine-Thréonine Kinase 11*  
*TET2*: gène *Tet methylcytosine dioxygenase 2*  
*TGFb*: voie cellulaire « *Transforming growth factor beta* »  
*TP53*: gène *Tumor protein 53*  
*VHL* gène *Von Hippel-Lindau*  
*VIM*: gène codant pour la vimentine

# Sommaire

<u>Première partie : Généralités</u> .....	1
1. Épidémiologie et facteurs de risque de l'adénocarcinome du pancréas.....	1
a) Épidémiologie.....	1
b) Les facteurs de risque .....	2
c) Cancérogénèse de l'adénocarcinome pancréatique.....	6
2. Diagnostic de l'adénocarcinome pancréatique .....	16
a) Tableau clinique.....	16
b) Biologie.....	16
c) Imagerie .....	18
d) L'écho-endoscopie digestive haute .....	20
e) Analyse anatomopathologique .....	25
f) Le dépistage .....	29
3. Biologie moléculaire des autres tumeurs malignes du pancréas .....	30
a) Les tumeurs épithéliales.....	30
b) Les tumeurs neuroendocrines du pancréas .....	31
c) Les néoplasies mixtes endocrine et non endocrine du pancréas.....	31
4. ADN tumoral circulant et adénocarcinome pancréatique .....	32
a) ADN circulant tumoral : généralités .....	32
b) Intérêt de l'ADN tumoral circulant dans l'adénocarcinome du pancréas.....	40
5. ADIPAN: but de l'étude .....	50
<u>Deuxième partie: Article</u> .....	51
Introduction.....	51
Methods.....	53
Results .....	57
Discussion .....	67
Conclusion .....	71
Annexes.....	72
<u>Table des figures</u> .....	72
<u>Table des tableaux et tables</u> .....	73
Références bibliographiques.....	75
Résumé.....	85
Serment d'Hippocrate .....	86



## **Première partie : Généralités**

### 1. Épidémiologie et facteurs de risque de l'adénocarcinome du pancréas

#### a) Épidémiologie

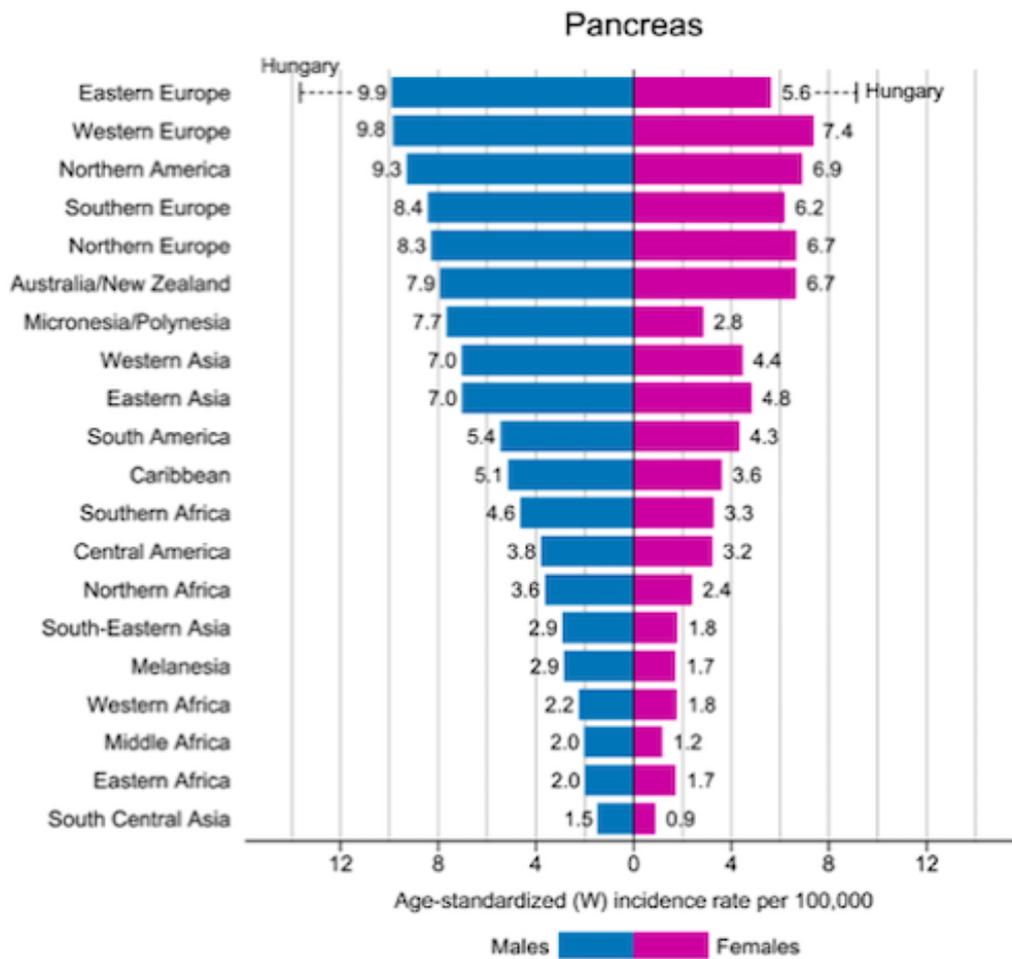
L'adénocarcinome pancréatique (AP) représente plus de 90% de l'ensemble des cancers du pancréas.

On assiste depuis une décennie à une augmentation de l'incidence du cancer du pancréas dans l'ensemble du monde. Les dernières données mondiales de GLOBOCAN de 2020 confirment cette tendance à la hausse avec une incidence de 496 000 nouveaux cas et 466 000 décès liés au cancer du pancréas<sup>1</sup> (Figure 1). Il s'agit d'une augmentation exponentielle en moins de 15 ans. En effet, en 2008, le cancer du pancréas était encore considéré comme « rare », avec 277 000 nouveaux cas diagnostiqués par an dans la monde<sup>2</sup>.

Certains prédisent que le cancer du pancréas sera la 2<sup>ème</sup> cause de décès par cancer aux Etats-Unis en 2030, ou encore la 3<sup>ème</sup> cause de décès par cancer en Europe devant le cancer du sein<sup>3,4</sup>.

En France, selon les données de l'Institut National du CAncer en 2018, on dénombrait 14 184 nouveaux cas, dont 51% d'hommes. La France serait l'un des trois pays au monde dont l'incidence est la plus à la hausse sur les dix dernières années, chez les femmes et les hommes. Or le cancer du pancréas demeure en France, le cancer digestif avec le pronostic le plus défavorable, puisque le taux de survie globale à cinq ans tous stades confondus est compris entre 7% et 8%<sup>5</sup>.

**Figure 1 :** Incidence du cancer du pancréas dans le monde selon les données de GLOBOCAN 2020<sup>1</sup>



b) Les facteurs de risque

i) Les facteurs de risque modifiables

Le tabac, et plus précisément l'exposition à la nicotine, est le facteur environnemental qui majore le plus le risque de survenue de l'AP. En effet, on attribue au tabagisme entre 10% et 30% de l'incidence totale de l'AP. Le risque relatif (RR) est estimé à 2,2 chez les fumeurs actifs et 1,2 chez les anciens fumeurs. Et bien que le RR décroisse avec l'arrêt du tabagisme,

celui-ci perdure pendant au moins dix ans. Le risque lié au tabagisme passif n'est lui pas encore confirmé<sup>6-8</sup>.

L'obésité, définie comme un indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30, induit aussi une majoration de risque de survenue d'un AP. L'incidence augmente de 10% toutes les 5 unités d'IMC<sup>6-8</sup>.

Enfin, concernant l'alcool, les études s'étant intéressées au risque d'AP lié à l'alcool parviennent à des conclusions divergentes. Il semblerait tout de même exister une majoration de l'incidence d'AP chez les patients ayant une consommation excessive d'alcool. L'alcool est cependant l'étiologie la plus fréquente de pancréatite chronique, qui est un facteur de risque d'AP établi<sup>6-8</sup>.

## ii) Les facteurs de risque non modifiables

L'incidence de l'AP augmente avec l'âge. En effet, la majorité des patients ont plus de 50 ans lors du diagnostic. Le pic d'incidence est compris entre 60 et 80 ans. Cependant, on note ces dernières années une augmentation importante d'AP survenant avant l'âge de 50 voire 40 ans. Cette tendance pourrait être en partie expliquée par l'augmentation de la proportion dans la population mondiale de patients présentant une obésité ou un syndrome métabolique (un tour de taille supérieur à 94 cm chez les hommes et 80 cm chez les femmes, associé à au moins deux des facteurs suivants : taux de triglycérides supérieur ou égal à 1,7 mmol/l, un taux de cholestérol HDL inférieur à 1,03 mmol/l chez l'homme et 1,29mmol/l chez la femme, une hypertension artérielle ou une glycémie à jeun supérieure ou égale à 5,6mmol/l)<sup>9</sup>.

Par ailleurs, l'AP a longtemps été une pathologie touchant de façon prépondérante les hommes. Or ces dernières années on observe une augmentation importante de cas chez les femmes, avec un sex-ratio se rapprochant de 1<sup>9</sup>.

Le diabète de type I ou II est associé à un risque d'AP, avec un RR estimé entre 1,5 et 2<sup>6</sup>. Le diabète induit des formes d'AP plus défavorables entraînant une mortalité accrue chez les patients diabétiques<sup>10</sup>. Mais le principal enjeu est de parvenir à distinguer le diabète induit par l'AP, parfois symptôme initial. En effet, l'AP par un effet paracrine, entraîne une dysfonction des cellules bêta du pancréas<sup>8</sup>. L'hyperglycémie peut précéder de 30 à 36 mois le diagnostic d'AP. Il est décrit un parallèle entre l'aggravation de l'hyperglycémie et la croissance tumorale<sup>11</sup>.

La pancréatite chronique, toute étiologie confondue, est un facteur de risque établi de l'AP. Les patients présentant une pancréatite chronique alcoolique ont un RR égal à 20 par rapport à la population générale de développer un AP<sup>12</sup>. Toutefois, le risque brut d'AP dans cette population est de 4% par an. Le dépistage systématique d'AP n'est recommandé que pour les pancréatites chroniques secondaires à une mutation du gène *Protease Serine 1* codant pour la Trypsine 1 (*PRSSI*) à partir de 40 ans. En effet, dans cette population le RR d'AP est 20 fois supérieur à celui de la population générale<sup>12</sup>.

Enfin, on estime que 5 à 10% de l'ensemble des AP correspondent à des formes héréditaires, secondaires à la présence de variants pathogènes constitutionnels situés dans des gènes suppresseurs de tumeurs<sup>13</sup>.

Une partie de ces AP sont liés à des syndromes de prédispositions définis (Tableau 1)<sup>14</sup>. Parmi ces syndromes, c'est le syndrome *Hereditary Breast Ovarian Cancer* (HBOC) qui est le plus fréquemment mis en évidence dans les familles prédisposées à l'AP (5% mais peut atteindre une fréquence de 14% dans certains sous-groupes ethniques, en particulier dans la population juive ashkénaze). Il est dû à la présence d'un variant pathogène constitutionnel de l'un des gènes suppresseurs de tumeur *Brest Cancer 1* (*BRCA1*) ou *Brest Cancer 2* (*BRCA2*), transmis selon un mode autosomique dominant. Le plus souvent, un variant pathogène constitutionnel est trouvé dans le gène *BRCA2* (3,7-19% des formes héréditaires d'AP contre 1,2% pour *BRCA1*). *BRCA1* et *BRCA2* sont deux gènes impliqués dans le système *Homologous Recombination Repair* (HRR) de réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue<sup>13-15</sup>. Ce système est complémentaire du système *Base Excision Repair* (BER) impliqué dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN. L'association du variant pathogène constitutionnel mono-allélique de *BRCA1* ou de *BRCA2* et de la perte de la fonction de l'autre allèle, acquise dans la tumeur, est responsable de l'inactivation du système HRR. Dans une telle situation, les cassures double brin produites lors de la réplication ne peuvent être réparées, ce qui confère aux cellules tumorales une sensibilité accrue aux sels de platine. Le système BER est alors activé via les poly-ADP-ribose polymérase (PARP) afin de réparer les cassures simple brin de l'ADN<sup>16</sup>. C'est à partir de cette observation qu'ont été développés les inhibiteurs de PARP afin d'empêcher la réparation de ces cassures. En effet, la double inhibition du système de réparations dans les cellules tumorales *BRCA* déficientes va entraîner la mort cellulaire par apoptose c'est le concept de létalité synthétique. Après avoir fait preuve de son efficacité dans le cadre de la prise en charge des tumeurs du sein et de l'ovaire avec mutation *BRCA*, l'OLAPARIB, un inhibiteur

de PARP utilisé en maintenance en monothérapie, a démontré un bénéfice chez les patients atteints d'un AP métastatique avec variant pathogène constitutionnel de *BRCA1* ou de *BRCA2*, en cas de sensibilité initiale à un sel de platine (essai POLO) qui a permis l'obtention d'une AMM en 2020<sup>17</sup>.

Par ailleurs, la notion de cancer du pancréas familial non syndromique, ou « CaPaFa », a aussi émergé. Ils sont définis comme la présence d'au moins deux cas chez des apparentés de premier degré ou d'au moins trois cas dans la même branche quel que soit le degré de parenté. On ne retrouve cependant que dans 15% des cas une mutation familiale causale dans ces CaPaFa. Le RR de survenue d'AP est proportionnel au nombre de cas dans la famille. En effet, on estime qu'il est de 32 en cas de trois antécédents d'AP au premier degré, de 6,4 en cas de deux antécédents d'AP au premier degré et de 4,6 en cas d'un seul antécédent au premier degré<sup>18</sup>.

Ces formes héréditaires d'AP font l'objet de recommandations de dépistage chez les apparentés, sur lesquelles nous reviendront ultérieurement (cf chapitre II-f)<sup>19</sup>.

**Tableau 1** : Principaux syndromes génétiques prédisposant à un risque d'adénocarcinome du pancréas<sup>14</sup>

Syndrome	Gène muté	RR d'AP, par rapport à la population générale
Pancréatite héréditaire	- <i>PRSS1</i>	20-50
	- <i>CFTR</i>	5
<i>HRD</i>	- <i>BRCA1</i>	2,6
	- <i>BRCA2</i>	2,1 - 21,7
<i>BRCAness</i> liée à <i>PALB2</i>	- <i>PALB2</i>	2,37
Ataxie-télangectasie	- <i>ATM</i>	4
Syndrome de Lynch	- <i>MLH1</i> , <i>MSH6</i> , <i>MSH2</i> ou <i>PMS2</i>	0-6,2
Peutz-Jeghers	- <i>STK11</i>	132
<i>FAMMM</i>	- <i>p16/CDKN2A</i>	20

RR : risque relatif ; AP : adénocarcinome pancréatique ; HRD : *Homologous Recombination Deficiency* ; FAMMM : *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*

c) Cancérogénèse de l'adénocarcinome pancréatique

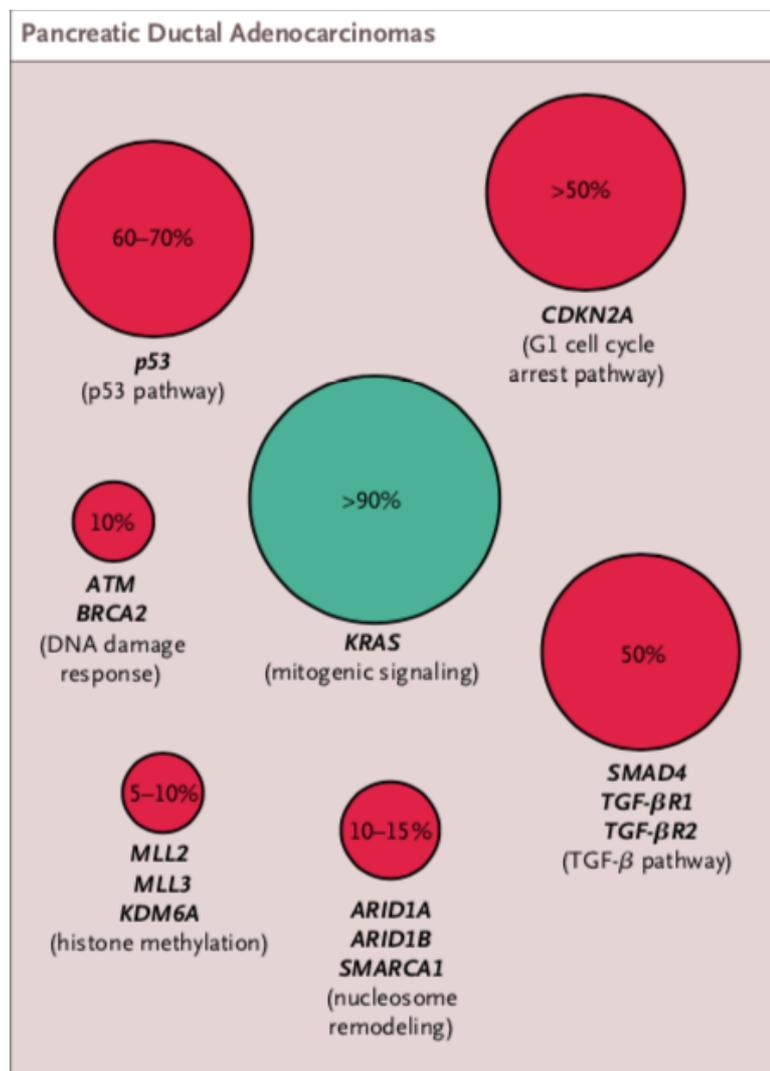
i) Biologie moléculaire

L'AP est une tumeur présentant un nombre très important d'altérations génétiques, on dénombre souvent plus de soixante mutations génétiques au sein d'une tumeur. En effet, l'analyse du génome de l'AP est caractérisée par de nombreuses modifications chromosomiques avec la présence de mutations ponctuelles, de délétions, d'amplifications ou encore de réarrangements chromosomiques<sup>20</sup>. Certains auteurs avancent l'hypothèse que ces tumeurs peuvent notamment faire suite à une chromothripsis. La chromothripsis se définit comme un phénomène unique dans la vie d'une cellule qui induit une dizaine à plusieurs milliers de réarrangements chromosomiques. Ces mutations résulteraient de la fragmentation de chromosomes qui seraient réassemblés par différentes voies de réparation de l'ADN ainsi que par des mécanismes aberrants de réplication de l'ADN. Il en résulterait ainsi des pertes de fonctions de gènes suppresseurs de tumeur, des gènes de fusion, ou encore des amplifications d'oncogènes<sup>21</sup>.

Ces mutations induisent classiquement une perturbation de douze voies cellulaires principales intervenant dans la transformation maligne pancréatique, dont les principales sont la réparation de l'ADN, la voie de *Transforming Growth Factor beta (TGFb)* et la voie de *Kirsten rat sarcoma virus (KRAS)*. Elles concernent aussi des gènes impliqués dans la modification de la chromatine.

Quatre principales mutations sont retrouvées dans l'AP, affectant l'oncogène *KRAS* et les gènes suppresseurs de tumeurs *Tumor protein 53 (TP53)*, *Mothers Against Decapentaplegic homolog 4 (SMAD4)* et *p16/Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A (p16/CDKN2A)* (Figure 2). Ces mutations sont retrouvées aussi au sein des trois lésions pré-cancéreuses de l'AP que sont les néoplasies pancréatiques intra-épithéliales (PanIN), les tumeurs intra canalaire papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP) et les cystadénome mucineux (CM) qui suivent une évolution semblable au modèle de Vogelstein dans le cancer du côlon.<sup>8</sup>

**Figure 2 :** Fréquence des mutations rencontrées dans l'adénocarcinome du pancréas, d'après Ryan *et al.*<sup>22</sup>



La mutation activatrice du gène *KRAS* est retrouvée dans 90% des AP, elle intervient précocement et est déterminante dans la cancérogénèse de l'AP. Le gène *KRAS* code pour la protéine KRAS, qui est une protéine à activité guanosine triphosphate hydrolase (GTPase), ayant un rôle d'intermédiaire entre des récepteurs cellulaires de croissance et un très grand nombre, près de quatre-vingts, voies de signalisation intracellulaire ou des facteurs de transcription. Dans l'AP, la mutation activatrice du codon 12 représente l'événement initial de l'oncogénèse pour la quasi-totalité des AP<sup>23,24</sup> (Tableau 2). Il s'agit principalement d'un

changement nucléotidique intéressant le premier ou le deuxième nucléotide de la séquence sauvage GGT. Principalement on observe les séquences GAT (40% des mutations du codon 12) et GTT (33% des mutations du codon 12) qui induisent un remplacement d'une glycine par respectivement un acide aspartique et une valine. Il existe des mutations au niveau d'autres codons mais bien plus rares. Il s'agit de mutation intéressant les codons 13, 61 ou encore dans de très rares cas du codon 146.

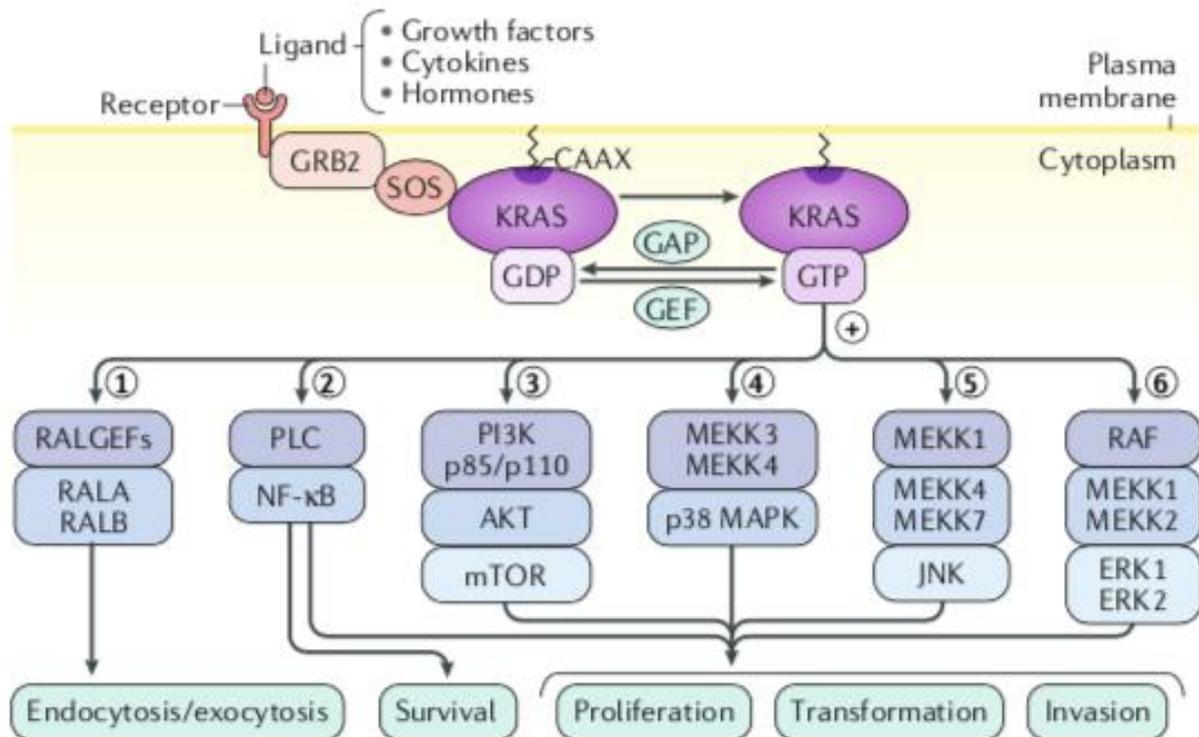
**Tableau 2 :** Principales mutations du gène *KRAS* rencontrées dans l'adénocarcinome du pancréas<sup>23,24</sup>

	Mutation	Fréquence de la mutation dans l'AP (%)
Codon 12 exon 2	G12D	40
	G12V	33
Codon 13 exon 2	G13D	7
Codon 61 exon 3	Q61L	1-2
	Q61R	
Codon 146 exon 4	A146T	< 1

AP : adénocarcinome du pancréas

Pour être active, la protéine *KRAS* doit être associée à une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Cette activation a lieu après un signal assuré par un récepteur transmembranaire, qui va réquisitionner la protéine *KRAS* au niveau membranaire. La mutation de *KRAS* entraîne une altération de la fonction GTPase de la protéine, et la rend ainsi moins sensible aux protéines qui régulent normalement l'activité de *KRAS* en favorisant son activité GTPase. La protéine *KRAS* est donc en permanence activée et induit une constante activation des voies de signalisations d'aval par l'intermédiaire de facteurs de transcription nucléaires qui favorisent la prolifération cellulaire, la survie cellulaire ou encore la transformation cellulaire (Figure 3)<sup>24</sup>. Pour les tumeurs *KRAS* sauvage, on trouve tout de même des mutations intéressant d'autres gènes de la voie *RAS-Mitogen-Activated Protein Kinases (RAS/MAPK)* : les gènes *B-Raf proto-oncogène (BRAF)*, *Human Epithelial growth factor Receptor 2 (HER2)*, *Fibroblast Growth Factor Receptor 4 (FGFR4)*, et *NeuroFibromatose de type 1 (NF1)*.<sup>25</sup>

**Figure 3** : Mécanismes d'activation de la protéine KRAS et voies cellulaires dépendantes de KRAS<sup>24</sup>



Il est estimé une période de dix ans entre l'apparition de la première mutation initiatrice du phénomène tumoral et la forme métastatique<sup>26</sup>. La perte de fonction du gène *SMAD4* semble impliquée dans le passage à des formes métastatiques. De plus, cette mutation semble corrélée dans plusieurs études à un plus mauvais pronostic<sup>20,22</sup>.

La meilleure connaissance du génome de l'AP a permis de distinguer deux groupes de tumeurs en fonction des mutations identifiées en leur sein. Les tumeurs « classic-like » qui ont un meilleur pronostic que les tumeurs « basal-like ». Les tumeurs « basal-like » se caractérisent notamment par une mutation de type G12D du gène *KRAS* alors que pour les tumeurs « classic-like » il s'agit d'avantage d'une mutation G12V. De plus, il est plus souvent retrouvé une perte d'expression du gène *SMAD4* dans les tumeurs « basal-like »<sup>25</sup>.

Le second acteur important du développement de l'AP est le stroma péri-tumoral, il représente en moyenne 48% de la tumeur. L'analyse de l'exome de ce stroma a permis de différencier deux types de stroma, en fonction de leur profil génomique, appelé « normal » et « activé » (Tableau 3). Le stroma « activé » semble corrélé à une mortalité plus importante<sup>27</sup>.

**Tableau 3:** Analyse génomique des différents stroma de l'adénocarcinome du pancréas<sup>20</sup>

Stroma	Principaux gènes exprimés
Normal	Actine des muscles lisses ( <i>ACTA2</i> ), Vimentine ( <i>VIM</i> ), et Desmine ( <i>DES</i> )
Activé	Intégrine ( <i>ITGAM</i> ), ligands des chimiokines ( <i>CCL13</i> , <i>CCL18</i> ), protéine activatrice des fibroblastes ( <i>FAP</i> )

Le stroma péri-tumoral de l'AP est donc dense, et on y observe de nombreux phénomènes. Notamment l'activation des cellules étoilées, normalement à l'état quiescent dans le pancréas, est une étape importante dans la production de la matrice extra-cellulaire. Les cellules étoilées libèrent des facteurs mitotiques et de fibrose. Elles produisent aussi du collagène de type I ou encore des facteurs de croissance des fibroblastes. L'activation des cellules étoilées serait l'une des conséquences de la mutation activatrice du gène *KRAS*. En effet, les cellules tumorales pancréatiques libèrent des facteurs, dont le TGFb, le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), ou encore le *Sonic Hedgehog*, qui activent les cellules étoilées du pancréas environnantes et stimulent leur prolifération et ainsi la production de fibrose<sup>8</sup>.

Le stroma de l'AP fait figure d'obstacle à la chimiothérapie pour son accès aux cellules tumorales, de par sa microvascularisation très pauvre et de mauvaise qualité, et son tissu interstitiel dense.

Le stroma agit aussi comme une barrière à la surveillance immunologique de l'organisme. Il existe au sein du stroma de l'AP notamment une inhibition de la réponse lymphocytaire T médiée<sup>22</sup>. Ce phénomène est médié par la production de cytokines par le stroma, qui recrutent précocement des inhibiteurs de l'immunité T médiée avec comme principal acteur des cellules myéloïdes suppressives, notamment des macrophages. Par ailleurs, les cellules étoilées du pancréas activées vont restreindre la migration des lymphocytes CD8-positifs anti-tumoraux aux compartiments juxta- tumoraux.

Mais le stroma semblerait paradoxalement aussi jouer un rôle de régulation dans l'évolution tumorale. En effet, des modèles de tumeurs dénuées de cellules étoilées dans leur stroma sont apparues comme plus agressives<sup>8,22,27</sup>.

ii) Les lésions précancéreuses de l'adénocarcinome pancréatique

- Les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques

Les PanIN résultent de la prolifération non invasive des cellules épithéliales des canaux pancréatiques. Ce sont des lésions de petites tailles, inférieures à 0,5 cm. Elles font probablement suite à une métaplasie acino-canalaire, secondaire très certainement à l'activation de l'oncogène *KRAS*<sup>8</sup>.

On scinde les PanIN en deux groupes, les PanIN en dysplasie de bas grade, en opposition aux PanIN en dysplasie de haut grade (ou carcinome in situ). Ces différents stades correspondent à l'accumulation croissante de mutations<sup>28</sup>.

Les mutations des gènes *KRAS* et *p16/CDKN2A* sont des événements génétiques précoces retrouvés dans les PanIN de bas grade, alors que les mutations du gène *TP53*, des voies de réparation de l'ADN, ou encore du gène *SMAD4*, sont plus souvent associées aux lésions de dysplasie de haut grade ou aux AP invasifs.

Le diagnostic des PanIN est histologique, elles ne peuvent donc pas bénéficier d'un dépistage radiologique.

- Les tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas

Les TIPMP sont des tumeurs développées au dépend de l'épithélium du canal principal ou des canaux secondaires du pancréas. Leur prévalence exacte en population générale est inconnue, mais on sait qu'elle croît avec l'âge. Actuellement, elle est estimée à 10% de la population âgée de plus de 60 ans. L'examen essentiel au diagnostic de TIPMP est la pancréato-IRM. Lorsqu'elles sont nécessaires au diagnostic, les ponctions sous écho-endoscopie digestive haute (EE) ont une sensibilité (Se) de 42 % et une spécificité (Sp) de 99% pour différencier les kystes mucineux des kystes non mucineux. Cependant la ponction ne permet pas de distinguer une TIPMP d'un CM, deux lésions kystiques mucineuses.<sup>29</sup>

On distingue quatre sous-types histologiques de TIPMP : intestinal, gastrique, pancréato-biliaire et oncocytaire.

Environ 10% des AP seraient secondaires à une TIPMP. Le risque de dégénérescence d'une TIPMP varie en fonction de son type histologique mais aussi de critères morphologiques (Tableau 4). Par ailleurs, au sein d'une TIPMP on peut observer différents grades de dysplasie. Le risque de dégénérescence des TIPMP à cinq ans est estimé entre 3% et 18 % pour les TIPMP des canaux secondaires et jusqu'à 50% pour celles du canal pancréatique principal.

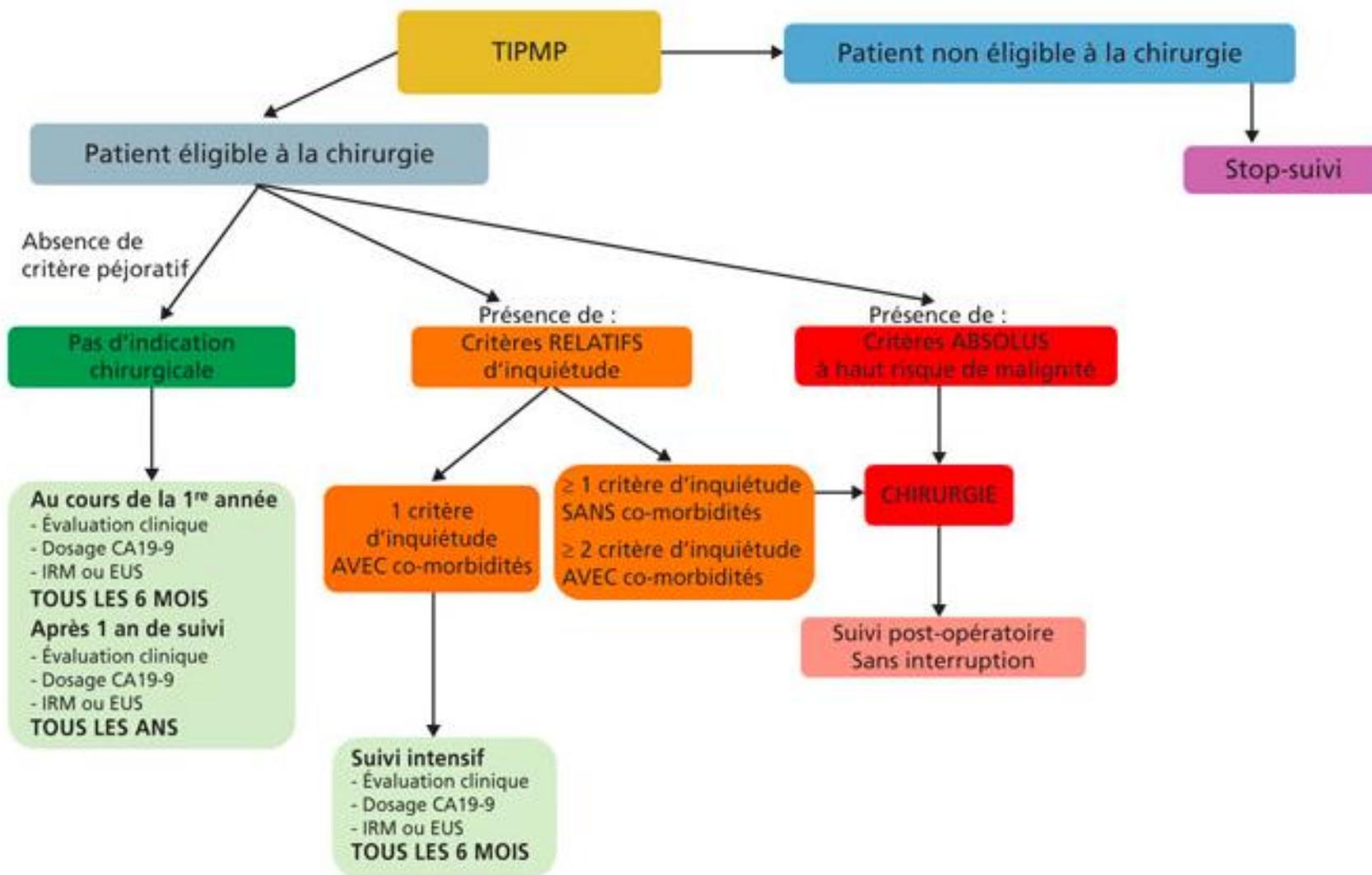
Des recommandations européennes ont été publiées afin de guider la surveillance et la prise en charge adaptée en fonction de critères cliniques et d'imagerie (Figure 4). On considère actuellement que la surveillance doit être poursuivie tant que le patient peut être candidat à une chirurgie<sup>29</sup>.

**Tableau 4** : Signes à haut risque et signes d'inquiétude des tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas selon les recommandations européennes<sup>29</sup>

Signes à haut risque de malignité = Indication absolue de résection chirurgicale	Signes d'inquiétude = Indication relative de résection chirurgicale
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cytologie positive : présence de cellules cancéreuses</li> <li>-Ictère liée à une masse pancréatique céphalique</li> <li>-Masse solide pancréatique</li> <li>-Nodule de &gt; 5 mm prenant le contraste</li> <li>-Taille du canal pancréatique principal &gt; 10 mm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Croissance de la lésion kystique de &gt; 5 mm/an</li> <li>-Taux sérique de CA 19.9 &gt; norme supérieure</li> <li>-Taille de la lésion principale &gt; 40 mm</li> <li>-Nodule prenant le contraste &lt; 5 mm</li> <li>-Apparition d'un diabète récent</li> <li>-Pancréatite aiguë secondaire à la TIPMP</li> </ul>

CA 19-9 : l'antigène carbohydrate 19-9, TIPMP : tumeur intra canalaire papillaire et mucineuse du pancréas

**Figure 4 :** Suivi des tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas selon les recommandations européennes, schéma de V. REBOURS (Hopital Beaujon, Clichy, France)<sup>29</sup>



Tout comme pour les PanIN, on note que les TIPMP de bas grade contiennent souvent des mutations des gènes *KRAS* et *p16/CDKN2A*, tandis que des mutations additionnelles de *TP53* et *SMAD4* sont souvent présentes dans les TIPMP de haut grade. Dans 96% des spécimens chirurgicaux comprenant une TIPMP on trouve aussi des PanIN. Cependant, les TIPMP seraient à l'origine d'AP via un autre mécanisme moléculaire que les PanIN. Le gène *KRAS* semble aussi impliqué précocement<sup>8</sup>. Alors que les PanIN sont le résultat d'une métaplasie de cellules acinaires vers un phénotype de cellule canalaire suite à l'activation du gène *KRAS*, les TIPMP dérivent elles directement des cellules canalaire. La Figure 5 résume les deux processus initiés par l'activation du gène *KRAS* aboutissant à ces deux types de lésions pré-cancéreuses de l'AP.

De plus, il est décrit très fréquemment dans les TIPMP une mutation activatrice du gène *Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating activity polypeptide (GNAS)*. En effet, une mutation du gène *KRAS* ou *GNAS* est retrouvée dans 95% des TIPMP. La mutation du gène *GNAS* n'est pas retrouvée dans d'autres lésions kystiques du pancréas, elle apparaît donc comme spécifique des TIPMP. Plus récemment, on a découvert que la mutation inactivatrice du gène *Ring Finger Protein 43 (RF43)* semble aussi être récurrente dans les TIPMP.<sup>22</sup>

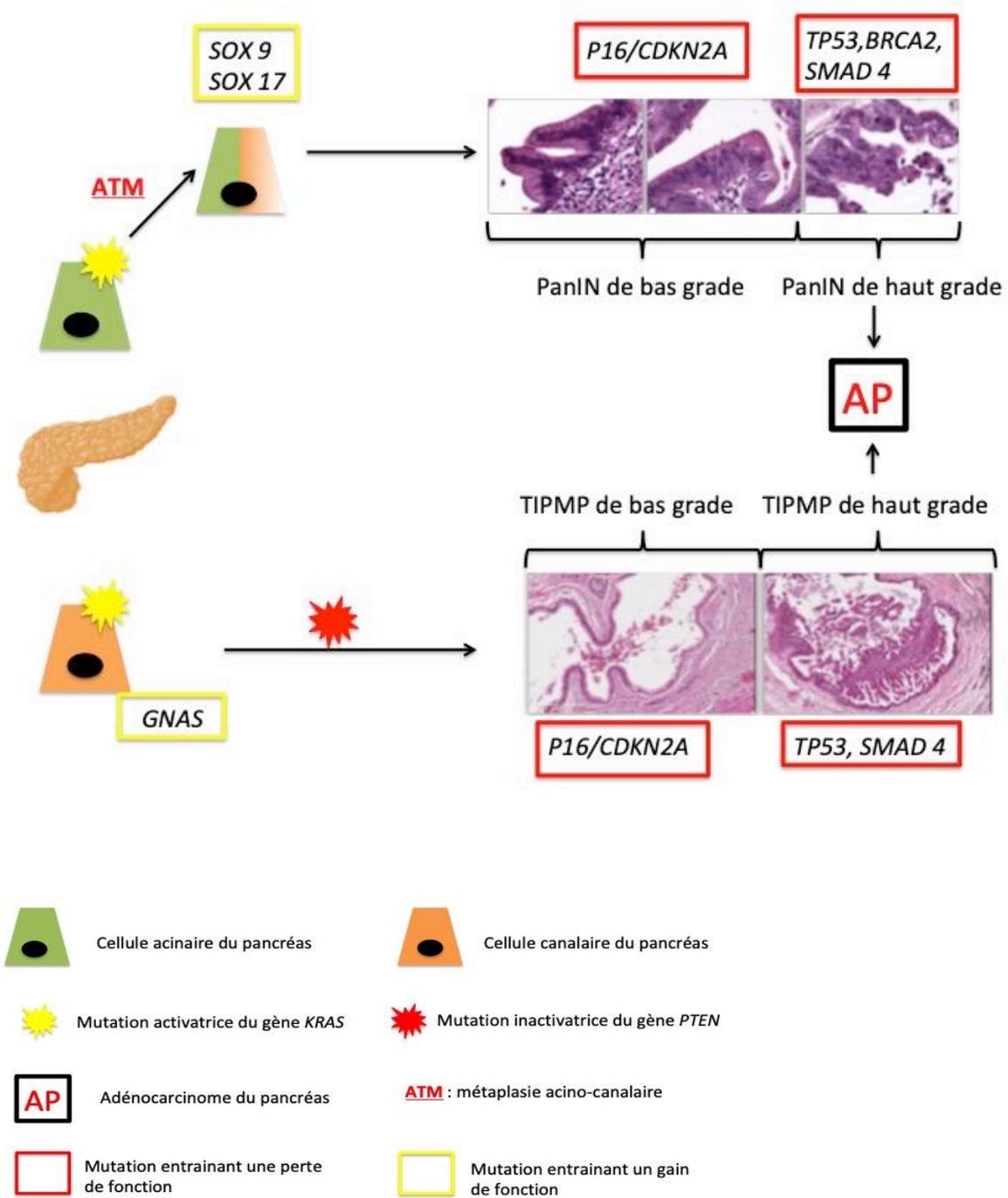
- Le cystadénome mucineux

Le CM est défini comme une lésion kystique du pancréas, comportant un épithélium produisant de la mucine et un stroma ovarien. Il s'agit majoritairement d'une tumeur affectant les femmes avec un ratio de vingt femmes pour un homme. L'âge moyen au diagnostic est compris entre quarante et cinquante ans. Il s'agit d'une tumeur rare dont la prévalence n'est pas connue<sup>8</sup>.

La lésion est souvent unique, décrite comme uniloculaire ou pauci loculaire. Le CM ne présente pas de connexion avec l'arbre biliaire. Le risque de transformation maligne est estimé à 10%. Des critères radiologiques tel que la présence de nodules muraux ou une taille kystique de plus de 40 mm, sont évocateurs de malignité et impliquent une résection chirurgicale de la lésion, y compris si la lésion est symptomatique.<sup>29</sup> Les CM ne présentant pas ces critères et asymptomatiques sont soumis à une surveillance alternée par IRM et échographie, tous les six mois la première année puis tous les ans en cas de stabilité de la lésion<sup>29</sup>.

La mutation du gène *KRAS* est encore une fois retrouvée régulièrement dans les CM<sup>20</sup>.

**Figure 5 :** Néoplasies intra-épithéliales pancréatiques et tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas, deux types de lésions pré-cancéreuses initiées par la mutation activatrice du gène *KRAS*.<sup>8</sup>



-  Cellule acinaire du pancréas
-  Cellule canalaire du pancréas
-  Mutation activatrice du gène *KRAS*
-  Mutation inactivatrice du gène *PTEN*
-  Adénocarcinome du pancréas
- ATM** : métaplasie acino-canaulaire
-  Mutation entraînant une perte de fonction
-  Mutation entraînant un gain de fonction

PanIN : néoplasies intra-épithéliales pancréatiques  
 TIPMP : tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas

## 2. Diagnostic de l'adénocarcinome pancréatique

### a) Tableau clinique

Les symptômes les plus fréquemment révélateurs de l'AP sont souvent tardifs et non spécifiques. En effet, il s'agit principalement d'une douleur abdominale irradiant dans le dos, de mauvais pronostic car souvent synonyme de l'invasion du tronc cœliaque, ou encore d'une asthénie ou d'une anorexie. D'autres symptômes peuvent être présents comme un ictère, l'apparition ou la décompensation d'un diabète, un événement thrombo-embolique, une pancréatite aiguë ...<sup>30</sup> Les AP de la tête du pancréas sont plus souvent symptomatiques contrairement aux AP du corps ou de la queue, diagnostiqués à des stades plus tardifs<sup>8</sup>.

### b) Biologie

L'antigène carbohydre 19-9 (CA 19-9) est synthétisé par le pancréas humain normal ainsi que par les épithéliums biliaire, gastrique, colique, œsophagien, endométrial ou encore salivaire. Il n'est pas un bon outil diagnostique de l'AP. En effet malgré une Se de 80% et une Sp comprise entre 80-90% chez les patients symptomatiques, le CA 19-9 possède une valeur prédictive insuffisante pour être un marqueur diagnostique fiable. Sa sensibilité chute à 30% et sa spécificité à 50% pour les petites tumeurs non métastatiques<sup>31,32</sup>.

Cependant, le CA 19-9 peut apporter une information pronostique dans deux situations. Tout d'abord, il peut aider à définir la résecabilité d'une tumeur au moment du diagnostic. En effet, un seuil inférieur à 200 U/mL est en faveur d'une tumeur résecable. A contrario, s'il dépasse 500 U/mL sans cholestase, il suggère fortement son caractère métastatique. Enfin, après traitement néoadjuvant, il est actuellement admis qu'un taux inférieur à 100 U/mL permettrait de considérer une tumeur comme résecable<sup>30,33,34</sup>. L'autre situation dans laquelle le CA 19-9 a un intérêt pronostique, est pour le suivi thérapeutique. En effet, sa négativation après résection chirurgicale, ou sa décroissance sous chimiothérapie ou radiothérapie sont de bon pronostic. Par ailleurs, il est important de tenir compte pour l'interprétation du CA 19-9 que les patients n'exprimant pas le marqueur sanguin de Lewis, soit 5 à 10% de la population générale, n'expriment pas non plus le marqueur de façon constitutionnelle. Enfin, il existe d'autres étiologies d'élévation du CA 19-9 comme la présence d'une cholestase, le diabète, la cirrhose ...<sup>30</sup>

Dans le cadre du dépistage chez les patients à haut risque de cancer du pancréas, le suivi de

l'hémoglobine glyquée et de la glycémie est désormais recommandé<sup>6,19</sup>.

Pour tenter de pallier ce manque crucial de marqueur de dépistage fiable de l'AP, diagnostiqué majoritairement à un stade tardif, de nouveaux marqueurs sanguins sont à l'étude (Tableau 5). Tout d'abord la recherche de cellules tumorales circulantes (CTC), qui semblent présentes en moindre quantité dans l'AP que dans d'autres cancers (poumon, sein, prostate)<sup>35,36</sup>. La détection de l'ADN tumoral circulant (ADNct), que nous détaillerons d'avantage ultérieurement. Ou encore la recherche d'exosomes est aussi une des perspectives envisagées. Les exosomes sont de petites vésicules lipidiques extra-cellulaires ayant un contenu protéique et génomique, dérivant d'une cellule. Les exosomes participent notamment à la communication inter-cellulaire. Ils ont une demi-vie plus longue que l'ADN tumoral circulant et ont l'avantage d'être produit en permanence<sup>37,38</sup>. Une récente méta-analyse a comparé les performances diagnostiques de ces trois biomarqueurs. C'est la recherche d'exosomes qui semblent offrir la meilleure performance diagnostique et de dépistage pour l'AP, avec une Se moyenne de 93% et une Sp moyenne de 92% (CTC ont une Se de 73% et Sp de 83%, et l'ADNct a une Se de 64% et une Sp de 92%)<sup>39</sup>. Les principales limites soulignées par l'étude, notamment pour les exosomes et les CTC, sont l'absence d'étude de grande taille ainsi que le manque d'homogénéisation des techniques de détection utilisées entre les études. De plus, les études incluait des AP à différents stades.

Enfin, l'étude des micros ARN (miARN) est aussi en plein essor. Il s'agit de séquence monobrin d'environ vingt nucléotides, non codantes, impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Les miARN présentent une grande stabilité dans le sang. Une étude basée sur la recherche des miARN par NGS, a établi un panel (miARN-20a, miARN-21, miARN-24, miARN-25, miARN-99a, miARN-85, et miARN-191) permettant d'obtenir une aire sous la courbe de 0,99 pour la diagnostic de l'AP<sup>40</sup>. Une revue de la littérature crédite la recherche de miARN d'une Se moyenne de 83% et d'une Sp moyenne de 88% pour le diagnostic des AP à des stades précoces<sup>41</sup>. On peut citer par exemple le miARN-25, qui est pour le moment crédité d'une Se de 82% et d'une Sp de 93% pour le dépistage de l'AP, même si des études de grande puissance sont encore nécessaires. Ces valeurs se majorent à 97% et 90% respectivement pour la Se et la Sp, lorsque sa recherche est associée au CA 19-9, chez les patients ayant une tumeur de stade I ou II<sup>6,42</sup>. L'un des espoirs repose aussi sur la validation de panel de miARN plasmatiques permettant de définir le niveau de dysplasie d'une lésion du pancréas. En effet, l'analyse NGS des miARN sur des biopsies solides de

lésions kystiques du pancréas semble définir des panels permettant de différencier un cystadénome mucineux, d'un cystadénome séreux, ou encore d'une tumeur intra-canaulaire et mucineuse du pancréas de bas ou haut grade<sup>43</sup>.

**Tableau 5 :** Comparaison des sensibilités et spécificités des différents biomarqueurs pour le diagnostic de l'adénocarcinome du pancréas

	Sensibilité	Spécificité
CA 19-9 <sup>31,32</sup>	80%	80-90%
CA 19-9 petites tumeurs non métastatiques <sup>31,32</sup>	30%	50%
Exosomes <sup>39</sup>	93%	92%
CTC <sup>36,39</sup>	73%	83%
ADNct <sup>39</sup>	64%	92%
miARN <sup>41</sup>	83%	88%
miARN-25 <sup>6,42</sup>	82%	93%
miARN-25 combiné au CA 19-9 <sup>6,42</sup>	97%	90%

ADNct : ADN tumoral circulant, CA 19-9 : antigène carbohydre 19-9, CTC : cellules tumorales circulantes, miARN : micros ARN

### c) Imagerie

L'examen morphologique de référence pour le diagnostic de l'AP est le scanner thoraco-abdomino-pelvien (TDM-TAP) avec injection de produit de contraste. En effet, il a une Se estimée à 89% et une Sp de 90% dans le diagnostic de l'AP.<sup>30</sup>

La TDM-TAP est aussi l'examen recommandé pour juger de la résécabilité d'un AP avant une chirurgie<sup>30</sup>. En effet, bien que la Se de la TDM-TAP dans l'évaluation de l'atteinte vasculaire soit estimée à 60%, sa Sp est de 94% permettant ainsi d'écarter le moins possible de patient potentiellement éligible à une chirurgie<sup>44</sup>. Il est cependant primordial que

l'imagerie date de moins de quatre semaines avant la chirurgie. En effet, un délai plus long augmente le risque (> 20%) de découverte per-opératoire de métastases non vues à l'imagerie pour une tumeur présumée résécable<sup>45</sup>. Les tumeurs du pancréas non métastatiques sont classées en trois groupes selon leurs rapports aux axes vasculaires environnant (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Définition des critères de résécabilité selon le stade d'envahissement vasculaire selon le *MD Anderson Cancer Center* (MDACC) ou le *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)<sup>30</sup>

	Résécable	Borderline	Localement avancé
Veine mésentérique supérieure et Veine porte	Contact < 180° sans irrégularité du calibre de la veine	Contact > 180°  Contact < 180° avec irrégularité du calibre de la veine sans occlusion et/ou occlusion tumorale chirurgicalement reconstructible	Occlusion tumorale chirurgicalement non reconstructible ou envahissement des principales veines jéjunales
Artère mésentérique supérieure	Pas de contact	Contact < 180°	Contact > 180°
Artère hépatique commune	Pas de contact	Contact court, quel que soit le degré de circonférence, sans envahissement du tronc cœliaque ou de l'origine de l'artère hépatique commune, chirurgicalement reconstructible	Chirurgicalement non reconstructible
Tronc cœliaque	Pas de contact	Contact < 180°	Contact > 180°

L'IRM pancréatique a une Se et une Sp égale à celle de la TDM-TAP pour le diagnostic de l'AP. Elle n'est donc préconisée qu'en cas de tumeur mal visualisée sur une TDM-AP dans le contexte diagnostique<sup>31</sup>.

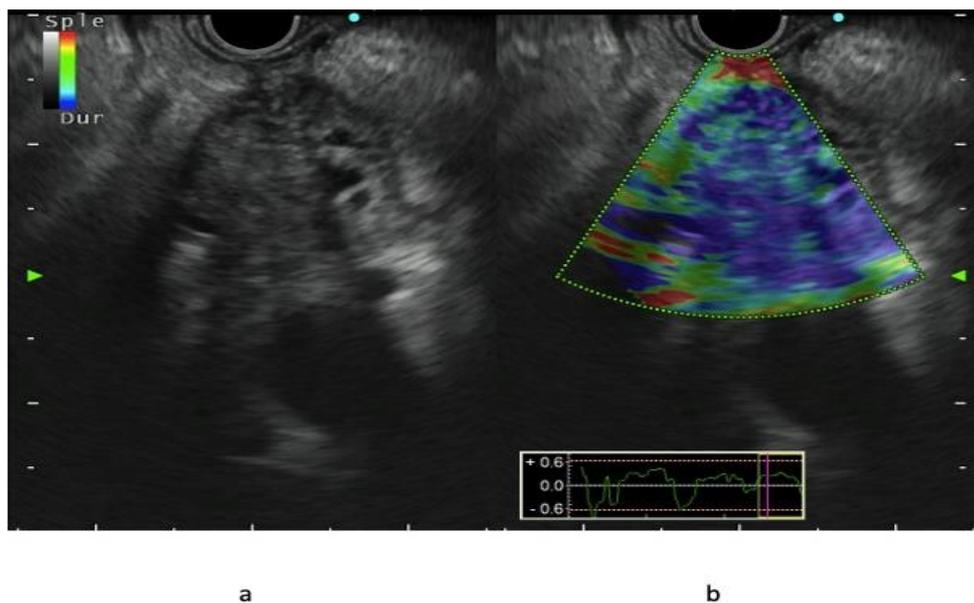
La tomographie par émission de positons au 18-fluorodesoxyglucose n'a aucune place dans le bilan diagnostique d'un AP<sup>46</sup>.

Enfin, en complément du TDM-TAP, une IRM hépatique est recommandée dans le bilan d'extension pour toute tumeur potentiellement opérable (résécable d'emblée ou après traitement d'induction), pour éliminer des métastases hépatiques de petite taille, à condition que cela ne retarde pas le geste chirurgical<sup>30</sup>.

#### d) L'écho-endoscopie digestive haute

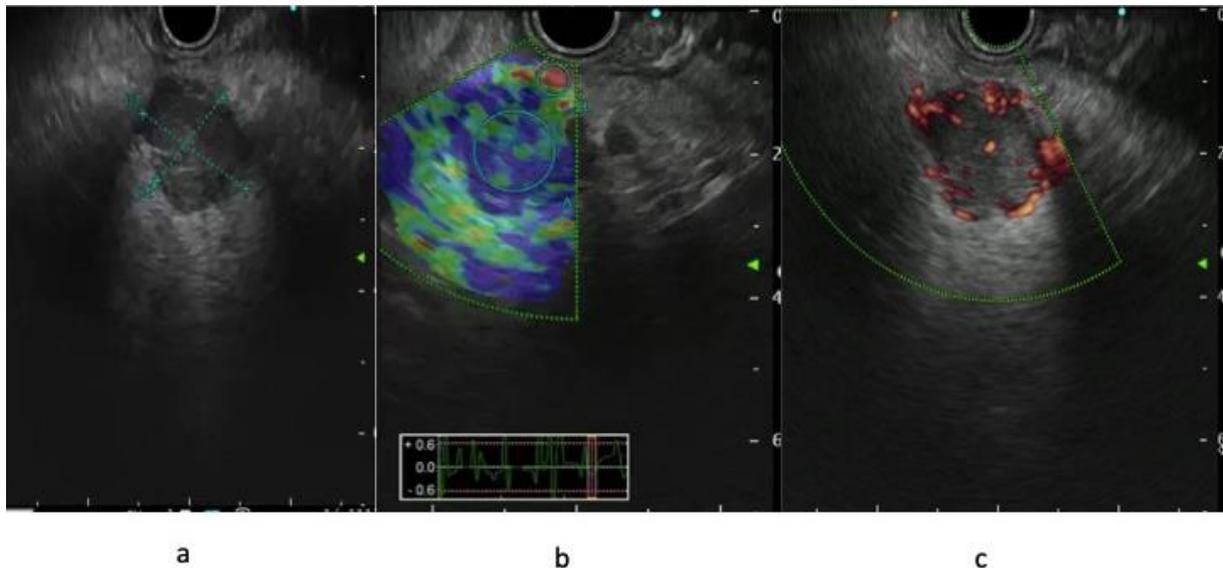
L'EE est une modalité d'imagerie de haute résolution spatiale obtenue grâce à l'adjonction d'une sonde d'échographie à l'extrémité d'un endoscope souple (Figures 6 et 7). On distingue l'EE à vision linéaire qui permet d'obtenir des images dans le même plan que la sonde placée au bout de l'endoscope, de l'EE à vision radiale qui obtient des images dans un plan perpendiculaire à celui de l'embout de l'endoscope.

**Figure 6 :** Une lésion évocatrice d'un adénocarcinome du pancréas en écho-endoscopie digestive haute (CHU de Poitiers, service d'hépto-gastroentérologie)



a : écho-endoscopie digestive haute en mode normal, lésion hétérogène, mal limitée,  
b : élastométrie en écho-endoscopie digestive haute (cf page 24), lésion qui apparaît dure

**Figure 7 :** Une lésion évocatrice d'une tumeur neuro-endocrine du pancréas en écho-endoscopie digestive haute (CHU de Poitiers, service d'hépatogastroentérologie)



- a : écho-endoscopie digestive haute en mode normal, lésion hypoéchogène bien limitée,
- b : élastométrie en écho-endoscopie digestive haute, lésion qui apparaît dure,
- c : écho-endoscopie digestive haute avec doppler vasculaire, lésion qui apparaît très vascularisée

Un des intérêts principaux de l'EE, c'est la possibilité pour les EE à vision linéaire de réaliser lors de l'examen, des prélèvements histologiques ou cytologiques guidés au moyen d'une aiguille introduite dans un canal opérateur de l'appareil d'EE prévu à cet effet.

L'EE avec cytoponction est un excellent examen diagnostique en cas de tumeur solide du pancréas, avec une Se estimée entre 92-100%, une Sp comprise entre 89-100% et une concordance avec le diagnostic final évaluée entre 86-99%<sup>47,48</sup>. L'EE semble donc bien plus performante que la TDM-TAP ou que l'IRM pancréatique. Cette tendance se confirme notamment en cas de tumeurs inférieures à 2 cm, pour lesquelles la Se de détection est de 94% pour l'EE contre 69% pour la TDM-TAP et 83% pour l'IRM<sup>49</sup>. Enfin, pour l'évaluation de l'atteinte ganglionnaire une méta-analyse a montré que l'EE fait encore une fois mieux que la TDM-TAP avec une Se estimée à 58% contre 24%, ainsi que pour juger de l'envahissement vasculaire avec une Se de 86% contre 58% respectivement. L'EE et la TDM-TAP présentent cependant des Sp équivalentes pour ces deux critères, 85-88% pour juger de l'atteinte ganglionnaire et 93-95% pour l'évaluation de l'atteinte vasculaire. Il en résulte une Se et une Sp pour déterminer la résecabilité d'une lésion du pancréas, de 90% et 69% grâce à la TDM-TAP contre 87% et 89% pour l'EE.<sup>50</sup>. Ces données ne semblent pourtant pas interprétées par les différentes sociétés savantes de la même façon. En effet, les dernières directives du

« *National Comprehensive Cancer Network* » (NCCN), publiées en 2021, tout comme les dernières recommandation françaises du Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD) parues la même année, indiquent que l'imagerie initiale de référence pour l'évaluation de l'AP demeure la TDM-TAP avec injection de produit de contraste et selon un protocole établi propre à l'AP. Le rôle de l'EE dans la stadification de l'AP est considéré comme complémentaire. L'EE n'est donc pas recommandée comme outil de stadification de routine et ne doit pas être utilisée pour évaluer l'atteinte vasculaire en systématique<sup>30,51</sup>. En opposition, l'« *American Society for Gastrointestinal Endoscopy* » (ASGE), dans ses dernières recommandations de 2016 concernant le rôle de l'EE dans l'évaluation et la prise en charge d'un patient présentant une masse pancréatique suspecte, préconise que l'évaluation par imagerie de la néoplasie pancréatique comprenne à la fois l'EE et la TDM-TAP<sup>52</sup>. De même, la « *Japan Pancreas Society* », dans ses dernières directives de pratique clinique pour le cancer du pancréas, a recommandé l'EE comme examen diagnostique chez les sujets suspectés de cancer du pancréas car il est plus sensible que les autres modalités d'imagerie<sup>53</sup>.

Quatre indications sont cependant retenues par le TNCD pour le recours à l'EE. Tout d'abord, elle est recommandée en cas de forte suspicion d'AP, mais de tumeur non visualisée par les autres examens d'imagerie. La deuxième indication se présente lorsque la nature de la masse pancréatique demeure incertaine après la réalisation d'une TDM-TAP ou d'une IRM pancréatique, et qu'il est nécessaire d'éliminer un diagnostic différentiel. La troisième indication repose sur la nécessité d'obtenir une confirmation anatomopathologique de l'AP en l'absence d'autre site tumoral plus facilement accessible. Enfin, l'EE peut être réalisée si une cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique est envisagée dans un but de drainage biliaire<sup>30</sup>.

En cas de tumeur kystique du pancréas, l'EE est recommandée comme une exploration complémentaire de l'IRM ou de la TDM-AP au moment du diagnostic ou du suivi. De plus, la ponction durant l'EE n'est à réaliser que s'il persiste un doute quant à la nature de la lésion après réalisation des examens d'imagerie en coupe. La ponction permet en plus de l'analyse cytologique, de doser le taux de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) intra-kystique ou encore de rechercher plus récemment la présence d'une mutation de *KRAS* ou *GNAS*, majorant la performance diagnostique de l'examen<sup>29</sup>.

En effet, d'après les dernières recommandations du « *European Study Group on Cystic Tumours of the Pancreas* » sur la surveillance des kystes du pancréas, parues en 2018, les performances diagnostiques de l'EE pour distinguer les lésions mucineuses (TIPMP et CM) d'une lésion non mucineuse selon les seuls critères morphologiques sont peu satisfaisantes (Se de 36-91% et Sp de 45-81%)<sup>29</sup>. L'analyse cytologique présente une importante Sp de l'ordre de 99% mais une Se très faible de 42% (Tableau 7). C'est finalement le dosage de l'ACE, si supérieur à 192 ng/ml, qui paraît fondamental pour distinguer une lésion mucineuse d'une lésion non mucineuse (Se de 52-78% et Sp de 63-91%)<sup>29,54</sup>. Mais l'ACE ne permet pas de distinguer un CM d'une TIPMP, ni de prédire le niveau de dysplasie de la lésion.

Pour pallier ce manque diagnostique, la recherche de la mutation du gène *KRAS* dans la ponction kystique a été étudiée. Les différentes études ont montré qu'elle permettait de majorer les performances diagnostiques de la ponction lorsqu'elle était associée au dosage de l'ACE, pour détecter les lésions mucineuses, (Se de 75-80% et une Sp de 88%)<sup>54,55</sup>. Cependant la présence de la mutation *KRAS* ne permet pas non plus de distinguer un CM d'une TIPMP, ni prédire le niveau de dégénérescence de la lésion. De plus, la recherche seule d'une mutation du gène *KRAS* non associée au dosage de l'ACE ou de la cytologie ne présente pas une performance diagnostique suffisante pour identifier les lésions pancréatiques à risque (Se de 47% et Sp de 97%).

Une autre mutation a aussi suscité de l'intérêt, celle du gène *GNAS*. Il est apparu que la mutation était hautement spécifique des TIPMP (proche de 100%), d'avantage que *KRAS*, mais au détriment de la Se, bien plus faible (20-60%)<sup>55,56</sup>. L'ajout du gène *GNAS* dans l'analyse de la ponction des lésions kystiques du pancréas ne majore pas les performances diagnostiques de l'examen. De plus, *GNAS* n'a pas montré d'intérêt dans la distinction des lésions de haut grade ou de bas grade. La mutation du gène *GNAS* semble cependant moins fréquente en cas de TIPMP présentant un contingent invasif, et est d'avantage associée au type « intestinal » des TIPMP ainsi qu'au carcinome colloïde du pancréas, de meilleur pronostic que le carcinome tubulaire<sup>57,58</sup>.

Désormais, la recherche mise sur la réalisation de d'analyse mutationnelle par séquençage haut débit (*Next Generation Sequencing*, NGS). Des études ont déjà montré qu'elle permettait de majorer la Se et la Sp diagnostique des ponctions sous EE pour identifier les lésions mucineuses (Se de 90%, Sp de 88%)<sup>59</sup>. De plus l'analyse simultanée de plusieurs gènes permet aussi de mettre en évidence des gènes connus comme étant associés à des stades plus avancés de la cancérogenèse de l'AP (*TP53*, *SMAD4*)<sup>55</sup>.

L'EE bénéficie d'améliorations techniques pour son rôle diagnostique. On peut désormais avoir recours à un produit de contraste injecté en intra-veineux. Il s'agit de microbulles qui vont générer un signal acoustique lorsqu'elles vont interagir avec les ondes émises par l'EE. Ce signal acoustique permet une évaluation plus fine de la vascularisation de la masse pancréatique observée et ainsi déterminer sa nature maligne ou non. Une lésion hypovasculaire étant très en faveur d'une lésion de nature maligne<sup>60,61</sup>. Une autre technique utilisée avec l'EE est l'élastométrie qui renseigne sur la rigidité d'une lésion. L'élasticité est décrite à l'aide d'une carte de couleurs (allant du tissu dur en bleu foncé au tissu mou en rouge). Les tumeurs malignes du pancréas apparaissent comme une masse hétérogène à prédominance bleue, tandis que le pancréas normal apparaît en vert homogène et les masses pancréatiques inflammatoires ont un aspect hétérogène à prédominance verte<sup>62</sup>. D'après quatre méta-analyses, l'EE couplée à l'élastométrie est créditée d'une Se de 95-99% et d'une Sp 67-76% pour le diagnostic de malignité des lésions du pancréas<sup>63-66</sup>. Enfin, l'EE permet de réaliser une endo-microscopie confocale de la lésion. Il s'agit d'une technique basée sur la fluorescence, permettant de réaliser un examen à l'échelle subcellulaire *in vivo* et *in situ*. D'après une récente revue de la littérature, cette technique a une Se de 77% et une Sp de 100% dans le diagnostic des kystes mucineux<sup>67</sup>. De plus, cette méthode présente une précision de 87 % dans le diagnostic des cystadénome séreux, permettant d'éviter une chirurgie ou un suivi inutile<sup>68</sup>. Une étude de validation de la microscopie confocale menée chez 49 patients présentant des lésions kystiques pancréatiques a révélé que la concordance inter-observateur et la fiabilité inter-observateur pour le diagnostic des kystes mucineux étaient élevées et que la Se, la Sp et la précision globale pour le diagnostic des kystes mucineux étaient respectivement de 94%, 82% et 89%<sup>69</sup>. Ainsi, la microscopie confocale permet surtout de différencier les kystes pancréatiques mucineux et non mucineux, mais sans donner d'indication sur la nature maligne ou non de la lésion.

**Tableau 7:** Performances diagnostiques de l'écho-endoscopie digestive haute pour le diagnostic des lésions mucineuses du pancréas

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Critères morphologiques en EE <sup>29</sup>	36-91	45-81
EE + analyse cytologique de la FNB <sup>29,54</sup>	42	99
EE + dosage ACE intra-kystique >192 ng/ml <sup>29,54</sup>	52-78	63-91
EE + dosage ACE intra-kystique >192 ng/ml et recherche mutation du gène KRAS sur la FNB <sup>54,55</sup>	75-80	88
EE + recherche du mutation en NGS sur la FNB <sup>59</sup>	90	88
EE + microscopie confocale <sup>69</sup>	94	82

ACE : antigène carcinoembryonnaire, EE : écho-endoscopie digestive haute, FNB : biopsie faite sous contrôle écho-endoscopique, NGS : analyse faite en *next-generation-sequencing*

#### e) Analyse anatomopathologique

La dernière version du TNCD sur la prise en charge de l'AP rappelle que les biopsies doivent être réalisées sur le site tumoral le plus facile d'accès. La plupart du temps il s'agit d'une métastase hépatique. Si pour celle-ci la voie transpariétale, sous contrôle échographique ou scanner abdomino-pelvien (TDM-AP) est accessible, ce doit être l'option retenue. En revanche, lorsque la voie transpariétale n'est pas disponible, c'est la voie écho-endoscopique qui est à privilégier pour réaliser une biopsie du pancréas. En effet, en comparaison avec des biopsies réalisées sous contrôle TDM-AP, les prélèvements réalisés sous EE ont une Se diagnostique de 84% contre 62% pour les biopsies réalisées sous contrôle TDM-AP.

Le TNCD souligne aussi que la preuve histologique n'est ni systématique ni nécessaire pour une tumeur du pancréas qui apparaît résécable d'emblée.

Trois situations sont retenues comme étant des indications formelles à l'obtention d'une preuve histologique par EE. La première indication est en cas de doute avec une lésion bénigne. La deuxième indication concerne les tumeurs non résécables mais sans métastase accessible par voie transpariétale. Enfin, la biopsie doit être réalisée si un traitement néo-adjuvant est envisagé<sup>30</sup>.

Initialement, les biopsies réalisées par EE se faisaient au moyen d'une «aspiration à l'aiguille fine» (*fine needle aspiration*, FNA). Ces dernières permettent essentiellement de récupérer

des cellules isolées ou débris cellulaires. Les principales limites de ces prélèvements sont la difficulté de définir le degré d'invasion tumorale mais aussi la faible quantité de matériel disponible limitant les analyses complémentaires parfois nécessaires. Depuis les années 1980, avec une accélération ces dix dernières années, s'est développée «biopsie à l'aiguille fine» (*fine needle biopsy*, FNB) pour les ponctions réalisées lors des EE. Les dernières études réalisées semblent confirmer un taux diagnostique plus important pour les FNB compris entre 82-85% contre 74-80% pour les FNA<sup>70,71</sup>. Par ailleurs, on obtiendrait des prélèvements tissulaires de meilleure qualité (intégrité histologique, quantité) avec un nombre moindre de passage de l'aiguille dans la masse lors de l'utilisation des FNB. Les recommandations actuelles ne se positionnent cependant pas en faveur du type d'aiguille à utiliser. Enfin en cas d'absence de diagnostic, il est préconisé de réitérer la biopsie une seconde fois par EE<sup>72,73</sup>. Il persiste dans à peu près 10 à 20% des cas une absence diagnostique, permettant ainsi d'obtenir une performance diagnostique finale proche de 80% (Tableau 8). De plus, une récente méta-analyse parue en 2020 confirme l'intérêt de la répétition de la biopsie sous EE afin de majorer la Se et la Sp diagnostique en cas de résultat initial non concluant. En effet, d'après les résultats de cette étude, après un premier prélèvement tissulaire non concluant, la répétition de l'EE augmente le rendement diagnostique et permet une modification du diagnostic dans près de 60 % des cas., avec un nombre de répétition moyen de 1,3<sup>74</sup>

**Tableau 8** : Intérêt d'un nouveau prélèvement par écho-endoscopie digestive haute

Référence	Nombre de patients	Résultat EE initiale	Répétition de l'EE	Se pour diagnostic de malignité	Performance diagnostique
DeWitt, 2008 <sup>75</sup>	17	Lésions bénignes ou prélèvement non contributif	1	100% (6/6)	59% (10/17)
Eloubeidi, 2008 <sup>76</sup>	24	Prélèvement non contributif	1-3	73% (11/15)	83% (20/24)
Nicaud, 2010 <sup>77</sup>	28	Prélèvement non contributif	1	35% (6/17)	61% (17/28)
Suzuki, 2013 <sup>78</sup>	84	Non disponible	1	96% (69/72)	96% (77/80)
Téllez-Avila, 2016 <sup>79</sup>	34	Prélèvement non contributif	1	62% (13/21)	59% (20/34)
Zang, 2016 <sup>80</sup>	43	Prélèvement non contributif	1-2	62%	65% (28/43)

EE : écho-endoscopie digestive haute, Se : sensibilité

La classification utilisée pour les lésions du pancréas la plus répandue est la classification de la « *Papanicolaou Society of cytopathology* » (PSC) parue en 2014 qui distingue six catégories (Tableau 9). Initialement cette classification reposait sur l'analyse cytologique des prélèvements obtenus grâce aux FNA en EE. Désormais, la classification d'une lésion s'appuie aussi sur les arguments diagnostiques apportés par l'imagerie, mais aussi l'immunohistochimie ou encore la biologie moléculaire réalisées sur les prélèvements obtenus grâce à l'EE. Les mutations classiquement mises en évidence dans l'AP, les TIPMP ou encore le CM (*KRAS*, *GNAS*, *RNF43*, *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *p16/CDKN2A*, ou encore *SMAD4*) n'ont pas été décrites parmi les lésions bénignes (classe II selon la PSC)<sup>81-83</sup>. Le cystadénome séreux, lésion bénigne, est très fortement associé cependant à une mutation, celle du gène *Von Hippel-Lindau* (VHL), dans 89% à 100% des cas<sup>84,85</sup>. Les autres lésions bénignes comme les pseudo-kystes, les kystes de rétention, ou encore les lymphangiomes ne semblent pas associées à des mutations génétiques spécifiques. Enfin dans les cas complexes de pancréatite

chronique l'association de la recherche d'une mutation de KRAS à l'analyse cytologique permet d'améliorer grandement la Se diagnostique par rapport à la cytologie seule (80-95 % contre 60-80%)<sup>86-88</sup>. En effet, une séquence sauvage du gène *KRAS* est peu en faveur du diagnostic d'AP. Il semblerait que le gène *KRAS* puisse avoir un même intérêt diagnostique dans le cas des pancréatites auto-immunes<sup>89</sup>.

**Tableau 9** : Classification des lésions pancréatiques selon la « *Papanicolaou Society of cytopathology* »<sup>90,91</sup>

Catégorie	Types de lésions	Distribution moyenne dans les études (%)	Risque de malignité (%)
I-Absence de diagnostic	*	12,2	23,1
II- Bénigne	Tissu pancréatique sain, pancréatite chronique, pancréatite auto-immune, pseudokyste	24,2	8,2
III-Atypique	*	5,9	46,8
IVa-Néoplasies bénignes	Cystadénome séreux, microadénome neuroendocrine, lymphangiome	2,9	20,2
IVb-Autres néoplasies	TIPMP, CM, tumeur solide et pseudo-papillaire, tumeur neuroendocrine bien différenciée	18,9	37,5
V-Suspicion de malignité	*	4,5	92,1
VI-Maligne	AP, cholangiocarcinome, pancréatoblastome, tumeur neuroendocrine peu différenciée, lymphome, métastase	33,5	99,6

\*Définitions :

-absence de diagnostic : prélèvement ne permettant d'obtenir aucune conclusion. Toutes présences d'atypies cellulaires empêchent de classer un prélèvement dans cette catégorie.

-atypique : prélèvement montrant de rares atypies comme l'élargissement du noyau, une hyperchromasie ou une anisonucléose mais en nombre insuffisant pour conclure à un carcinome

-suspicion de malignité : prélèvement manquant d'argument diagnostic pour être classé comme « malin » de façon certaine. Il est préconisé une discussion multidisciplinaire pour décider d'une résection chirurgicale ou non.

f) Le dépistage

Les recommandations actuelles de dépistage en France de l'AP se basent sur les recommandations mises à jour en 2020 par le « *Cancer of the Pancreas Screening* » (CAPS)<sup>19</sup>. En effet, la détection à un stade précoce, lorsque l'AP est éligible à une résection chirurgicale, est à ce jour le meilleur moyen d'améliorer le pronostic de survie. Le dépistage concerne les individus désignés comme à haut risque de développer un AP.

On considère qu'il s'agit d'individus ayant un risque théorique cumulé d'AP supérieur à 5%, ou un risque relatif supérieur ou égal à 5. Ainsi, il s'agit d'une part des patients porteurs de variants pathogènes constitutionnels des gènes majeurs de prédisposition aux cancers abordés précédemment (*BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CDKN2A, STK11, MLH1, MSH6* et *MSH2*). D'autres part, cela concerne les patients avec au moins un apparenté de premier degré atteint d'AP ayant lui-même un apparenté de premier degré atteint, mais sans mutation mise en évidence.

L'une des limites soulignées par le CAPS de ce dépistage est que la majeure partie des AP résulte de l'évolution dégénérative des PanIn qui demeurent difficilement objectivables à des stades précoces.

Enfin, le TNCD souligne que le dépistage doit être réalisé dans des centres experts.

Il est important de spécifier que le sevrage tabagique dans ces populations est primordial.

### 3. Biologie moléculaire des autres tumeurs malignes du pancréas

#### a) Les tumeurs épithéliales

##### i) Le carcinome à cellules acineuses

Le carcinome à cellules acineuses du pancréas (CCA) représente 1 à 2% des tumeurs du pancréas. Le CCA tout comme l'AP, est une tumeur comportant un nombre important de mutations génétiques. Cependant contrairement à l'AP, la mutation du gène *KRAS* n'est quasiment jamais mise en évidence. Dans un quart des cas, on trouve la présence de mutation affectant la voie de signalisation cellulaire *Adenomatous polyposis coli* (APC)-béta caténine. Enfin, dans un tiers des cas, les CCA ont des mutations pouvant être l'objet de thérapies ciblées comme *BRAF*, *BRCA2*, *SMAD4*, *Raf-1 proto-oncogene*, *serine/threonine kinase (RAF1)*, ou *Neurotrophic tyrosine receptor kinase (NTRK)*, pouvant être un axe futur de prise en charge de ces tumeurs<sup>92,93</sup>. A noter que dans 10 à 15% des cas, on peut observer une panniculite (maladie de Weber-Christian) secondaire à un syndrome d'hypersécrétion de lipase.

##### ii) La tumeur pseudo-papillaire et solide

La tumeur pseudo-papillaire et solide (TPPS) est aussi une tumeur rare du pancréas puisqu'elle représente 1 à 2% de l'ensemble des tumeurs du pancréas. Elle a été décrite pour la première fois en 1959 par Frantz. L'analyse génomique des TPPS ne montre pas de mutation des gènes *KRAS*, *SMAD4* ou encore *TP53*, classiquement décrites dans l'AP. Il semblerait cependant exister une activation de la voie Wnt-béta caténine, suite à une mutation non-sens de l'exon 3 de l'oncogène *Catenin Beta 1 (CTNNB1)*<sup>94</sup>.

##### iii) Le pancréatoblastome

Le pancréatoblastome (PB) est une tumeur rare, elle représente en effet moins de 1% des tumeurs du pancréas. Il s'agit d'une tumeur embryonnaire. Les pancréatoblastomes sporadiques et associés à la polypose adénomateuse familiale présentent des altérations fréquentes dans la voie de signalisation de la polypose adénomateuse colique *APC/béta-caténine*, et une perte allélique au niveau du chromosome 11p.

## b) Les tumeurs neuroendocrines du pancréas

Les tumeurs neuroendocrines du pancréas (TNEP) sont des tumeurs rares, qui représentent 3 à 4% des tumeurs du pancréas.

Les principales anomalies moléculaires dans les TNEP sporadiques sont des mutations du gène *Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1)*, des gènes *Death domain-associated protein 6 (DAXX)*, *ATRX* chromatin remodeler (*ATRX*) et des gènes de la voie *Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)*. Les carcinomes neuroendocrines du pancréas (CNE) présentent eux des mutations de *TP53*, du gène du rétinoblastome (*RBI*) et des amplifications de *MYC*<sup>95-97</sup>.

## c) Les néoplasies mixtes endocrine et non endocrine du pancréas

Les tumeurs mixtes sont définies comme des lésions présentant au moins deux composantes néoplasiques au sein de la même tumeur, et dont chaque contingent représente au moins 30 % de celle-ci. Dans le cas des néoplasies mixtes endocrine et non endocrine du pancréas (MiNEN), l'un des contingents est de nature endocrine et l'autre contingent peut être soit de nature adénocarcinomateuse soit acinaire, et dans de très rares cas les trois contingents sont présents au sein d'une même tumeur.

Il s'agit d'une entité rare. On estime que les MiNEN représentent 0,5% des AP, 5% des TNEP et pour le CCA, tumeur déjà rare, la prévalence des MiNEN n'est pas connue.

La cancérogénèse de ces lésions demeure mal connue, notamment quant à la question de l'origine commune ou non aux différents contingents. Des études récentes semblent montrer qu'en cas contingent endocrine peu différencié, les anomalies génétiques mises en évidence étaient les mêmes que celles de la composante adénocarcinomateuse (*TP53*, *APC*). Au contraire, les MiNEN dont la composante endocrine est bien différenciée ont des mutations fréquemment rencontrées dans les TNEP, notamment celle du gène *VHL*<sup>98,99</sup>.

#### 4. ADN tumoral circulant et adénocarcinome pancréatique

##### a) ADN circulant tumoral : généralités

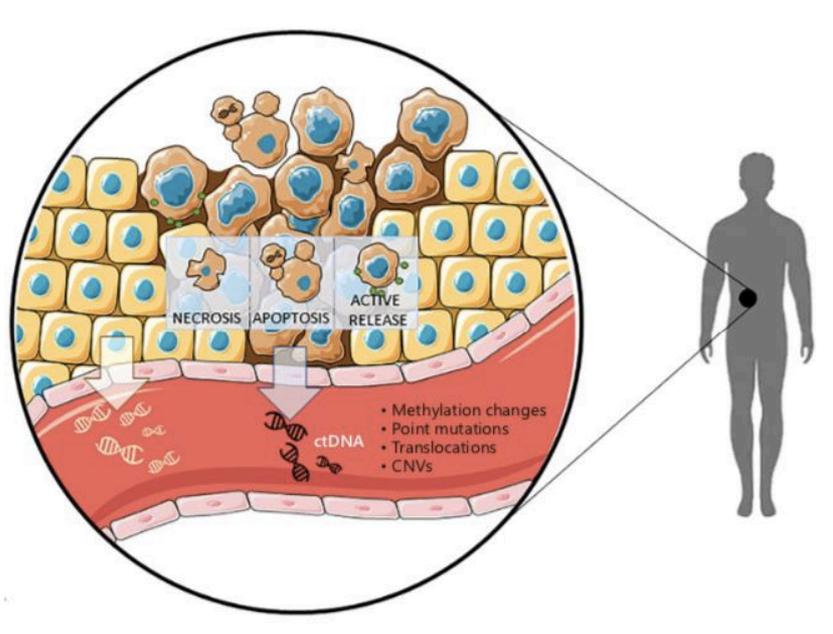
##### i) Biopsie liquide: définitions et techniques de détection

La biopsie liquide désigne l'ensemble des techniques réalisées à partir d'un prélèvement sanguin ou d'autres liquides organiques, tels que l'urine, la salive, les épanchements pleuraux, liquide céphalorachidien ou encore les selles, permettant de rechercher des cellules tumorales circulantes ou bien de l'ADN, des ARN ou enfin plus récemment des exosomes issus des cellules tumorales et portant les mêmes caractéristiques moléculaires que la tumeur. La biopsie liquide en opposition à la biopsie classique « solide » est plus facilement réalisable que les ponctions tissulaires réalisées à l'aide d'imagerie, ou nécessitant une anesthésie générale ... La biopsie liquide grâce à une simple prise de sang pourrait ainsi s'intégrer plus facilement dans le suivi des patients car mieux adaptée à la répétition. Par ailleurs, elle semble plus représentative de l'ensemble de la tumeur et de ses métastases en termes de profil mutationnel à un instant donné, qu'une biopsie solide qui ne s'intéresse qu'à la partie prélevée de la tumeur. Or il est de plus en plus acquis qu'il existe une hétérogénéité cellulaire au sein d'une même tumeur ou encore entre une tumeur primitive et ses métastases<sup>35,100</sup>. Cependant, la biopsie liquide ne permet encore pas de corrélérer de manière certaines les anomalies moléculaires détectées à un type histologique ou un phénotype cellulaire.

L'analyse de l'ADNct est donc un type de biopsie liquide. L'ADNct consiste en l'ADN relargué par les cellules tumorales. Initialement, c'est d'abord l'ADN libre circulant (ADNcf) qui a été décrit en 1948 par Mandel et Metais. Puis en 1977 Léon *et al.* ont démontré que les proportions d'ADNcf étaient plus importantes chez des patients atteints de cancer que chez des sujets sains<sup>101,102</sup>. En effet, l'ADNcf est présent physiologiquement chez tout individu avec des concentrations de l'ordre de 2 à 10 ng/mL de plasma chez des sujets sains. Il s'agit de molécules d'ADN fragmentées, dont la longueur varie généralement de 60 à 250 paires de bases, avec un pic de fréquence aux alentours de 120 à 160 paires de bases. L'ADNct représente une part variable de cet ADNcf, de 1% et 50% de l'ADNcf chez les patients atteints de cancer. La fraction d'ADNct semble notamment liée à la taille, au stade et au type de tumeur<sup>103-105</sup>.

L'ADNct aurait diverses origines dont les principales sont les phénomènes d'apoptose et aussi de nécrose de cellules tumorales (Figure 8). Certains auteurs évoquent aussi une possible excrétion active par la cellule tumorale de l'ADNct. L'ADNct semble en permanence relargué par les cellules tumorales, avec une durée de vie dans la circulation sanguine courte entre 4-30 min, avant d'être éliminé par le foie, les reins et la rate<sup>100,106</sup>.

**Figure 8** : origine de l'ADN tumoral circulant selon Fernandes<sup>100</sup>



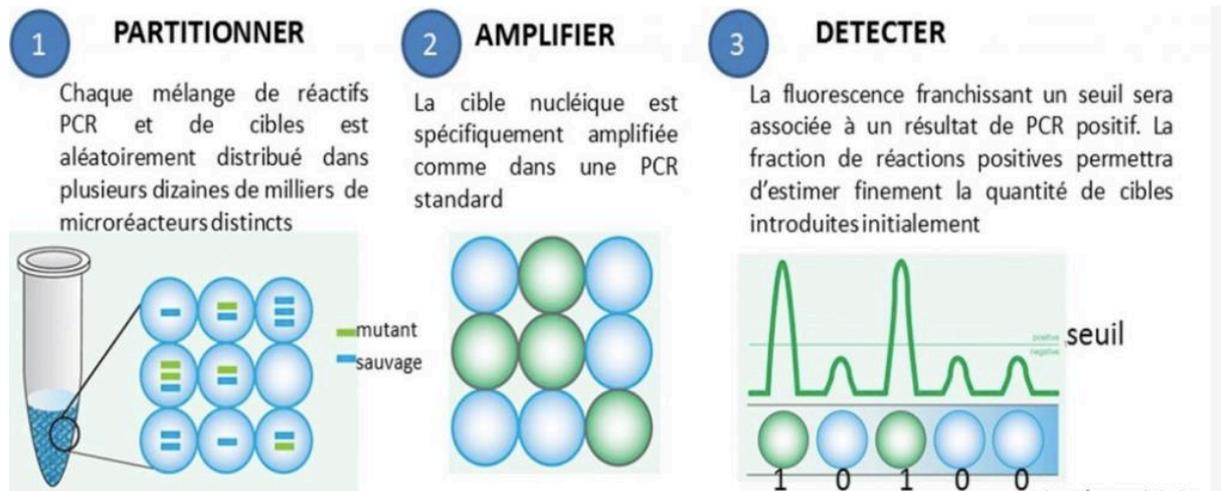
La recherche d'ADNct doit être préférentiellement faite sur le plasma car il représente une part plus importante de l'ADNcf que dans le sérum<sup>107,108</sup>. En effet dans le sérum, la lyse des leucocytes entraîne une forte augmentation de la quantité totale d'ADNcf et dilue d'autant l'ADNct. Les prélèvements sanguins pour la biopsie liquide peuvent être réalisés avec des tubes EDTA classiques. Le prélèvement doit alors être technique dans les six heures pour extraire le plasma. L'utilisation de tubes spécifiques conditionnés avec des stabilisants cellulaires peut être aussi envisagée, permettant un délai plus important pour la récolte du plasma (jusqu'à 48 heures)<sup>109</sup>. Pour ce qui est des conditions pré-analytiques de l'ADNct (conservation des prélèvements, et acheminement) et des techniques d'extraction d'ADN, les modalités varient d'une étude à l'autre et nécessitent d'être encore affinées pour homogénéiser les pratiques<sup>110,111</sup>. De plus, d'avantage de connaissances quant aux facteurs liés aux patients pouvant influencer sur la proportion d'ADNcf sont nécessaires<sup>109</sup>. Ces facteurs incluent les rythmes nycthémeraux biologiques, le tabagisme, la grossesse, l'exercice

physique et de nombreux troubles non malins, tels que les états inflammatoires, l'anémie, les maladies cardiaques, le syndrome métabolique ou encore les troubles auto-immuns<sup>112</sup>.

Deux stratégies pour la détection des variants alléliques présents dans l'ADNct s'opposent. Pour rappel, on distingue les variants alléliques somatiques qui sont acquis après la naissance et résultent généralement d'erreurs de réplication ou de réparation de l'ADN ou d'agressions environnementales, aux variants germinaux. La fraction allélique (FA) des variants somatiques est généralement inférieure à 50%. La notion de polymorphisme, elle, renvoie à la fréquence à laquelle on rencontre la mutation dans la population étudiée<sup>113</sup>. Si le variant considéré représente plus de 1% des mutations pour un gène donné alors, il peut être considéré comme variant polymorphique.

La première stratégie englobe les techniques de détection qui ciblent un nombre limité de variants somatiques connus. Cette stratégie est principalement fondée sur l'utilisation de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), et notamment la PCR digitale en gouttelettes (*digital droplet PCR*, ddPCR) qui présente un taux de détection très sensible compris entre 0,001 et 0,005%. Ainsi la ddPCR pourrait en théorie détecter un variant somatique dans l'ADNct même s'il n'y a qu'une à cinq copies d'ADNct pour 100 000 copies d'ADNcf, si la quantité d'ADN à analyser est suffisante. Le principe de la ddPCR repose sur une dilution de l'échantillon d'ADN dans des millions de micro-compartiments, le plus souvent des microgouttelettes aqueuses. L'échantillon est ainsi partitionné pour que chaque microgouttelette ne contienne au plus qu'un seul fragment d'ADN en plus des sondes fluorescentes de détection des mutations somatiques d'intérêt (Figure 9). Une réaction de PCR est réalisée au sein de chaque gouttelette pour y détecter la fluorescence émise, soit par la sonde mutée, soit par la sonde sauvage. On peut donc qualifier l'échantillon de muté ou de non muté (aussi appelé sauvage), mais aussi quantifier avec précision le rapport allélique normal/muté donnant des résultats en FA exprimé en pourcentages.

**Figure 9** : Principe de la PCR digitale selon C. AUDEBERT (www.biorigami.com)

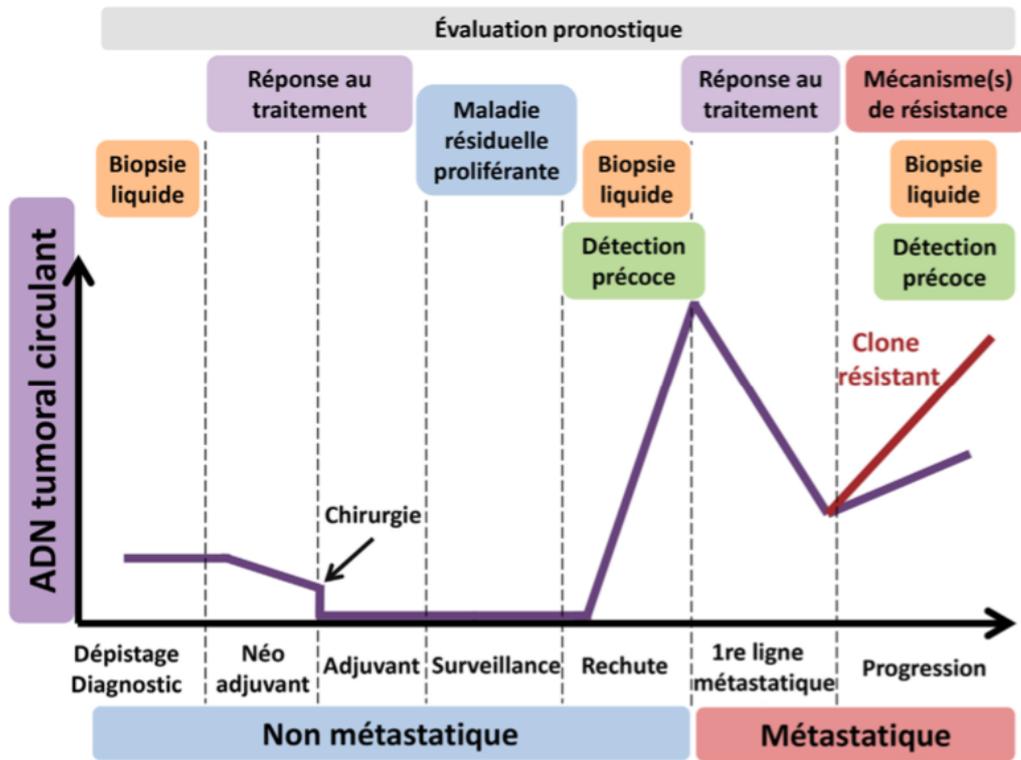


La deuxième stratégie est fondée sur le séquençage à haut débit par NGS qui utilise des panels de gènes permettant d'analyser un grand nombre de gènes simultanément, en parallèle. Cette option offre d'autres avantages, notamment la détection de variants non connus initialement, ou encore de détecter différents types de mutations autres que des mutations ponctuelles « simples » (délétions, translocations, amplifications, insertions, ...). Cependant le NGS a une Se de détection largement inférieure à celle de la ddPCR, estimée entre 1% et 5%. Or les quantités d'ADNct dans les prélèvements sont parfois trop faibles pour être détectées à ce seuil. Des travaux sont actuellement en cours pour tenter de pallier ce défaut de Se<sup>35,114</sup>. De plus, cette méthode demande plus de temps pour l'obtention des résultats, et est d'avantage onéreuse.

ii) Utilisation actuelle en oncologie

Depuis 2010, de nombreux articles tentant de prouver l'intérêt de l'utilisation de l'ADNct en oncologie sont parus. En effet, l'ADNct semble pouvoir offrir des applications à tous les stades de la prise en charge du patient atteint de cancer : au diagnostic, durant le suivi post-opératoire, pour le choix de thérapie ciblée, pour la détection précoce d'une résistance à un traitement ... (Figure 10)

**Figure 10** : Potentiel d'utilisation de l'ADN tumoral circulant selon Castelli<sup>106</sup>



Selon les recommandations du NCCN parues en Mai 2020, l'utilisation de l'ADNct est reconnue pour trois types de cancers (Tableau 10)<sup>115</sup>.

Dans le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC), l'ADNct peut être une alternative à une nouvelle biopsie solide pour rechercher des mutations sur les gènes *Epithelial Growth factor receptor (EGFR)*, *anaplastic lymphoma kinase (ALK)*, *ROS proto-oncogene 1 (ROS1)*, *BRAF*, *MET proto-oncogene (MET)*, et *Receptor tyrosine kinase (RET)*, si la quantité tissulaire de la biopsie initiale est insuffisante<sup>116</sup>. Le recours à l'ADNct peut notamment être envisagé en cas de progression chez un patient traité par un inhibiteur de l'EGFR spécifique de la mutation T790M. Si le résultat est négatif il est cependant recommandé de réaliser une nouvelle biopsie tissulaire pour confirmer le résultat. Il est par ailleurs déconseillé d'avoir recours à l'ADNct pour le diagnostic du CBNPC plutôt qu'à une biopsie solide. En effet, les études ont certes montré une très forte Sp diagnostique de l'ADNct mais une Se trop faible, avec notamment un taux de faux négatif estimé à 30%<sup>116</sup>. Enfin, les recommandations laissent l'option de l'ADNct dans des cas particuliers, notamment en cas de patient non éligible à la réalisation d'une biopsie solide du fait d'une altération importante de l'état général.

L'ADNct peut aussi avoir un rôle à jouer dans la prise en charge du cancer du sein. En effet,

pour les cancers du sein exprimant les récepteurs hormonaux mais négatif pour l'amplification du gène *HER2*, la recherche de mutation sur le gène *PIK3CA* est recommandée afin d'identifier des patients éligibles à un traitement ciblé. Cette recherche peut être faite soit sur une biopsie solide soit sur l'ADNct. En cas de résultat négatif, encore une fois le NCCN recommande de confirmer le résultat en réalisant une biopsie solide<sup>117</sup>.

Enfin, dans un contexte de cancer œso-gastrique, le NCCN admet que la recherche d'ADNct par NGS peut être envisagée<sup>118</sup>. D'une part, pour rechercher une amplification de l'expression de *HER2*, en faveur de l'introduction d'un traitement par TRASTUZUMAB chez les patients métastatiques (15-20% des cancers gastriques métastatiques). D'autre part, l'analyse NGS de l'ADNct peut mettre en évidence des mutations connues pour être associées à une moins bonne réponse au TRASTUZUMAB comme *HER2*, *Human epithelial growth factor receptor 4 (HER4)*, *PIK3CA*, *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1 (PIK3R1)*, *Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3 (PIK3C3)* ou encore *NF1*<sup>119,120</sup>. L'analyse de l'ADNct semble aussi permettre de statuer sur le statut de l'instabilité microsatellitaire, prédictif de la réponse à une immunothérapie<sup>121</sup>. L'ADNct peut aussi servir dans le suivi thérapeutique en cas de mauvaise réponse thérapeutique en identifiant l'évolution des mutations tumorales. L'absence de détection de mutation par l'ADNct n'exclut pas leur existence au sein de la tumeur.

Plus récemment, dans le cancer de la prostate, l'analyse de l'ADNct paraît être une piste prometteuse chez les patients métastatiques résistant à une castration hormonale pour détecter des mutations des gènes *BRCA1* et *2* et ainsi guider l'utilisation des inhibiteurs de PARP<sup>122,123</sup>.

L'utilisation de l'ADNct paraît aussi encourageante dans le cancer du colon<sup>124</sup>. En premier lieu en situation métastatique, où l'analyse des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* est obligatoire pour la sélection du traitement et l'évaluation du pronostic, car les mutations de *RAS* confèrent une résistance aux anticorps anti-EGFR et les mutations de *BRAF V600* sont associées à un mauvais pronostic. Dans ce contexte, l'analyse de l'ADNct par PCR a été approuvée comme alternative à l'analyse sur biopsie tissulaire<sup>125-127</sup>. Toujours dans le contexte métastatique, le suivi des variations de l'ADNct semble prédictif de la réponse thérapeutique<sup>128,129</sup>. Enfin, en situation adjuvante la persistance de l'ADNct en post-opératoire est un facteur de mauvais pronostic<sup>130-132</sup>. 95 à 100% des patients dont l'ADNct reste détectable après l'intervention chirurgicale présentent une récurrence, généralement dans les

deux ans de suivi s'ils ne reçoivent aucun traitement systémique. Le suivi de l'ADNct permet de détecter plus précocement une récurrence ou une progression tumorale avant que celle-ci ne soit visualisée sur des examens d'imagerie, avec une avance médiane de 8,7 mois<sup>133</sup>. En s'appuyant sur le potentiel pronostic de l'ADNct en situation adjuvante, un essai randomisé prospectif de phase II multicentrique, publiée en 2022, mené chez des patients ayant un cancer colique de stade II opérés, a montré qu'une stratégie thérapeutique guidée par l'ADNc pour le traitement du cancer du côlon de stade II a permis de réduire le recours à la chimiothérapie adjuvante sans compromettre la survie sans récurrence<sup>134</sup>. L'évaluation de la survie sans récurrence à deux ans dans le groupe dont la prise en charge a été guidée par l'ADNc s'est avérée non inférieure à la prise en charge standard (93,5% et 92,4%,).

Dans une revue de la littérature réalisée conjointement en 2017 par la société américaine d'oncologie (ASCO) et le collège américain des pathologistes (CAP) plusieurs limites quant à la maîtrise de l'ADNct étaient mises en exergue, empêchant celui-ci d'être pour le moment le marqueur biologique incontournable en oncologie.<sup>109</sup> Ces remarques concernent la validité pré-analytique de l'ADNct, en soulignant l'absence d'étude robuste pour déterminer les conditions de stockage, d'extraction de l'ADN ou encore la connaissance des facteurs biologiques pouvant influencer sur l'ADNct. Ainsi, ces lacunes empêchent une pratique homogène. La revue pointe aussi un manque d'unité en termes de validité analytique, avec des techniques de détection d'ADNct différentes dans les études réalisées, ayant chacune des seuils de détection différents. C'est pourquoi les conclusions des études pour un même objectif peuvent parfois varier. De plus, la revue souligne que de nombreuses études pour valider leurs résultats se sont basées sur la concordance entre les variants détectés dans le plasma et dans la tumeur solide. Or, il existe de nombreux facteurs biologiques pouvant affecter cette concordance indépendamment de la validité analytique : type tumoral, stade tumoral, hétérogénéité tumorale spatiale, intervalle entre la biopsie liquide et solide (hétérogénéité temporelle) ...<sup>35,135,136</sup>. Il sera nécessaire d'avoir recours à des essais réalisés à partir d'échantillons standardisés, ou encore qui compareront directement différentes techniques de détection mais aussi de connaître le taux de détection limite pour chaque variant. Enfin, l'ASCO et le CAP mettent en garde dans l'interprétation des résultats obtenus. Ils doivent toujours prendre en compte les données cliniques comme le type tumoral, le stade de la maladie ou encore les traitements reçus.

**Tableau 10** : L'ADN tumoral circulant en oncologie actuellement

Cancer	Indications validées de l'ADNct
Poumons <sup>116</sup> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- alternative à une nouvelle biopsie solide pour rechercher des mutations sur les gènes <i>EGFR</i>, <i>ALK</i>, <i>ROS1</i>, <i>BRAF</i>, <i>MET</i>, et <i>RET</i>, si la quantité tissulaire de la biopsie initiale est insuffisante.</li> <li>- option possible dans des cas particuliers, notamment en cas de patient non éligible à la réalisation d'une biopsie solide du fait d'une altération importante de l'état général.</li> </ul>
Sein <sup>117</sup> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- option validée pour la recherche de mutation sur le gène <i>PIK3CA</i> est recommandée afin d'identifier des patients éligibles à un traitement ciblé</li> </ul>
Oeso-gastrique <sup>118</sup> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- option validée pour déterminer la prédiction de la réponse à un traitement par TRASTUZUMAB chez les patients métastatiques (15-20% des cancers gastriques métastatiques).</li> </ul>
Prostate <sup>122,123</sup> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- option pour déterminer la réponse aux inhibiteurs de PARP chez les patients métastatiques résistant à une castration hormonale</li> </ul>
Colo-rectal <sup>125-127</sup> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- option pour déterminer le statut mutationnel des gènes <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i> chez les patients métastatiques, obligatoire avant l'introduction du traitement.</li> </ul>

 Indication validée par des recommandations internationales

 Indications en cours de validation

Par ailleurs, une notion importante concerne les variants somatiques retrouvés dans les lignées cellulaires hématopoïétiques. En effet, on observe un nombre croissant de mutations à partir de cinquante ans. Initialement cela représente 5% entre soixante et soixante-neuf ans puis de plus de 10% après soixante-dix ans. Les mutations les plus fréquemment rencontrées concernant les gènes *DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)*, *Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)*, et *ASXL transcriptional regulator 1 (ASXL1)* mais aussi certains rencontrés dans les tumeurs du pancréas comme *TP53* ou encore *GNAS*<sup>100,109</sup>. Ainsi, la présence d'un variant somatique d'un de ces gènes lors de la recherche d'ADNct doit toujours être interprétée avec prudence. L'ADNct présente donc un réel potentiel en oncologie à tous les stades de la prise en charge du patient. Cependant, il apparaît primordial d'avoir désormais recours à des études robustes et de grande taille permettant d'homogénéiser et de valider les pratiques.

b) Intérêt de l'ADN tumoral circulant dans l'adénocarcinome du pancréas

i) Dépistage et diagnostic

L'AP se caractérise par un pronostic effroyable, avec nous le rappelons une survie globale à cinq ans tous stades confondus estimée entre 7% et 8%<sup>30</sup>. Un des éléments de réponse permettant d'expliquer en partie cette donnée, est que au diagnostic de l'AP à peine 20% des patients sont considérés comme éligibles à une chirurgie<sup>137</sup>. Or à ce jour, la chirurgie demeure la seule thérapeutique curative de l'AP. L'un des enjeux majeurs dans la prise en charge de l'AP est donc de parvenir à le détecter plus précocement pour rendre plus de patients accessibles à la chirurgie.

Dans leur étude publiée en 2014 incluant des patients métastatiques et non métastatiques, Bettegowda C *et al.* parviennent à montrer que la détection d'ADNct est possible à un stade précoce du cancer<sup>135</sup>. Dans cet article, l'AP fait partie des cancers dont le taux de détection d'ADNct est parmi les plus élevés, estimé à 90% chez les patients métastatiques. Cependant, ce taux de détection chute grandement chez les patients non métastatiques avec une détection d'ADNct seulement chez 48% des patients. Cette tendance semble se confirmer dans l'ensemble des cancers, puisque le taux de détection moyen est respectivement de 47%, 55%, 69% et 82% pour les stades I, II, III et IV. L'une des principales critiques de cette étude est que la corrélation entre les mutations mises en évidence dans la tumeur et l'ADNct n'a été réalisée que sur un sous-groupe de patients atteints de cancer colorectal métastatique.

Par ailleurs, il n'y a pas de groupe contrôle sans cancer ne permettant pas de conclure à la Sp de l'ADNct. Dans cette étude, les techniques de détection utilisées étaient le BEAMing (PCR en émulsions sur billes magnétiques et analyse en cytométrie de flux) pour les anomalies moléculaires à type de délétion, insertion ou substitution et la ddPCR pour les réarrangements. L'analyse par NGS n'a été introduite qu'au cours de l'étude, et le seul groupe dont tous les patients ont été analysés par NGS est celui des cancers colorectaux métastatiques.

En 2015, Sausen M *et al.* dans une étude prospective sur une cohorte de patients suivi pour un AP, incluant au total cinquante et un patient avec un AP non métastatique, confirmaient que la Se diagnostique de l'ADNct n'était que de 43%<sup>138</sup>. La Sp était elle bien plus performante puisqu'estimée à plus de 99%. L'étude utilisait la ddPCR sur ADNct pour la détection de mutations du gène *KRAS*. La Sp avait été contrôlée en réalisant le test chez cent soixante personnes apparemment saines.

Par la suite en 2018, Cohen JD *et al.* s'intéressent spécifiquement à l'ADNct dans les stades précoces en incluant mille cinq patients présentant huit types de cancer différents non métastatiques<sup>139</sup>. Ils incluent aussi huit cent douze patients sains dans un groupe contrôle. Dans cette étude, la détection de l'ADNct est associée au dosage de protéines plasmatiques définies comme ayant un potentiel diagnostique de chaque cancer après revue de la littérature (dont les marqueurs sériques ACE, CA 19-9). Ce test combiné tente de pallier l'une des limites énoncées précédemment de l'ADNct : une mutation détectée peut être commune à plusieurs types de cancer. Il apparaît donc nécessaire de parvenir à affiner l'origine cellulaire de la mutation détectée dans le sang. La Se diagnostique moyenne de ce test parmi l'ensemble des cancers était de 70%, et la Sp de 99%. Dans le groupe des patients atteints d'AP la Se était aussi de 70%, et la concordance entre plasma et tumeurs de 100%. Par ailleurs, le test combiné menait dans 80% au diagnostic pour l'AP. Les limites énoncées par l'auteur sont que la majeure partie des patients inclus dans l'étude était symptomatique.

Enfin en 2020, dans une méta-analyse conduite par Zhu *et al.* incluant 7 études publiées entre 2002 et 2019, la Se moyenne et la Sp moyenne attribuée à l'ADNct pour le diagnostic d'AP était respectivement de 64% (intervalle de confiance à 95% : 58-70%) et 92% (intervalle de confiance à 95% : 88-95%).<sup>39</sup>

**Tableau 11** : ADN tumoral circulant et performance diagnostique grâce à des techniques de *Polymérase Chain Reaction*

Étude	Type de cancer	Nombre de patients	Stade tumoral	Performances diagnostiques : Sensibilité (Se) et spécificité (Sp)
Bettegowda C <i>et al.</i> , 2014 <sup>135</sup>	AP et autres néoplasies	640 dont 155 AP	Tous	Pour l'AP, -Se chez les patients métastatiques = 90 % -Se chez les patients non métastatiques : 48% -Sp non calculable car par de groupe contrôle
Sausen M <i>et al.</i> , 2015 <sup>138</sup>	AP	51	Non métastatique	Se = 43% Sp = 99%
Zhu <i>et al.</i> , 2020 <sup>39</sup>	AP	242	Métastatique : 1 étude Tous : 4 études	Se = 64% Sp = 92%

ADNct : ADN tumoral circulant, AP : adénocarcinome du pancréas, PCR : *polymérase chain reaction*, Se : sensibilité, Sp : Spécificité

L'ADNct dans le cadre diagnostique ne semble donc pas encore parvenir, avec les techniques actuelles de détection, à avoir une Se suffisante pour en faire un test de dépistage de l'AP. La Sp semble cependant satisfaisante, pouvant en faire un bon outil diagnostique. Certains auteurs misent d'avantage sur la détection d'ARN ou d'exosome circulant plus stables et présents en plus grande quantité dans le sang comme évoqué précédemment<sup>35,36</sup>.

## ii) Valeur pronostique

Le potentiel pronostique de l'ADNct pour l'AP a lui aussi suscité beaucoup d'intérêt. En effet, un marqueur biologique permettant de mieux dichotomiser les groupes de patients pour adapter la stratégie thérapeutique est aussi une des pistes envisagées afin d'améliorer la survie des patients atteints d'un AP. Notamment pour les patients éligibles à une chirurgie d'emblée, l'ADNct pourrait orienter vers une chimiothérapie néoadjuvante ou non, et également guider le traitement adjuvant.

Il est admis désormais que la détection d'une mutation du gène *KRAS* dans un contexte d'AP est synonyme d'une survie globale diminuée tous stades confondus<sup>24</sup>.

Une méta-analyse parue en 2021, ayant inclus quarante-huit articles publiés entre 1996 et 2020, s'est intéressée spécifiquement aux résultats de la performance pronostique de l'ADNct<sup>140</sup>. Dans 42 études la recherche d'ADNct était réalisée sur plasma, dont 29 avant tout traitement, 10 avant et après traitement, 2 après le traitement et 1 étude a monitoré l'ADNct tout au long de la prise en charge. La recherche d'une mutation de *KRAS* par l'analyse de l'ADNct était faite dans 41 des études. Seulement 2 études associaient la recherche de mutation du gène *KRAS* à la recherche de mutations d'autres gènes, pour l'une *TP53* et l'autre *HER2*. La technique de ddPCR était la principale utilisée (24 études) et seulement 3 articles rapportaient des résultats en NGS. Les études incluaient des patients à tous stades de la maladie. Les conclusions de la méta-analyse, malgré une hétérogénéité importante entre les études et un biais de publication significatif, sont que la présence d'une mutation du gène *KRAS* avant tout traitement semble fortement corrélée négativement à la survie globale (HR=2,42, IC 95%=1,95–2,99), 31 études ont été incluses. Il en est de même pour la survie sans progression (HR=2,46, IC 95%=2,01–3,00), 19 études étaient incluses dans cette analyse. Par ailleurs, les résultats de la méta-analyse réalisée sur 10 études, retrouvaient une corrélation similaire concernant la présence du gène *KRAS* muté sur dans l'ADNct en post traitement (chimiothérapie, chirurgie) sur la survie globale (HR=3,53, IC 95%=2,56–4,87), et la survie sans progression (HR=3,53, IC 95%=2,49–4,99), sans hétérogénéité détectée entre les études ni biais de publication mis en évidence. Enfin, seules trois études effectuaient une recherche avant et après traitement d'ADNct. La méta-analyse de ces trois études semble confirmer que les patients dont on ne détectait plus de mutation du gène *KRAS* dans le sang circulant après le traitement avait une survie sans progression plus importante que ceux dont l'ADNct persistait (HR=5,30, IC 95%=1,27-27,63)<sup>24</sup>.

Ces résultats sont par ailleurs concordants avec ceux d'une revue de la littérature parue en 2020 sur l'intérêt spécifique de la mutation du gène *KRAS* (Tableau 12)<sup>24</sup>. De même que dans la méta-analyse le pronostic défavorable lié à la présence d'une mutation du gène *KRAS* dans le sang tend à se confirmer. Encore une fois, les études citées regroupent des patients à différents stades de la maladie. Et la méthode principalement utilisée était la ddPCR, quasiment exclusivement sur du plasma.

**Tableau 12** : Rôle pronostique de la détection du gène *KRAS* sur ADN tumoral circulant en PCR digitale en gouttelettes <sup>24</sup>

Référence	Nombre de patients	Stade tumoral	Taux de détection de <i>KRAS</i> muté	Temps de détection de l'ADNct	Valeur pronostique de <i>KRAS</i> muté (p value)	Médiane de SG (KRAS muté vs KRAS sauvage)
<b>Sausen et al.</b> <sup>138</sup> , 2015	51	Résécable	43%	Post chirurgical	Positive (0,015)	Récidive à 15,2 contre 7,9 M
<b>Kinugasa et al</b> <sup>141</sup> , 2015	75	Tous	63%	Au diagnostic	Positive (0,024)	276 J contre 413 J
<b>Takai et al</b> <sup>142</sup> , 2015	259	Tous	Pas de données	Au diagnostic	Positive (0,0001)	9 M contre 24 M
<b>Hadano et al</b> <sup>143</sup> , 2016	105	Résécable	31%	Avant la chirurgie	Positive (0,001)	13, 6 M contre 27,6 M
<b>Cheng et al</b> <sup>144</sup> , 2017	188	Métastatique	83%	Avant initiation premier traitement systémique	Positive (0,019)	4,7 M contre 6 M (mutation KRAS G12V)
<b>*Pietraz et al</b> <sup>145</sup> , 2017	135	Tous	41%	Soit en post chirurgical	Positive (0,002)	19,3 M contre 32,2 M

				ou avant tout traitement systémique		
<b>Kim et al</b> <sup>146</sup> , 2018	106	Tous	78%	Au diagnostic puis tous les trois mois	Positive (0,008)	6 M de moins
<b>Lin et al</b> <sup>147</sup> , 2018	65	Tous	29%	Avant traitement	Négative (0,73)	10 M
<b>Bernard et al</b> <sup>148</sup> , 2019	194	Tous	Pas de données	Avant traitement puis tout au long du suivi	Positive (0,018)	204 contre 440 J

M : mois ; J : jours ; SG : survie globale ; \* : analyse en NGS supplémentaire

### iii) Valeur prédictive

L'AP nous l'avons vu précédemment, est une tumeur présentant un grand nombre d'anomalies génétiques qui sont de mieux en mieux connues. Les différentes études réalisées pour analyser le génome de l'AP confirment que quatre gènes sont principalement retrouvés, à savoir la mutation activatrice du gène *KRAS* et les pertes de fonction des gènes *TP53*, *p16/CDKN2A* et *SMAD4*<sup>8,22</sup>. En plus de ces mutations récurrentes, les AP présenteraient dans 20% des cas des mutations somatiques pouvant être éligibles à des thérapies ciblées<sup>149</sup>.

Pishvaian M *et al.* dans leur étude publiée en 2020 sur une cohorte de 677 patients porteurs d'AP à différents stades, trouvent que 26% d'entre eux présentaient des variants mutationnels éligibles potentiellement à une thérapie ciblée<sup>149</sup>. L'analyse moléculaire était réalisée par NGS sur des biopsies solides. L'objectif principal de l'étude était atteint. Il s'agissait de montrer que les patients ayant une mutation éligible à une thérapie ciblée, avaient une meilleure médiane de survie globale que ceux ayant une mutation éligible ne recevant pas de traitement adapté ou que les patients ne présentant pas de mutation éligible. La médiane de

survie globale était de 2,58 ans pour les patients ayant bénéficié d'un traitement ciblé. Il y avait donc une différence significative puisque la médiane de survie globale était de 1,51 pour les patients ayant une mutation éligible mais sans adaptation de traitement (p value = 0,0004) et de 1,36 ans pour les patients sans mutation éligible détectée (p value < 0,0001). Entre ces deux derniers groupes, il n'a pas été objectivé de différence significative sur la médiane de survie globale (p value = 0,10). L'effet sur la survie des thérapies ciblées était le plus important pour les mutations appartenant au groupe BRCAness (mutations autres que celle des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* entraînant un défaut de la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologe, par exemple les mutation *PALB2* ou *ATM*), aux tumeurs avec instabilité microsatellitaire (MSI) et pour les AP présentant des transcrits de fusion (*ALK*, *NTRK*)<sup>149</sup>.

En 2016, Takai E *et al.* parvenaient à un taux de détection similaire de mutations éligibles potentiellement à une thérapie ciblée selon la Food and Drug Administration (FDA), mais cette fois ci au moyen de l'ADNct, avec taux de 29,2% sur quarante-huit patients<sup>150</sup>. Dans cette étude, il n'y avait pas de suivi ni d'adaptation thérapeutique en fonction des mutations identifiées.

Plus récemment, une étude parue en 2019 portant sur une cohorte de 112 patients détectait chez 68% des patients au moins une mutation éligible à une thérapie ciblée selon la FDA (ayant l'autorisation de mise sur le marché (AMM) ou hors AMM) grâce à l'analyse de l'ADNct par NGS<sup>151</sup> (Tableau 13). Parmi ces patients seuls 8 ont bénéficié d'une adaptation du traitement systémique et seul un patient avait eu un bénéfice sur la survie globale. Par ailleurs, l'étude concluait que l'ADNct semblait plus représentatif des mutations rencontrées dans les métastases que celles présentées par la tumeur primitive. Parmi les patients inclus, 94 étaient métastatiques, pouvant en partie expliquer le taux très important de patients ayant une mutation éligible dans cette étude.

**Tableau 13 :** Mutations objectivées dans l'ADN tumoral circulant potentiellement éligible à une thérapie ciblée selon la Food and Drug Administration dans l'étude de Patel *et al.*<sup>151</sup>

Gène	Fréquence de la mutation dans l'étude (%)	Thérapie ciblée proposée par la FDA
<i>TP53</i>	45,8	BEVACIZUMAB
<i>KRAS</i>	43,8	Inhibiteur de la tyrosine kinase MEK (TRAMETINIB)
<i>CDKN2A</i>	7,1	Inhibiteur de CDK4/6 (PALBOCICLIB)
<i>GNAS</i>	7,1	Inhibiteur de la tyrosine kinase MEK (TRAMETINIB)
<i>MYC</i>	5,4	Inhibiteur de la protéine Bromodomain and extraterminal domain
<i>NF1</i>	5,4	Inhibiteur de la tyrosine kinase MEK (TRAMETINIB)
<i>PIK3CA</i>	5,4	Inhibiteur de de la voie mTor (EVEROLIMUS)

*CDKN2A* : gène codant pour une protéine inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A, FDA : *Food and Drug Administration*, *GNAS* : gène *Guanine Nucleotide binding protein Alpha Stimulating activity polypeptide*, *KRAS* : gène *Kirsten rat sarcoma virus*, *MYC* : gène codant pour le facteur de transcription MYC, *NF1* : gène *Multiple Endocrine* ; *mTOR* : *mammalian (or mechanistic) target of rapamycin kinase*; *Neoplasia type 1*, *PIK3CA* : gène *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*, *TP53* : gène *Tumor protein 53*,

L'AP semble en effet être un cancer qui métastase à un stade tardif de son oncogénèse<sup>26</sup>. En théorie, les métastases de l'AP sont donc un reflet idéal de l'hétérogénéité importante intra-tumorale de l'AP<sup>152</sup>. Les échantillons de plasma contiennent théoriquement l'ADNct de plusieurs sites métastatiques. Par conséquent, le génotypage de l'ADNct peut permettre d'identifier d'avantage de mutations que sur une biopsie tissulaire unique. D'autres cancers au contraire, présentent une hétérogénéité mutationnelle importante entre le site primitif et les métastases. C'est le cas notamment des cancers œsogastriques. Plusieurs études ont montré

que la comparaison de l'analyse en NGS des mutations dans les cancers œsogastriques recherchées sur de biopsies du primitif et de métastases trouvait une différence de résultat d'environ 36%<sup>120,153,154</sup>.

**Tableau 14** : Adénocarcinome pancréatique et thérapies ciblées

Étude	Nombre de patients	Stade tumoral	Technique de détection de l'ADNct	Matériel utilisé pour analyse biomoléculaire	Fréquence de patients éligibles à une thérapie ciblée (%)
Takai E <i>et al.</i> , 2016 <sup>150</sup>	48	Tous dont 81% de patient M+	NGS + PCR	ADNct	29,2
Patel H <i>et al.</i> , 2019 <sup>151</sup>	112	Tous dont 83,9% de M+ ou NR	NGS	ADNct	68
Pishvaian M <i>et al.</i> , 2020 <sup>149</sup>	677	Tous dont 65% de M+ ou NR	NGS	Tissu tumoral	26

ADNct : ADN tumoral circulant, NGS : *Next-generation-sequencing* analysis, M+ : métastatique, NR : non résécable

A ce jour, la seule mutation reconnue comme donnant accès à une thérapie ciblée en routine est la mutation de *BRCA1* et *BRCA2* constitutionnelle qui représente 5 à 7% des patients atteints d'un AP<sup>17</sup>. La thérapie ciblée Olaparib (inhibiteur de PARP) a obtenu une AMM en 2020 pour les patients suivis pour un AP en réponse tumorale ou stable après au minimum seize semaines de chimiothérapie de première ligne à base de sels de platine. L'étude PRODIGE 72 MAZEPPA (NCT04348045) en cours de recrutement tente de prouver ce bénéfice pour les mutations appartenant au spectre BRCAness.

Les thérapies ciblées visant les mutations du gène *KRAS* ont jusqu'à présent été des échecs dès les phases précoces<sup>8</sup>. Un espoir semble cependant concerner un inhibiteur spécifique de la mutation G12C du gène *KRAS*, qui représente 1 à 2% des AP, avec un signal positif sur le

taux de réponse de 50% et l'ensemble des dix patients inclus présentait un contrôle de la maladie. La survie sans progression médiane évaluée dans un étude de phase I était de 6,6 mois chez ces patients présentant un AP non résecable ou métastatique<sup>155</sup>.

Les patients ayant un AP non KRAS muté, environ 10%, sont plus à même de présenter des transcrits de fusion dont la recherche se fait sur l'ARN. Certains de ces transcrits de fusion ont des inhibiteurs spécifiques prometteurs. Le LAROTRECTINIB est un inhibiteur spécifique de la protéine produite en cas de fusion de *NTRK*, détecté dans moins de 0,5% des AP. Il est recommandé comme traitement de première ligne selon le NCCN chez les patients ayant un AP localement avancé ou métastatique présentant un transcrit de fusion du gène *NTRK*<sup>51</sup>. Par ailleurs, l'inhibiteur de la protéine synthétisée suite à la fusion du gène *Neuregulin 1* (*NRG1*, environ 1% des AP) avec différents partenaires, a montré une réponse partielle de 40%<sup>156</sup>.

Un espoir persiste concernant les AP avec instabilité microsatellitaire (MSI), 1 à 2% des AP, bien qu'ils semblent moins bien répondre que les autres tumeurs à l'immunothérapie<sup>157,158</sup>. On peut citer par exemple le PEMBROLIZUMAB qui a montré dans une étude parue en 2017 un taux de réponse de 83% chez des six patients inclus ayant un AP MSI, mais avec une durée médiane de réponse de 2,6 à 9,2 mois<sup>159</sup>. Une autre étude de phase II, montrait une survie globale de 4 mois et une survie sans progression de 2,1 mois pour des AP MSI traités par PEMBROLIZUMAB<sup>160</sup>.

Le traitement personnalisé est donc une piste d'avenir afin de parvenir à une amélioration du pronostic de l'AP. L'ADNct semble avoir toutes les caractéristiques pour accompagner cette démarche.

## 5. ADIPAN: but de l'étude

La détection à des stades précoces de l'AP demeure un des enjeux principaux pour améliorer la survie de ce cancer. Or comme expliqué précédemment, les moyens diagnostiques et encore plus les moyens de dépistage de l'AP demeurent imparfaits.

L'étude prospective ADIPAN débutée en Mars 2021 au CHU de Poitiers, s'est intéressée à l'apport diagnostique de l'analyse moléculaire des prélèvements issus de la FNB et de l'ADNct dans le cadre du bilan de lésion du pancréas. Pour cela, ont été inclus des patients adressés dans le service de gastro-entérologie du CHU de Poitiers pour bénéficier d'une échographie digestive haute pour bilan de lésion pancréatique sans diagnostic histologique préalable.

Une recherche de mutations des gènes *KRAS* et *GNAS* sera réalisée sur la ponction-biopsie pratiquée durant l'EE, par méthode ddPCR. De plus, pour chaque patient, un prélèvement sanguin sera effectué lors de son hospitalisation pour l'EE, afin de rechercher la présence d'ADNct par ddPCR pour les mutations *KRAS* et *GNAS*, couplée à une analyse NGS.

Dans l'article qui va suivre, nous faisons une première analyse de la population incluse, des performances diagnostiques de la ponction biopsie classique par EE et une mise au point sur la méthode pré-analytique des prélèvements soumis à l'analyse moléculaire (ponction-biopsie des lésions pancréatiques et ADNct).

## **Deuxième partie: Article**

### **Introduction**

Pancreatic adenocarcinoma (PA) represents 90% of pancreatic cancers and has a huge increase of its incidence since the beginning of the 21<sup>st</sup> century. Indeed, in 2008 the incidence was considered "low", with 277,000 new cases diagnosed per year worldwide. The latest GLOBOCAN data for 2020 confirms this upward trend with an incidence of 496,000 new cases<sup>1</sup>. Prognosis of PA remains poor with therapeutic progress and an overall survival rate at five years for all stages about 10%.

The only curative treatment for PA is surgery, which can only be offered to 20% of patients because the diagnosis is often made at an unresectable locally advanced or metastatic stage. Indeed, one of the major issues to improve the prognosis of PA is to detect it earlier. Up until now, there is still no screening program due to no validated biomarker of PA. In addition, the diagnosis is sometimes difficult and late due to non-specific symptoms.

PA is a cancer with high number of genetic mutations, some of which can already be seen in the precursor lesions. Notably in 90% of PA, the activating mutation of the *KRAS* oncogene, which represent one of the earliest oncogenic events driving pancreatic carcinogenesis<sup>22</sup>. Indeed the mutation is already present in the early stages of pancreatic intraepithelial neoplasia lesion (PanIn) and intraductal papillary and mucinous neoplasm (IPMN), two precancerous lesions of PA<sup>8</sup>. It is also recurrent in mucinous cystadenoma neoplasm (MC), the last precancerous lesion of PA.

The upper gastrointestinal echo-endoscopy (EUS) is a very good diagnostic test for solid lesions of the pancreas with a sensitivity (Se) of 92-100% and a specificity (Sp) of 89-100%<sup>47,48</sup>. However, its performance in the diagnosis of mucinous cystic lesions, which include IMPN and MC, is imperfect even with the realization of a biopsy during the examination (EUS-FNB) with a Se of 42% and a Sp of 99%<sup>29</sup>. This sometimes requires a second EUS to extend the time to treatment. However, nearly 10 to 20% of lesions remain undiagnosed<sup>72,73</sup>. Thus, some lesions can be managed without histological evidence.

In this context, studies have shown the interest in searching for the *KRAS* mutation on EUS-FNB to improve the diagnostic performance of mucinous cystic lesions of the EUS.

Sensitivity was increased to 75-80% and specificity to 88%<sup>54,55</sup>. However, today no guideline integrates the mutational analysis of EUS-FNB in clinical routine practice for the diagnosis of a pancreatic lesion probably due to the lack of specificity and sensitivity to diagnose PA to pre-malignant lesion<sup>29</sup>.

Circulating tumor DNA (ctDNA) represent a major advance in oncology at all stages of the cancer management, notably as a predictor of resistance to targeted therapy in metastatic disease. In PA ctDNA level has demonstrated its prognostic value in advanced PA. Up until now very few studies have evaluated ctDNA as a biomarker to help for the diagnosis of malignancy of a pancreatic lesion<sup>138,139</sup>. A meta-analysis conducted in 2020 by Zhu. *et al.* including 7 studies published between 2002 and 2019, attributed a mean Se of 64% and a mean Sp of 92% for PA diagnosis to ctDNA<sup>39</sup>. In addition, there is no standardization of the genes studied, the pre-analytical methods and the techniques used to determine ctDNA<sup>110,111</sup>. Currently, one of the most sensitive methods of detecting ctDNA is the digital droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR), which has a very sensitive detection rate of between 0.001 and 0.005%<sup>106</sup>. Thus, ddPCR could theoretically detect a somatic variant in ctDNA even if there are only one to five copies of ctDNA per 100,000 copies of cfDNA, if the amount of DNA to be analyzed is sufficient.

The aim of the ADIPAN (ADNct for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma) study was to evaluate the improvement of PA diagnosis using molecular analysis on EUS-FNB and ctDNA, as compared routine pathological analysis of the FNA alone.

## Methods

### *Population*

All consecutive patients who undergone an EUS-guided FNA at Poitiers University Hospital to characterize a pancreatic lesion detect on imaging were included in the ADIPAN prospective study.

Main inclusion criteria were age older than 18 years and agree to participate to the study. Non-inclusion criteria were patients with a prior cancer within the two years. Written informed consent was obtained before study procedures.

### *Study design*

ADIPAN is a monocentric prospective study that began on March 8<sup>th</sup>, 2021 and is still ongoing. The protocol was approved by the “*Comité de protection des personnes*” East IV (number 20/48 / SI 20.05.29.44000, on July 7<sup>th</sup>, 2020).

All EE was performed by two gastroenterologists who have already performed over 100 exams (MW and CB).

Main patients (age, gender, first symptoms) and pancreatic lesion (location, diagnosis hypothesis) informations were collected. In addition, we collected type and delay of first symptoms suggesting a pancreatic lesion, delay between EE and first imaging, and symptoms at the date of the EE (loss of weight, asthenia, jaundice, abdominal pain, diabetes.). All pathological results were analyzed by one expert pathologist (JMG) and classified using the *Papanicolaou Society of cytopathology* (PSC). The biopsy was considered positive for the diagnostic of PA if it was classified V (malignity suspected) or VI (malignity confirmed). The biopsy was considered negative for the diagnostic of PA if it was classified I, II, III or IV (non-diagnostic, negative for malignancy, atypical, neoplastic), as recommended.

We also described the treatment received for the pancreatic lesion and if other pathological results are available (other biopsy, surgery) to determine the final diagnosis of the pancreatic lesion.

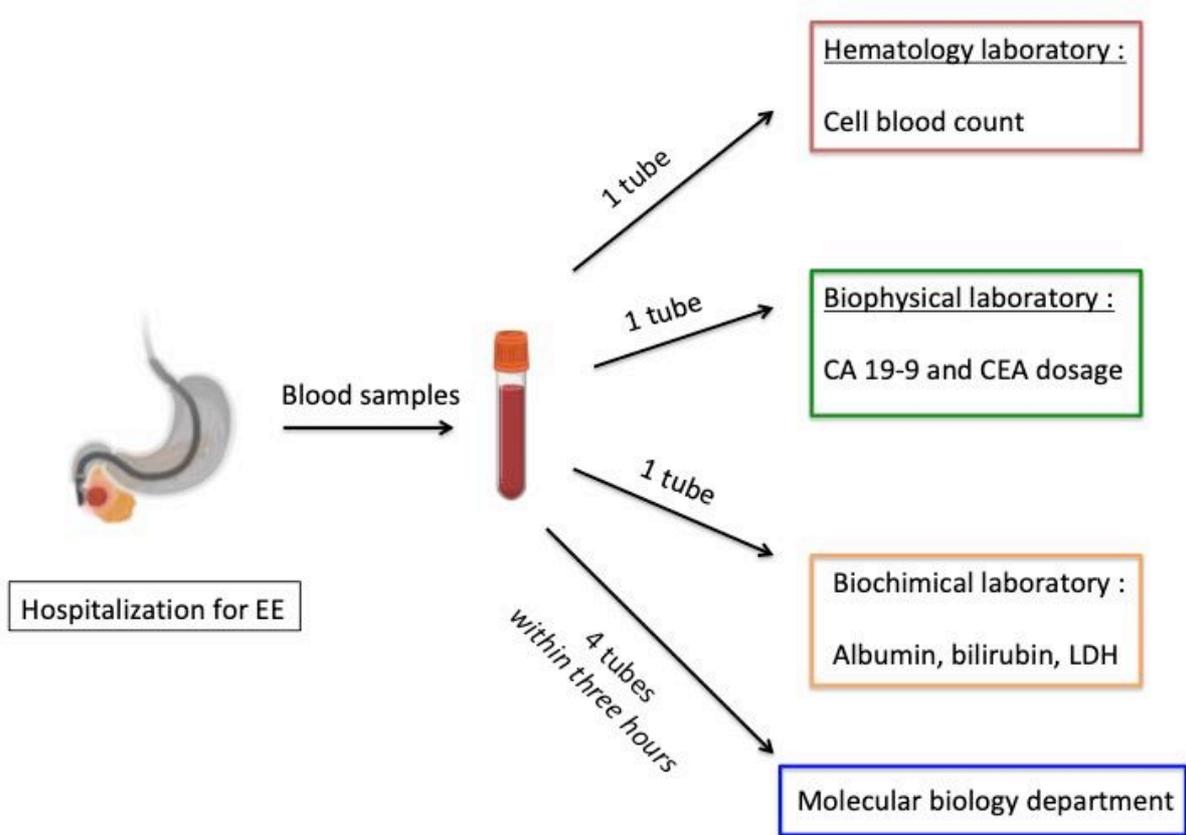
The trial was founded by “*Comité d’Orientation Recherche Cancer en Nouvelle Aquitaine*” and the sponsor is Poitiers University hospital.

### *Analysis done on blood samples*

On the day of the EUS, blood samples were collected on EDTA-containing tubes to perform molecular and routine biophysical/biochemical/hematological analyses (Figure 11). For

molecular analysis, blood samples were centrifuged at 1500xg for 10 minutes within 3 hours of collection to collect plasma. Plasma was then stored at -80°C until its used. After a 2<sup>nd</sup> centrifugation at 10 000xg for 10 minutes at 4°C, the QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to isolate cell free DNA (cfDNA) from plasma sample according to the manufacturer’s instructions.

**Figure 11:** Blood samples collected during the study



CA 19-9: Cancer antigen 19-9, CEA: carcinoembryonic antigen, EUS: upper gastrointestinal endoscopy, LDH: Lactate dehydrogenase

*Analysis based on samples from EUS-FNB*

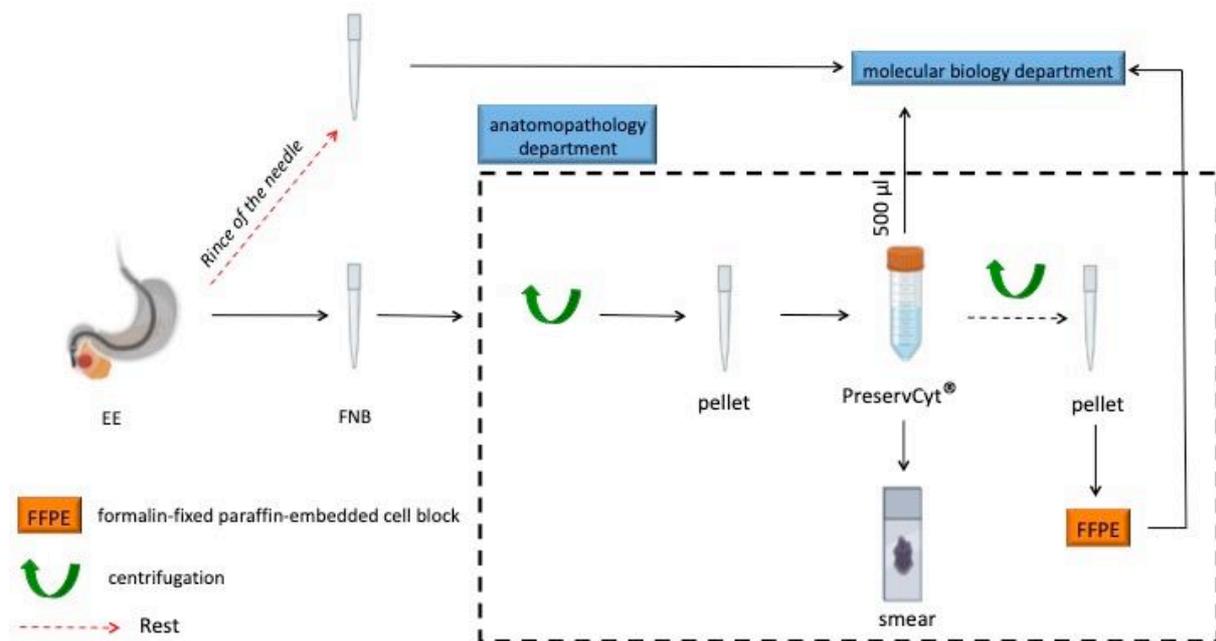
EUS-FNB of the pancreatic lesion were pooled in CytoLyt® (Hologic, Marlborough, Massachusetts, United States of America) solution and then the needle was air-rinsed in another vial of CytoLyt® for molecular analyses. The CytoLyt® vial containing tissue fragments was sent to the pathology department for routine analysis (Figure 12). During formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cellblock preparation, a 500µl-aliquote of Preservcyt® (Hologic, Marlborough, Massachusetts, United States of America) with tissue

fragment was taken. It was then centrifuged, the supernatant was removed and the cells pellet was stored at -20°C until molecular analyses.

The CytoLyt® vial from the air-rinsed needle was centrifuged at 1500xg for 10 minutes and the cells pellet was stored at -20°C. DNA from the supernatant was precipitated by adding pre-chilled isopropanol at vol/vol (approximately 20 mL) and stored overnight at -20°C. The solution was then centrifuged for 30 minutes at 4°C. After decanting, DNA pellet was resuspended in one-time concentrated Phosphate-Buffered Saline and extracted with AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction. Cell pellets obtain from the PreservCyt® were extracted using the same method.

DNA extraction from FFPE block was performed using KAPA Express Extract Kits® (KAPA Biosystems, CliniSciences, Nanterre, France).

**Figure 12:** Description of the different samples derived from the fine needle biopsy and analyzed in pathological department (routine practice) and used for molecular analyses (ADIPAN study)



EUS: upper gastrointestinal echo-endoscopy, EUS-FNB: fine needle biopsy

#### *Analysis of ctDNA using ddPCR*

Quantification of DNA (obtained on FNB) and cfDNA (obtained on blood) was determined using the QuBit® fluorimeter with the Qubit dsDNA Kit (ThermoFisher Scientific). DNA extracted from all kinds of samples (plasma, cystic fluid, "Cytolyt" and "PreservCyt" tubes)

were analyzed with an in-house developed Next-Generation-Sequencing (NGS) panel (24 genes) and with ddPCR for *KRAS* mutation status only.

For ddPCR, the seven most frequent *KRAS* mutations were analyzed simultaneously using the multiplex ddPCR™ *KRAS G12 / G13* Screening Kit (p.G12V, p.G12D, p.G12R, p.G12C, p.G12A, p.G12S, and p.G13D; BioRad, Hercules, California, United-States), as described previously. Briefly 10 ng of DNA/cfDNA were analyzed using the QX200 Droplet Digital PCR platform (Bio-Rad) according to the manufacturer's standard protocol. Results were analyzed and interpreted using QuantaSoft™ software version 1.7.4.0917 (BioRad). Results were expressed by mutant allelic frequency (MAF). To avoid any false positive results, a sample was considered positive if at least 3 droplets were present in the Fluorescein amidites (FAM) channel.

#### Statistical analysis

Actually the sensibility of EUS with EUS-FNB to confirm a PA is about 75%<sup>73</sup>. We hope to increase this sensibility to 95% using analyses of ctDNA and DNA in EUS-FNB samples. Rate of malignant lesions among patients coming for an EE with a EUS-FNB at Poitiers University Hospital to explore a pancreatic lesion is almost 60%. With an alpha level of 5%, a beta level of 10% and a power of 90% with a margin error inferior to 4% for the estimation of the sensibility, it was necessary to include at least 194 patients. Considering that approximately 10% of patients will not had a definitive diagnosis of their pancreatic lesion it was necessary to include 214 patients.

The primary endpoint was to determine the sensitivity of molecular analysis of DNA from EUS-FNB and ctDNA in addition to the pathological analysis of the EUS-FNB obtained by EUS to detect the malignity of a pancreatic lesion. We aimed to increase the Se to 95% with this combination The molecular analysis of DNA from EUS-FNB and plasma was considered positive for the PA diagnosis when a *KRAS* mutation was detected by NGS and/or ddPCR.

Secondary endpoints were to evaluate the sensitivity and specificity of each test alone, i.e. routine pathological analysis, molecular analysis on ctDNA and tumoral DNA (tDNA) extracted from EUS-FNB for the diagnosis of malignancy of a pancreatic lesion. Finally, we aimed to assess the prognostic value of *KRAS* mutated ctDNA.

## Results

### 1) Patients and pancreatic lesions characteristics

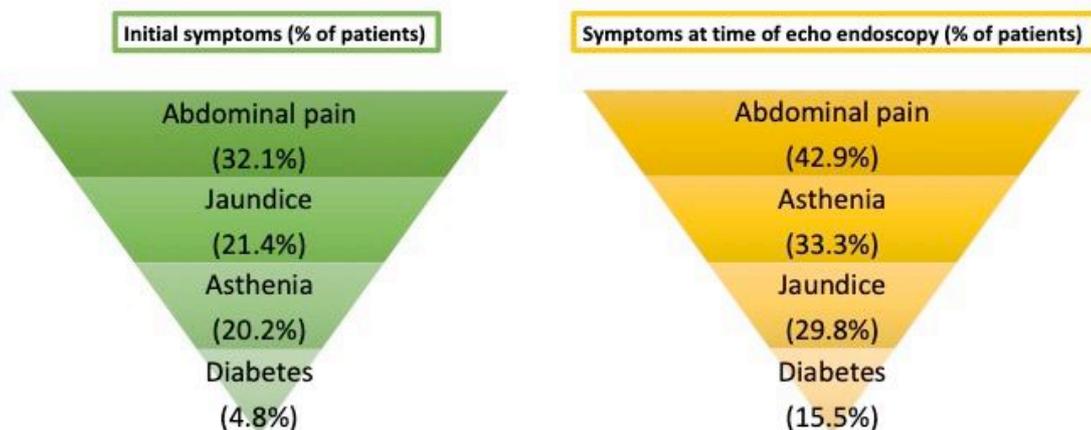
From March 2021 to July 2022, 84 patients were included in the « ADIPAN » study: 39 women and 45 men, with a mean age of 53 years (Table 15). Among the 84 patients, 23/84 patients (27%) had a history of diabetes mellitus and 3 patients had a family history of PA.

The most frequent location of pancreatic lesion was the head of the pancreas (n=46; 55%). Among the 84 patients, 53 lesions were suspected to be a pancreatic adenocarcinoma after the EUS examination. Among these 53 suspected PA, 12 lesions were described on the EE's report as resectable according to current recommendations.

The most frequent first symptom was abdominal pain (n=27/84; 32.1%) followed by jaundice (n=18/84; 21.4%) and asthenia (n=17/84; 20.2%) (Figure 13). Pancreatic lesion was discovered fortuitously for one third of the population (n=27/84; 32.1%).

At the time of the EUS, the most frequent symptom described was loss of weight (n=39/84; 46.4%) with a mean weight loss of 7%. Other frequent symptoms included abdominal pain (n=36/84; 42.9%) and asthenia (n=28/84; 33.3%).

**Figure 13:** Symptoms described by the patients



**Table 15:** Patients and tumors characteristics

	Number = 84 (%)
Gender: Male	45 (53.6%)
Mean age (years, range)	53 [27-89]
<b>Risk factor for pancreatic cancer</b>	
Diabetes mellitus type II	21 (25%)
Diabetes mellitus type I	2 (2%)
IPMN	4 (5%)
MEN1	2 (2%)
Family history of pancreatic cancer	4 (5%)
<b>Site of the initial imagery</b>	
Poitiers University hospital	33 (39.3%)
Others	51 (60.7%)
<b>Primary tumor site</b>	
Head	40 (47.6%)
Isthmus	6 (7.1%)
Body	22 (26.2%)
Tail	7 (8.3%)
Multiple	4 (4.8%)
Extra-pancreatic	5 (6%)
<b>Tumor stage at echo-endoscopy for suspected pancreatic adenocarcinoma (n=53)</b>	
Resectable	12 (22.6%)
Borderline	12 (22.6%)
Locally advanced	14 (26.4%)
Metastatic	11 (20.8%)
Not evaluable	4

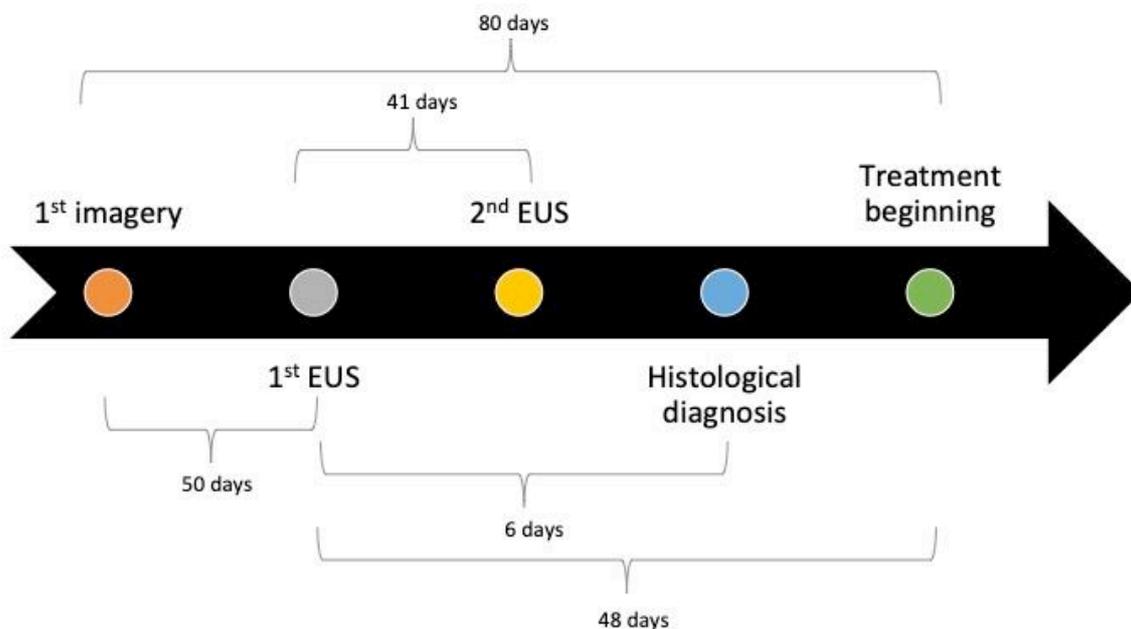
IPMN: Intraductal papillary mucinous neoplasm, MEN1: Multiple endocrine neoplasia type 1

## 2) Delay of patients care

Abdomino-pelvic and thoraco-abdomino-pelvic CT-scan were the two major first exam practiced (respectively n =26/84; 31% and n=25/84; 29.8%). Other imaging performed included abdominal ultrasound (n=7/84; 8.3%), pancreatic MRI (n=6/84; 7.1%) and PET scan

(n=4/84; 4.8%). The mean delay between the first imaging exam and the EUS was 50 days (range 2 - 433 days) and for 75% of the patients the delay was between 12 and 43 days (Figure 14). When the pancreatic lesion was discovered incidentally the mean delay was longer (80 days) and by contrast for patients with jaundice the delay was shorter (14 days). The initiation of the treatment (chemotherapy or surgery) was on average 80 days after the first imaging and 48 days after the EUS (n= 73/84, excluding patients with no treatment and only a surveillance of the pancreatic lesion). Among patients with a suspected pancreatic adenocarcinoma after EUS who underwent surgery without prior treatment (n=8), the mean time between surgery and the first imaging was 63 days and 44 days after EUS.

**Figure 14:** Main average delays during care



EUS : upper gastrointestinal echo-endoscopy

### 3) Pathological results and classification of pancreatic lesions

Regarding pathological analyses, half of the biopsy of the 78 pancreatic lesions made during the first EE were classified in the V or VI class (n=41/78; 52.6%) of the PSC for pancreatic lesion (Figure 15). Two patients did not have a biopsy during the EE due typical benign aspect of an intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) without worrisomes features. In addition, 4 patients had an extra-pancreatic lesion (hepatic node, supra-ampullary lesion, lymph nodes).

For 12 patients (n=12/78; 15.4%) the conclusion of the pathological analysis was « non-diagnostic » (class I according to PSC for pancreatic lesions).

9 patients benefited of a second EUS either because they had a « non-diagnostic » EUS-FNB (n=5/9) or because of a discrepancy between the diagnostic hypothesis made following the EUS and the conclusion of the histological analysis (n=4/9) (Table 16). The mean delay between the EUS was 41 days.

**Table 16:** Patient who benefited of a second upper gastrointestinal echo-endoscopy

Patient	Diagnosis Hypothesis	PSC of 1 <sup>st</sup> EUS-FNB	PSC of 2 <sup>nd</sup> EUS-FNB	Other diagnosis strategy	Final histological diagnosis
1	PA	I	I	Surgery	PA
2	PA or AIP		II	Corticosteroid therapy	AIP
3	NET		IV	[REDACTED]	NET
4	PA		V		PA
5	NET		I	Surgery	NET
6	PA	II	II	Biopsy of an adenopathy	PA
7	PA		VI	[REDACTED]	PA
8	PA	III	III	[REDACTED]	PA*
9	NET or GIST	IV	IV	[REDACTED]	NET

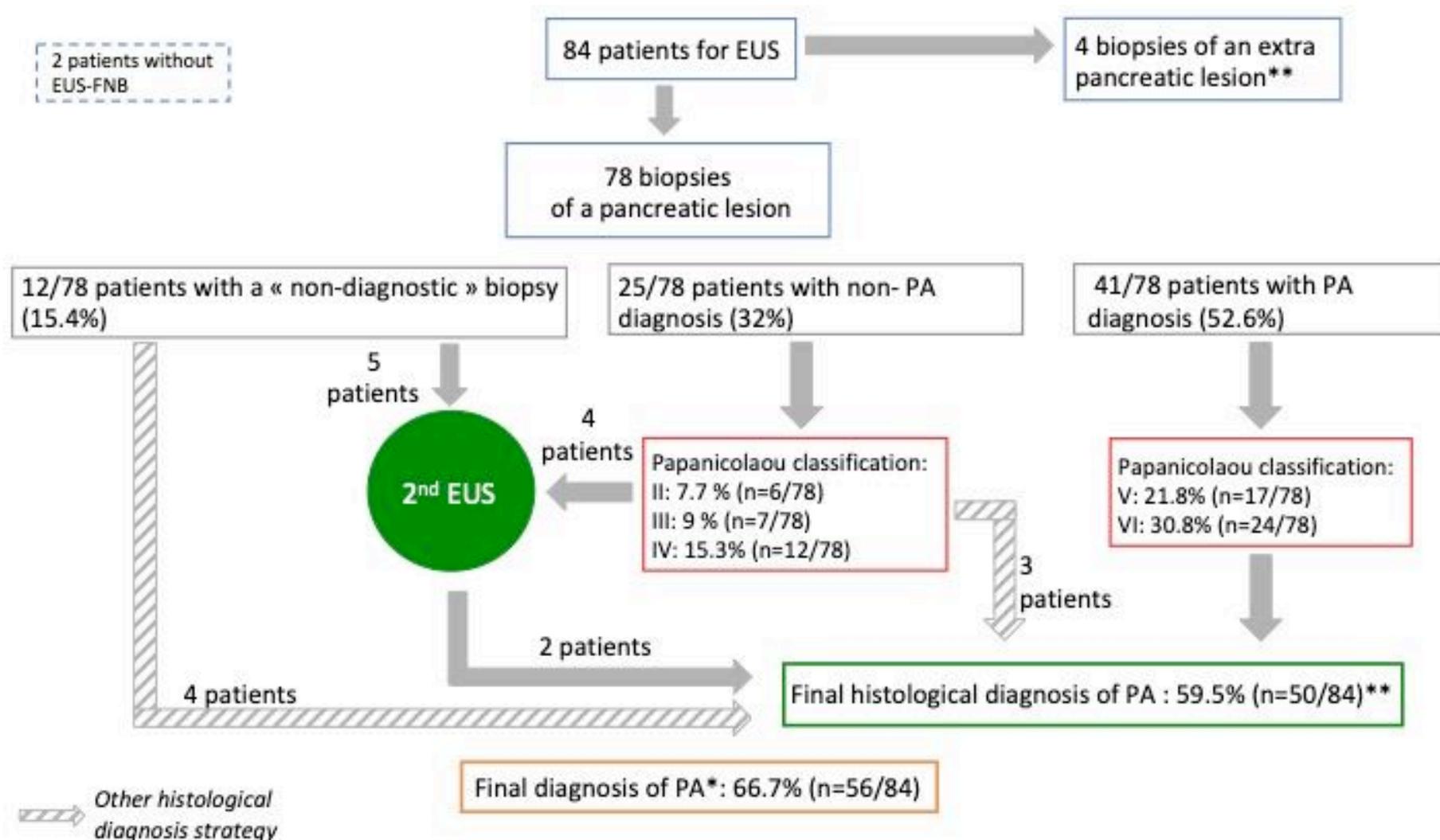
AIP : autoimmune pancreatitis, EUS-FNB : fine needle biopsy, NET : neuroendocrine tumor, PA : pancreatic adenocarcinoma, PSC : class of Papanicolaou Society of cytopathology for pancreatic lesion, \* : received chemotherapy validated in PA without a histologically proven PA

The pathological diagnosis of PA was finally done for 50/84 patients (59.5%), thanks to a second EE or biopsies of another tumor site (hepatic, lymph node,...).

The main pathological diagnosis after PA was neuroendocrine tumor (NET) (n= 13/84; 15.4%).

Finally, 56/84 (66.7%) patients were considered to have a PA thanks to a histological proof or treated as well without a histologically proven. Indeed 6 patients (n=6/84; 7.1%) received chemotherapy despite an histologically proven PA.

**Figure 15:** Management of the biopsies of pancreatic lesion



EUS: upper gastrointestinal echo-endoscopy, PA: pancreatic adenocarcinoma, \*: 6 patients were treated as a PA without an histological proven, \*\*: one patient had finally a diagnosis of PA, “non-diagnostic”: class I according *Papanicolaou Society* classification

#### 4) Diagnostic performance of cancer antigen 19-9

At the date of the EUS, the mean level for the Cancer antigen 19-9 (CA 19.9) was 1378.4 UI/l.

Considering only lesions classified as PA after first EUS-FNB (n=41/84; 48.8%), those described as resectable (n=12) have a mean CA 19-9 rate of 540 UI/l. In contrast, lesions suspected of being metastatic or locally advanced PA had a mean serum CA 19-9 level of 863 UI/l.

We compared the diagnostic performance of CA19-9 with that of EUS-FNB (Table 17). We arbitrarily chose for CA19-9 to consider the upper limit, which is the reference in our laboratory (N=27 UI/l). The value of 200 UI/l as cut-off for diagnosis was also evaluated. This cut-off in the literature is described as in favor of a resectable PA if the CA 19-9 is lower than 200 UI/l.

For the Se and Sp calculations, 77 patients were included (56/77 with a diagnosis of "PA", and 21/77 classified as non "PA"). Indeed, for eight patients there was still diagnostic errancy at the end of the data collection. Among these 77 patients, the CA 19-9 level was not available for 1 patient in the control group and 2 in the group classified as "PA" (not performed).

For the Se and Sp calculations of the EUS, in the control group (n=21), patients without a diagnosis were excluded (non-diagnostic biopsy, morphological criteria not typical of a specific lesion type). This represents 3 patients for the 1st EUS and 1 patient for the 2nd EUS.

**Table 17:** Comparison upper gastrointestinal echo-endoscopy and Cancer antigen 19-9 for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma

CA 19-9 (UI/l)	Finally classified as « PA » N=	Finally classified as non « PA » N=	Total of patient
>27	45	7	52
< 27	9	13	24
Total of patient	54	20	74
<b> </b>			
> 200	32	1	33
< 200	22	19	41
Total of patient	54	20	74

	Finally classified as « PA » N=	Finally classified as non « PA » N=	Total of patient
Classified as « PA » according 1 <sup>st</sup> EUS-FNB	41	0	41
Classified as non « PA » according 1 <sup>st</sup> EUS-FNB	15	18	33
Total of patient			74
<b> </b>			
Classified as « PA » according 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> EUS-FNB	43	0	43
Classified as non « PA » according 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> EUS-FNB	13	20	33
Total of patient			76

	Sensibility (%)	Specificity (%)
CA 19-9 > N	83	65
CA 19-9 > 200 UI/l	59	97
First EUS-FNB	73	100
Second EUS-FNB	77	100

CA 19-9: Cancer antigen 19-9, EUS: upper gastrointestinal echo-endoscopy, EUS-FNB : fine needle biopsy, N = 27 UI/l, superior limit of normal value in our laboratory, PA: Pancreatic adenocarcinoma

5) Other histological diagnostic strategy than upper gastrointestinal echo-endoscopy

For 7 patients of the 12 whose first EUS-FNB was « non-diagnostic », another way to obtain a pathological examination was chosen (surgery or CT-scan-guided biopsy, n=4) or a surveillance was proposed because the morphologic criteria on imaging and EUS suggested a non-malignant lesion (cystadenoma kyst, auto-immune pancreatitis, n=3).

Also, 10 patients with a pancreatic lesion whose morphologic criteria after the first EUS were suggestive of PA, but with histological diagnosis of EUS-FNB not in favor, did not have a second EUS (Table 18). Only 4 patients benefited of another strategy to obtain a histological proof (surgery, biopsy of a liver metastasis or of a carcinosis node). They final histological diagnosis for these 4 patients, was PA except for one which was NET. Finally, 7 patients were treated as a PA including 4 patients without a histologically proven PA.

**Table 18:** Discordance between morphological criteria suggesting a pancreatic adenocarcinoma and pathological analyses of first EUS-guided FNB

Patients	PSC of 1 <sup>st</sup> EUS-FNB	Other diagnosis strategy	Final diagnosis
1	I	Surgery	PA
2		No	Missing data
3	II	No	PA*
4		Surgery	PA
5	III	No	Missing data
6		No	PA*
7		Biopsy of liver metastasis	NET
8		Biopsy of carcinosis node	PA
9		No	PA*
10	IV	No	PA*

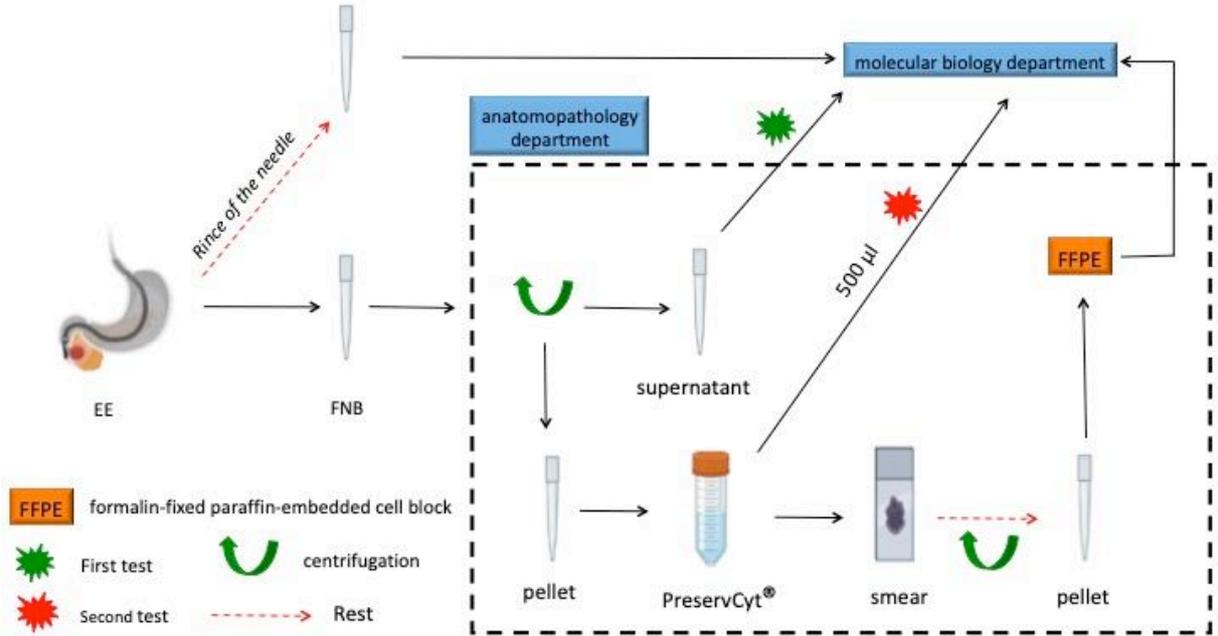
EUS-FNB : fine needle biopsy, NET : neuroendocrine tumor, PA : pancreatic adenocarcinoma, PSC : class of Papanicolaou Society of cytopathology for pancreatic lesion, \* : received chemotherapy validated in PA without a histologically proven PA

6) Molecular analysis of tumor DNA and ctDNA

The first molecular analyses were performed for 3 patients to confirm the feasibility of the study and then 2 patients with modification of protocol. Indeed, between the first three

patients analyzed, and the next two patients, time of collection of the sample from the FNB was different (Figure 16). The aim was to increase the level of DNA in order to increase the sensitivity to detect a *KRAS* mutation.

**Figure 16:** Management of samples analyzed



EE: upper gastrointestinal echo-endoscopy, FNB: fine needle biopsy

It was noted that DNA concentrations of FNB samples are higher during the second test (patient D and E, Table 19). Concerning ddPCR and NGS analysis, patient C is the only one whose ddPCR and NGS analysis show a *KRAS* mutation on all the samples from the different samples obtained during the EE (FNB, rinse of the needle and FFPE). The mutation was not found in the plasma, neither by ddPCR or NGS. This patient had a metastatic adenocarcinoma (hepatic and peritoneal metastasis). Two patients, patient A and D, had a *KRAS* mutation detected in circulating DNA. This mutation was detected by ddPCR but not with NGS for both patients, since ddPCR has a higher sensitivity as compared NGS. Patient A had a resectable PA. The diagnosis was note made thanks to the first or second EUS whose EUS-FNB concluded to a benign lesion (II according to PSC) but by lymph node biopsy. The patient D ended up with a diagnosis of a metastatic PA made thanks to a biopsy of a carcinogenesis node. Indeed, his EUS-FNB analysis was classified “atypical” following the PSC, not allowing to conclude with certainty to PA diagnosis. Finally, for the two patients without a PA the *KRAS* mutation was never detected in any sample.

**Table 19:** Results of the molecular analyses

Patient	Sample	DNA concentration (ng/ul)	ddPCR	NGS	Pathological final diagnosis	PSC on EUS-guide FNA
A	EUS-FNB	0.13	Mut KRAS	Wt	PA resectable	II
	Needle's rince	0.68	Mut KRAS	Wt		
	Plasma	2.47	Mut KRAS	Wt		
	FFPE		Mut KRAS	Wt		
B	EUS-FNB	0.05	Wt	Wt	Ampullary carcinoma resectable	
	Needle's rince	Too low	Wt	No result		
	Plasma	1.23	Wt	Wt		
	FFPE		Wt	Wt		
C	EUS-FNB	0.5	Mut KRAS	Mut KRAS	PA metastatic	VI
	Needle's rince	0.5	Mut KRAS	Mut KRAS		
	Plasma	0.44	Wt	Wt		
	FFPE		Mut KRAS	Mut KRAS		
D*	EUS-FNB	1	Mut KRAS	Mut KRAS	PA metastatic	III
	Plasma	2.85	Mut KRAS	Wt		
	FFPE		x	x		
E*	EUS-FNB	3.6	Wt	Wt	NET	IV
	Plasma	6	Wt	Wt		
	FFPE		Wt	Wt		

ddPCR : digital droplet PCR analysis, FFPE : formalin-fixed, paraffin-embedded tissue,

Incomplete NGS coverage, Mut KRAS: KRAS mutation, NET: Neuroendocrine tumor, NGS: Next generation sequencing analysis, PA: pancreatic adenocarcinoma, PSC: classification of the first FNB following the Papanicolaou Society of cytopathology for pancreatic lesion, Wt: wild type, X: analysis not done, \*No Needle's rince for second kind of test because of insufficient performance

## Discussion

The population we included is on average 53 years old, with a sex ratio close to one. The main histological diagnosis of the pancreatic lesions studied was PA. Moreover, the lesions are mainly cephalic, unresectable lesions.

EUS-FNB, considering only first EE, were classified after histological analysis in more than one case out of two (n= 41/78; 52.6%) as «suspicious for malignancy», or «malignant» class V and VI following PSC. 15.4% (n= 12/78) of the samples were «non-diagnostic» (PSC class I) after the first EUS.

Concerning the diagnostic performance for PA in our study, CA 19-9 had at best a Se of 83% for a Sp of 65%, if we consider the cut-off of 27  $\mu\text{mol/l}$ , the upper normal of CA 19-9 in our laboratory. The diagnostic Sp of CA 19-9 increased to 97% at the expense of a Se of 59% for a cut-off of 200  $\mu\text{mol/l}$ . The diagnostic Se of EUS-FNB after a single EUS was 73% for a Sp of 100%. The Se increased to 77% after a second EUS-FNB, without modification of the Sp. 7.1% (n=6/84) of patients managed as PA, received systemic therapy without histological evidence.

Finally, the first molecular biology analyses performed on five patients of the study confirm the better detection sensitivity of ddPCR than NGS analysis on all the samples analyzed. *KRAS* mutation in ctDNA was detected in two patients, but only by ddPCR: one patient with resectable adenocarcinoma of the ampulla of Vater, and one patient with metastatic PA. Mostly, for the two patients without PA, the *KRAS* mutation was never detected, this seems in favor of the known specificity of the mutation for PA in pancreatic lesion<sup>22</sup>.

These first data on our population seem rather reassuring, as it is close to the one described in the literature concerning epidemiology (sex ratio close to one, predominantly unresectable cephalic lesion, a majority of PA)<sup>1,8</sup>. However, there are some discrepancies, notably the proportion of PA (59.5%), which although a majority, is not as high as usually reported. Indeed, in the literature, PA represents 90% of malignant lesions of the pancreas. This may be explained by the fact that EUS is not the first-line examination for obtaining histological evidence for suspected PA. Histological evidence should be obtained by the easiest means, which is often biopsy of a liver metastasis under ultrasound<sup>30</sup>. Furthermore, patients in our study did not only present with malignant lesions of the pancreas.

On the other hand, our patients are somewhat younger. The peak incidence is currently between sixty and eighty years old, although in recent years more and more cases are

observed in younger population, with more severe forms<sup>1,6</sup>. Finally, usually tumors of the head of the pancreas represent a much larger proportion than in our study. The differences in age and tumor location may be partly explained by the fact that for a third of the cases (n=27/84; 32.1%), the lesion was discovered incidentally in our study. However, in the context of PA, it is mainly discovered when it becomes symptomatic (jaundice, pain, weight loss, etc.).

Results of the histological analysis made on the EUS-FNB seem to be consistent with those described in the literature<sup>90,91</sup>. We find similar proportions in terms of «non-diagnostic», «negative for malignancy», «malignant» lesions (PSC classes I, III, IV and VI). However, our results are divergent for class V «suspicious for malignancy» which is much more represented in our study (21.8%) than in literature (4.5%). In the opposite, class II seems under-represented (7.7% versus 24.2%). This difference can be explained in part by the fact that our study is prospective, whereas most studies that have looked at this question are retrospective that's why populations are not comparable between our study and retrospective studies in literature.

The diagnostic Se of CA 19-9, with 83%, is close to that described in the literature, 80% for advanced tumors, which represent most of the patients included. The Sp of 65%, against 80% to 90% usually in the literature, is much lower in our study if we consider our best Se<sup>31,32</sup>. Nevertheless, our results confirm that CA 19-9 is not a good diagnosis marker for PA.

In our study, EUS coupled with EUS-FNB analysis for the diagnosis of PA has a Sp similar to that reported in the literature, ranging from 89% to 99%<sup>47,48</sup>. However, in our study, the diagnostic Se for PA was lower, from 73% after the first EUS to 77% after the second EUS, against a Se value usually between 92% and 100% in literature<sup>47,48</sup>. Our lower Se may be partly explained by the fact that not all patients with a lesion suspected of being a PA according to EUS's morphological criteria but with a different histological diagnosis after the first FNB did not benefit from a second EUS as recommended by the current *European Society of Gastrointestinal Endoscopy* (ESGE) guidelines<sup>73</sup> (n=9). Some patients concerned have benefited from other management (surveillance, other type of biopsy, treatment without histological evidence). The diagnostic performance rate (n=63/84, 75%) after a second EUS-FNB is consistent with data currently described in the literature, between 59 and 96%<sup>75-80</sup>.

But this result may be taken with care, because of the small number (n=9) of patients subjected to this second examination in our study.

Concerning strengths of our study, first, the prospective character of it, which is rare in diagnostic evaluation of molecular biology for diagnosis of pancreatic lesions. It also has advantage of comparing concomitantly NGS and ddPCR analysis for all samples. Moreover, our study includes all types of pancreatic lesions and is not limited to lesions suspected of being PA. Thus, all the conditions seem to be met to confirm mutational profile already described for each tumor thanks to the sensitivity offered by ddPCR but also to potentially discover new mutations specific to a tumor type or a level of dysplasia thanks to NGS.

Our study also relies on pre-analytical methods in line with what is currently recommended<sup>110,111</sup>. However, one of the main recurrent criticisms made to studies studying ctDNA is the lack of reproducibility of a study in pre-analytical methods<sup>109</sup>. This is one of the barriers to the more routine use of ctDNA.

We also note modification during the study of the timing to collect samples during EUS-FNB, allowing to obtain more DNA and thus to improve diagnostic Se of ddPCR and especially that of NGS. This strategy had been described in a study, whose conclusions were that it allowed to collect a greater quantity of DNA to be analyzed without impacting analysis performed in the pathological department<sup>161</sup>.

Finally our study is at the crossroads of two strategies to optimize the diagnosis of pancreatic lesions and in particular of PA.

On the one hand, studies that have shown the interest of molecular biology analysis of EUS-FNB. To overcome the diagnostic gap, research for *KRAS* gene mutation on EUS-FNB has been studied. Various studies have shown that it increases the diagnostic performance of the puncture when associated with the carcinoembryonic antigen (CEA) assay to detect mucinous lesions (Se of 75-80% and Sp of 88%)<sup>54,55</sup>. However, the presence of *KRAS* mutation does not distinguish a mucinous cystadenoma from an IPMN or a PA, nor does it predict the level of degeneration of the lesion. Furthermore, the search for a *KRAS* mutation alone, not combined with CEA measurement or cytology, does not have sufficient diagnostic performance to identify mucinous cystic neoplasms of the pancreas (MCN), PA's pre-cancerous lesions (Se of 47% and Sp of 97%)<sup>29,54</sup>. Another mutation that has attracted interest is the *GNAS* gene. It appeared that the mutation was highly specific for IMPN (close to 100%), more than *KRAS*, but at the expense of a much lower Se (20-60%)<sup>55,56</sup>. The addition of *GNAS* to the analysis of

cystic lesions of the pancreas does not improve the diagnostic performance of the diagnostic performance of EUS-FNB. Moreover, *GNAS* has not shown any value in distinguishing high-grade or low-grade lesions<sup>57,58</sup>. Research is now focusing on mutational analysis using NGS. Studies have already shown that it increases the diagnostic Se and Sp of EUS punctures to identify mucinous lesions with a Se 90% and a Sp 88%<sup>59</sup>. In addition, the simultaneous analysis of several genes also makes it possible to highlight genes known to be associated with more advanced stages of PA carcinogenesis (*TP53*, *SMAD4*)<sup>55</sup>.

On the other hand, current studies try to optimize the diagnostic performance of blood tests in the context of PA by relying on the combination of markers. For example, this study by *Cohen et al.*, published in 2017, which included only resectable PA, showed that addition of searching *KRAS* mutation on ctDNA associated with CA 19-9 increased the diagnostic sensitivity to 74% compared with a diagnostic sensitivity of 43% and 67% respectively when used individually<sup>162</sup>. These initial data were subsequently confirmed in 2018 by the same author on a larger cohort, still for patients with resectable cancers, but including different types of cancers<sup>139</sup>. Combination of classical biomarkers such as CA 19-9 for PA and *KRAS* mutation testing in ctDNA increased the diagnostic sensitivity to 64%. The diagnostic sensitivity of CA 19-9 for PA in this population is 30% in the literature<sup>31,32</sup>.

A diagnosis of certainty remains essential in oncology. However, it is unfortunately usual that some patients benefit from systemic treatment without histological evidence, based on a range of arguments. In our study, it concerns 7.1% (n=6/84) of patients. Absence of histological evidence is very often an exclusion criterion for access to prospective trials of new treatments, which to date is not negligible in the management of PA. Moreover, managing cancer without histology improve the risk of unsuitable treatment. For example, in our study one patient was suspected to have metastatic PA but first EUS-FNB classified his sample "atypical" (class III). We started systemic treatment for PA and during bypass for jaundice a biopsy of a hepatic metastasis was performed concluding to a well-differentiated neuroendocrine tumor of grade 3.

Main limitations of our study are lack of data available on the results of molecular biology analysis to draw any further conclusions on the diagnostic interest. Another limitation of the study is that a certain number of patients came to the University Hospital of Poitiers only for the realization of the EUS. This leads to more missing data concerning follow-up of the

patient but also the initial history of the patient. Finally, it is regrettable that among the patients included so far, there are few lesions with a final diagnosis of mucinous lesions (no mucinous cystadenoma, two IMPN), which represent one of the real challenges for improvement in the diagnosis of pancreatic lesions. Indeed, to date, the diagnostic sensitivity and specificity of echo-endoscopy associated with EUS-FNB analysis for MCN is respectively 42% and 99%<sup>29,54</sup>.

The next step for ADIPAN study will be to analyse samples collected by ddPCR and NGS in order to compare all of these samples and these two methods to improve EUS-FNB diagnosis accuracy for pancreatic lesion. Earlier diagnosis of PA is a real public health issue given the seriousness of this cancer and its increasing incidence.

## **Conclusion**

First analyses made in our study seem to show that our population is quite representative of the one described in the literature for pancreatic lesions. Moreover, we seem to benefit from solid endoscopic, anatomopathological and molecular biology analysis experiences, to highlight a possible diagnostic addition of molecular biology in the diagnosis of pancreatic lesions and eventually conclude, to its integration in the diagnostic management of pancreatic cancer.

# Annexes

## Table des figures

**Figure 1** : Incidence du cancer du pancréas dans le monde selon les données de GLOBOCAN 2020 (page 2)

**Figure 2** : Fréquence des mutations rencontrées dans l'adénocarcinome du pancréas, d'après Ryan *et al.* (page 7)

**Figure 3** : Mécanisme d'activation de la protéine KRAS et voies cellulaires dépendantes de KRAS (page 9)

**Figure 4** : Suivi des tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas selon les recommandations européennes, schéma de V. REBOURS (Hopital Beaujon, Clichy, France) (page 13)

**Figure 5** : Néoplasies intra-épithéliales pancréatiques et tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas, deux types de lésions pré-cancéreuses initiées par la mutation activatrice du gène *KRAS* (page 15)

**Figure 6** : Une lésion évocatrice d'un adénocarcinome du pancréas en écho-endoscopie digestive haute (page 20)

**Figure 7** : Une lésion évocatrice d'une tumeur neuro-endocrine du pancréas en écho-endoscopie digestive haute (page 21)

**Figure 8** : origine de l'ADN tumoral circulant selon Fernandes (page 33)

**Figure 9** : Principe de la PCR digitale selon C. AUDEBERT (page 35)

**Figure 10** : Potentiel d'utilisation de l'ADN tumoral circulant selon Castelli (page 36)

**Figure 11**: Blood samples collected during the study (page 54)

**Figure 12**: Description of the different samples derived from the fine needle biopsy and analyzed in pathological department (routine practice) and used for molecular analyses (ADIPAN study) (page 55)

**Figure 13**: Symptoms described by the patients (page 57)

**Figure 14**: Main average delays during care (page 59)

**Figure 15**: Management of the biopsies of pancreatic lesion (page 61)

**Figure 16**: Management of samples analyzed (page 65)

## Table des tableaux et tables

**Tableau 1** : Principaux syndromes génétiques prédisposant à un risque d'adénocarcinome du pancréas (page 5)

**Tableau 2** : Principales mutations du gène *KRAS* rencontrées dans l'adénocarcinome du pancréas (page 8)

**Tableau 3**: Analyse génomique des différents stroma de l'adénocarcinome du pancréas (page 10)

**Tableau 4** : Signes à haut risque et signes d'inquiétude des tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas selon les recommandations européennes (page 12)

**Tableau 5** : Comparaison des sensibilités et spécificités des différents biomarqueurs dans le diagnostic de l'adénocarcinome du pancréas (page 18)

**Tableau 6** : Définition des critères de résecabilité selon le stade d'envahissement vasculaire selon le MD Anderson Cancer Center (MDACC) ou le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (page 19)

**Tableau 7**: Performances diagnostiques de l'écho-endoscopie digestive haute pour le diagnostic des lésions mucineuses du pancréas (page 25)

**Tableau 8** : Intérêt d'un nouveau prélèvement par écho-endoscopie digestive haute (page 27)

**Tableau 9** : Classification des lésions pancréatiques selon la « *Papanicolaou Society of cytopathology* » (page 28)

**Tableau 10** : L'ADN tumoral circulant en oncologie actuellement (page 39)

**Tableau 11** : ADN tumoral circulant et performance diagnostique grâce à des techniques de *Polymérase Chain Reaction* (page 42)

**Tableau 12** : Rôle pronostique de la détection du gène *KRAS* sur ADN tumoral circulant en PCR digitale en gouttelettes (page 44)

**Tableau 13 :** Mutations objectivées dans l'ADN tumoral circulant potentiellement éligible à une thérapie ciblée selon la Food and Drug Administration dans l'étude de Patel *et al.* (page 47)

**Tableau 14:** Adénocarcinome pancréatique et thérapies ciblées (page 48)

**Table 15:** Patients and tumors characteristics (page 58)

**Table 16:** Patient who benefited of a second upper gastrointestinal echo-endoscopy (page 60)

**Table 17:** Comparison upper gastrointestinal echo-endoscopy and Cancer antigen 19-9 for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma (page 63)

**Table 18:** Discordance between morphological criteria suggesting a pancreatic adenocarcinoma and pathological analyses of first EUS-guided FNB (page 64)

**Table 19:** Results of first molecular analyses (page 66)

## Références bibliographiques

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Maisonneuve, P. *et al.* Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig. Dis. Basel Switz.* **28**, 645–656 (2010).
3. Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).
4. Ferlay, J. *et al.* More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **55**, 1158–1160 (2016).
5. Cowppli-Bony, A. *et al.* [Descriptive epidemiology of cancer in metropolitan France: Incidence, survival and prevalence]. *Bull. Cancer (Paris)* **106**, 617–634 (2019).
6. Keihanian, T. *et al.* Early Detection of Pancreatic Cancer: Risk Factors and the Current State of Screening Modalities. *Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 254–262 (2021).
7. McGuigan, A. *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J. Gastroenterol.* **24**, 4846–4861 (2018).
8. Neuzillet, C. *et al.* State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Pharmacol. Ther.* **155**, 80–104 (2015).
9. Huang, J. *et al.* Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **160**, 744–754 (2021).
10. Hank, T. *et al.* Diabetes mellitus is associated with unfavorable pathologic features, increased postoperative mortality, and worse long-term survival in resected pancreatic cancer. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **20**, 125–131 (2020).
11. Sharma, A. *et al.* Fasting Blood Glucose Levels Provide Estimate of Duration and Progression of Pancreatic Cancer Before Diagnosis. *Gastroenterology* **155**, 490–500 (2018).
12. Greenhalf, W. *et al.* International consensus guidelines on surveillance for pancreatic cancer in chronic pancreatitis. Recommendations from the working group for the international consensus guidelines for chronic pancreatitis in collaboration with the International Association of Pancreatology, the American Pancreatic Association, the Japan Pancreas Society, and European Pancreatic Club. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **20**, 910–918 (2020).
13. Ohmoto, A. *et al.* Genomic Features and Clinical Management of Patients with Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E561 (2019).
14. Muller, M. *et al.* Principaux syndromes de prédisposition héréditaires à l'adénocarcinome du pancréas : orientations diagnostiques et dépistage. *Hépatogastro Oncol. Dig.* **28**, 840–848 (2021).

15. Yeo, T. P. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin. Oncol.* **42**, 8–18 (2015).
16. Gourley, C. *et al.* Moving From Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition to Targeting DNA Repair and DNA Damage Response in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **37**, 2257–2269 (2019).
17. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 317–327 (2019).
18. Klein, A. P. *et al.* Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res.* **64**, 2634–2638 (2004).
19. Goggins, M. *et al.* Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut* **69**, 7–17 (2020).
20. Iacobuzio-Donahue, C. A. *et al.* Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 4257–4265 (2012).
21. Forment, J. V. *et al.* Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 663–670 (2012).
22. Ryan, D. P. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1039–1049 (2014).
23. Haigis, K. M. KRAS Alleles: The Devil Is In The Detail. *Trends Cancer* **3**, 686 (2017).
24. Buscail, L. *et al.* Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 153–168 (2020).
25. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: andrew\_aguirre@dfci.harvard.edu & Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185–203.e13 (2017).
26. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
27. Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **47**, 1168–1178 (2015).
28. Basturk, O. *et al.* A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 1730–1741 (2015).
29. European Study Group on Cystic Tumours of the Pancreas. European evidence-based guidelines on pancreatic cystic neoplasms. *Gut* **67**, 789–804 (2018).
30. Neuzillet, C. *et al.* Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **50**, 1257–1271 (2018).
31. Zhang, L. *et al.* Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **24**, 2047–2060 (2018).
32. Costello, E. *et al.* New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their

- application to treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 435–444 (2012).
33. Heger, U. *et al.* Induction chemotherapy in pancreatic cancer: CA 19-9 may predict resectability and survival. *HPB* **22**, 224–232 (2020).
  34. Isaji, S. *et al.* International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **18**, 2–11 (2018).
  35. Siravegna, G. *et al.* Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 531–548 (2017).
  36. Lewis, A. R. *et al.* Pancreatic cancer: Are 'liquid biopsies' ready for prime-time? *World J. Gastroenterol.* **22**, 7175–7185 (2016).
  37. Grunvald, M. W. *et al.* Current Status of Circulating Tumor DNA Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E7651 (2020).
  38. Samandari, M. *et al.* Liquid biopsies for management of pancreatic cancer. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **201**, 98–127 (2018).
  39. Zhu, Y. *et al.* Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **99**, e18581 (2020).
  40. Liu, R. *et al.* Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clin. Chem.* **58**, 610–618 (2012).
  41. Kaczor-Urbanowicz, K. E. *et al.* Reviews on Current Liquid Biopsy for Detection and Management of Pancreatic Cancers. *Pancreas* **49**, 1141–1152 (2020).
  42. Yu, Y. *et al.* Identification of Serum microRNA-25 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Medicine (Baltimore)* **99**, e23863 (2020).
  43. Prinz, C. *et al.* MicroRNAs as Indicators of Malignancy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) and Cystic Pancreatic Lesions. *Cells* **11**, 2374 (2022).
  44. Al-Hawary, M. M. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. *Radiology* **270**, 248–260 (2014).
  45. Raman, S. P. *et al.* Impact of the time interval between MDCT imaging and surgery on the accuracy of identifying metastatic disease in patients with pancreatic cancer. *AJR Am. J. Roentgenol.* **204**, W37-42 (2015).
  46. Ghaneh, P. *et al.* PET-PANC: multicentre prospective diagnostic accuracy and health economic analysis study of the impact of combined modality 18fluorine-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography with computed tomography scanning in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* **22**, 1–114 (2018).
  47. Puli, S. R. *et al.* How good is endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in diagnosing the correct etiology for a solid pancreatic mass?: A meta-analysis and systematic review. *Pancreas* **42**, 20–26 (2013).
  48. Hewitt, M. J. *et al.* EUS-guided FNA for diagnosis of solid pancreatic neoplasms: a meta-analysis. *Gastrointest. Endosc.* **75**, 319–331 (2012).
  49. Müller, M. F. *et al.* Pancreatic tumors: evaluation with endoscopic US, CT, and MR imaging. *Radiology* **190**, 745–751 (1994).

50. Nawaz, H. *et al.* Performance characteristics of endoscopic ultrasound in the staging of pancreatic cancer: a meta-analysis. *JOP J. Pancreas* **14**, 484–497 (2013).
51. Tempero, M. A. *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **19**, 439–457 (2021).
52. ASGE Standards of Practice Committee *et al.* The role of endoscopy in the evaluation and management of patients with solid pancreatic neoplasia. *Gastrointest. Endosc.* **83**, 17–28 (2016).
53. Okusaka, T. *et al.* Clinical Practice Guidelines for Pancreatic Cancer 2019 From the Japan Pancreas Society: A Synopsis. *Pancreas* **49**, 326–335 (2020).
54. Faias, S. *et al.* KRAS in Cyst Fluid Obtained by Endoscopic Ultrasound-Fine-Needle Aspiration in Pancreatic Cystic Lesions: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pancreas* **48**, 749–758 (2019).
55. de Biase, D. *et al.* The Role of Next-Generation Sequencing in the Cytologic Diagnosis of Pancreatic Lesions. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 458–464 (2018).
56. Kadayifci, A. *et al.* Value of adding GNAS testing to pancreatic cyst fluid KRAS and carcinoembryonic antigen analysis for the diagnosis of intraductal papillary mucinous neoplasms. *Dig. Endosc. Off. J. Jpn. Gastroenterol. Endosc. Soc.* **29**, 111–117 (2017).
57. Tan, M. C. *et al.* GNAS and KRAS Mutations Define Separate Progression Pathways in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm-Associated Carcinoma. *J. Am. Coll. Surg.* **220**, 845-854.e1 (2015).
58. Bournet, B. *et al.* Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration plus KRAS and GNAS mutation in malignant intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Endosc. Int. Open* **4**, E1228–E1235 (2016).
59. Rosenbaum, M. W. *et al.* Next-generation sequencing adds value to the preoperative diagnosis of pancreatic cysts. *Cancer Cytopathol.* **125**, 41–47 (2017).
60. Sugimoto, M. *et al.* Conventional versus contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration for diagnosis of solid pancreatic lesions: A prospective randomized trial. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **15**, 538–541 (2015).
61. Seicean, A. *et al.* Harmonic Contrast-Enhanced Endoscopic Ultrasonography for the Guidance of Fine-Needle Aspiration in Solid Pancreatic Masses. *Ultraschall Med. Stuttg. Ger. 1980* **38**, 174–182 (2017).
62. Iglesias-Garcia, J. *et al.* Quantitative endoscopic ultrasound elastography: an accurate method for the differentiation of solid pancreatic masses. *Gastroenterology* **139**, 1172–1180 (2010).
63. Hu, D.-M. *et al.* Endoscopic ultrasound elastography for differential diagnosis of pancreatic masses: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* **58**, 1125–1131 (2013).
64. Li, X. *et al.* Endoscopic ultrasound elastography for differentiating between pancreatic adenocarcinoma and inflammatory masses: a meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* **19**, 6284–6291 (2013).
65. Mei, M. *et al.* EUS elastography for diagnosis of solid pancreatic masses: a meta-

- analysis. *Gastrointest. Endosc.* **77**, 578–589 (2013).
66. Ying, L. *et al.* Clinical utility of endoscopic ultrasound elastography for identification of malignant pancreatic masses: a meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 1434–1443 (2013).
  67. Nakai, Y. *et al.* Diagnosis of pancreatic cysts: EUS-guided, through-the-needle confocal laser-induced endomicroscopy and cystoscopy trial: DETECT study. *Gastrointest. Endosc.* **81**, 1204–1214 (2015).
  68. Napoléon, B. *et al.* A novel approach to the diagnosis of pancreatic serous cystadenoma: needle-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* **47**, 26–32 (2015).
  69. Krishna, S. G. *et al.* Validation of diagnostic characteristics of needle based confocal laser endomicroscopy in differentiation of pancreatic cystic lesions. *Endosc. Int. Open* **4**, E1124–E1135 (2016).
  70. van Riet, P. A. *et al.* Comparison of fine-needle aspiration and fine-needle biopsy devices for endoscopic ultrasound-guided sampling of solid lesions: a systemic review and meta-analysis. *Endoscopy* **53**, 411–423 (2021).
  71. Cheng, B. *et al.* Analysis of Fine-Needle Biopsy vs Fine-Needle Aspiration in Diagnosis of Pancreatic and Abdominal Masses: A Prospective, Multicenter, Randomized Controlled Trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **16**, 1314–1321 (2018).
  72. Dumonceau, J.-M. *et al.* Indications, results, and clinical impact of endoscopic ultrasound (EUS)-guided sampling in gastroenterology: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline - Updated January 2017. *Endoscopy* **49**, 695–714 (2017).
  73. Pouw, R. E. *et al.* Endoscopic tissue sampling - Part 1: Upper gastrointestinal and hepatopancreatobiliary tracts. European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy* **53**, 1174–1188 (2021).
  74. Lisotti, A. *et al.* Repeat EUS-FNA of pancreatic masses after nondiagnostic or inconclusive results: systematic review and meta-analysis. *Gastrointest. Endosc.* **91**, 1234-1241.e4 (2020).
  75. DeWitt, J. *et al.* Utility of a repeated EUS at a tertiary-referral center. *Gastrointest. Endosc.* **67**, 610–619 (2008).
  76. Eloubeidi, M. A. *et al.* Value of repeat endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for suspected pancreatic cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 567–570 (2008).
  77. Nicaud, M. *et al.* The utility of repeat endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for suspected pancreatic cancer. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2010**, 268290 (2010).
  78. Suzuki, R. *et al.* Repeat endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for solid pancreatic lesions at a tertiary referral center will alter the initial inconclusive result. *J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD* **22**, 183–187 (2013).
  79. Téllez-Ávila, F. I. *et al.* Repeat endoscopic ultrasound fine needle aspiration after a first negative procedure is useful in pancreatic lesions. *Endosc. Ultrasound* **5**, 258–

- 262 (2016).
80. Mitchell, R. A. *et al.* Repeat Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration in Patients with Suspected Pancreatic Cancer: Diagnostic Yield and Associated Change in Access to Appropriate Care. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, 7678403 (2016).
  81. Khalid, A. *et al.* The role of pancreatic cyst fluid molecular analysis in predicting cyst pathology. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **3**, 967–973 (2005).
  82. Nikiforova, M. N. *et al.* Integration of KRAS testing in the diagnosis of pancreatic cystic lesions: a clinical experience of 618 pancreatic cysts. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **26**, 1478–1487 (2013).
  83. Singhi, A. D. *et al.* American Gastroenterological Association guidelines are inaccurate in detecting pancreatic cysts with advanced neoplasia: a clinicopathologic study of 225 patients with supporting molecular data. *Gastrointest. Endosc.* **83**, 1107-1117.e2 (2016).
  84. Wu, J. *et al.* Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 21188–21193 (2011).
  85. Springer, S. *et al.* A combination of molecular markers and clinical features improve the classification of pancreatic cysts. *Gastroenterology* **149**, 1501–1510 (2015).
  86. Bournet, B. *et al.* Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **54**, 75–83 (2016).
  87. Fuccio, L. *et al.* The role of K-ras gene mutation analysis in EUS-guided FNA cytology specimens for the differential diagnosis of pancreatic solid masses: a meta-analysis of prospective studies. *Gastrointest. Endosc.* **78**, 596–608 (2013).
  88. Takahashi, K. *et al.* Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest. Endosc.* **61**, 76–79 (2005).
  89. Khalid, A. *et al.* EUS-FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **11**, 482–486 (2011).
  90. Perez-Machado, M. A. Pancreatic cytology: standardised terminology and nomenclature. *Cytopathol. Off. J. Br. Soc. Clin. Cytol.* **27**, 157–160 (2016).
  91. Saieg, M. *et al.* Experience and future perspectives on the use of the Papanicolaou Society of Cytopathology Terminology System for reporting pancreaticobiliary cytology. *Diagn. Cytopathol.* **48**, 494–498 (2020).
  92. Jiao, Y. *et al.* Whole-exome sequencing of pancreatic neoplasms with acinar differentiation. *J. Pathol.* **232**, 428–435 (2014).
  93. Petrova, E. *et al.* Survival Outcome and Prognostic Factors for Pancreatic Acinar Cell Carcinoma: Retrospective Analysis from the German Cancer Registry Group. *Cancers* **13**, 6121 (2021).
  94. Dinarvand, P. *et al.* Solid Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas: A Rare Entity

- With Unique Features. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **141**, 990–995 (2017).
95. de Mestier, L. *et al.* Digestive Neuroendocrine Neoplasms (NEN): French Intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, GTE, RENATEN, TENPATH, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, SFR). *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **52**, 473–492 (2020).
  96. Falconi, M. *et al.* ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* **103**, 153–171 (2016).
  97. Leoncini, E. *et al.* Risk factors for neuroendocrine neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**, 68–81 (2016).
  98. Scoazec, J. Les tumeurs mixtes endocrines et exocrines du pancréas : questions biologiques et cliniques. *Hépatogastro Oncol. Dig.* **20**, 293–301 (2013).
  99. de Mestier, L. *et al.* Digestive System Mixed Neuroendocrine-Non-Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology* **105**, 412–425 (2017).
  100. Fernandes Marques, J. *et al.* Circulating Tumor DNA: A Step into the Future of Cancer Management. *Acta Cytol.* **63**, 456–465 (2019).
  101. Mandel, P. *et al.* Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **142**, 241–243 (1948).
  102. Leon, S. A. *et al.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**, 646–650 (1977).
  103. Sozzi, G. *et al.* Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3902–3908 (2003).
  104. Shao, X. *et al.* Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* **10**, 3478–3482 (2015).
  105. Hench, I. B. *et al.* Liquid Biopsy in Clinical Management of Breast, Lung, and Colorectal Cancer. *Front. Med.* **5**, 9 (2018).
  106. Castelli, J. *et al.* Circulating tumour DNA: Current detection methods, use in radiotherapy and future development. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **22**, 653–659 (2018).
  107. Bronkhorst, A. J. *et al.* Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **450**, 243–253 (2015).
  108. El Messaoudi, S. *et al.* Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **424**, 222–230 (2013).
  109. Merker, J. D. *et al.* Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **36**, 1631–1641 (2018).
  110. Meddeb, R. *et al.* Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin. Chem.* **65**, 623–633 (2019).
  111. Greytak, S. R. *et al.* Harmonizing Cell-Free DNA Collection and Processing Practices through Evidence-Based Guidance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **26**, 3104–3109 (2020).
  112. Swarup, V. *et al.* Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive

- tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* **581**, 795–799 (2007).
113. Li, M. M. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J. Mol. Diagn. JMD* **19**, 4–23 (2017).
  114. Pietrasz, D. *et al.* [What future for circulating tumor DNA? Current data and prospects in colorectal, non-small cell lung and pancreatic cancers]. *Bull. Cancer (Paris)* **103**, 55–65 (2016).
  115. Cheng, M. L. *et al.* Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 176–190 (2021).
  116. National Comprehensive Cancer Network [NCCN]. Non-Small Cell Lung Cancer. Version 4.2020. NCCN Clinical Practice Guidelines. *Oncology* (2020).
  117. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Invasive Breast Cancer. Version 4.2020. NCCN Clinical Practice Guidelines. *Oncology* (2020).
  118. Ajani, J. A. *et al.* Gastric Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **20**, 167–192 (2022).
  119. Wang, D.-S. *et al.* Liquid biopsies to track trastuzumab resistance in metastatic HER2-positive gastric cancer. *Gut* **68**, 1152–1161 (2019).
  120. Maron, S. B. *et al.* Circulating Tumor DNA Sequencing Analysis of Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 7098–7112 (2019).
  121. Willis, J. *et al.* Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 7035–7045 (2019).
  122. Goodall, J. *et al.* Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discov.* **7**, 1006–1017 (2017).
  123. Sonpavde, G. *et al.* Circulating tumor DNA alterations in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer* **125**, 1459–1469 (2019).
  124. Malla, M. *et al.* Using Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer: Current and Evolving Practices. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **40**, 2846–2857 (2022).
  125. Vidal, J. *et al.* Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 1325–1332 (2017).
  126. Schmiegel, W. *et al.* Blood-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in colorectal cancer patients: concordance of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *Mol. Oncol.* **11**, 208–219 (2017).
  127. Bachet, J. B. *et al.* RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, 1211–1219 (2018).
  128. Callesen, L. B. *et al.* Circulating tumour DNA and its clinical utility in predicting treatment response or survival in patients with metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer* **127**, 500–513 (2022).

129. Garlan, F. *et al.* Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 5416–5425 (2017).
130. Benhaim, L. *et al.* Circulating tumor DNA is a prognostic marker of tumor recurrence in stage II and III colorectal cancer: multicentric, prospective cohort study (ALGECOLS). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **159**, 24–33 (2021).
131. Tie, J. *et al.* Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci. Transl. Med.* **8**, 346ra92 (2016).
132. Tie, J. *et al.* Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol.* **5**, 1710–1717 (2019).
133. Reinert, T. *et al.* Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* **5**, 1124–1131 (2019).
134. Tie, J. *et al.* Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* **386**, 2261–2272 (2022).
135. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
136. Diaz, L. A. *et al.* Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 579–586 (2014).
137. Siegel, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 7–30 (2020).
138. Sausen, M. *et al.* Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat. Commun.* **6**, 7686 (2015).
139. Cohen, J. D. *et al.* Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* **359**, 926–930 (2018).
140. Milin-Lazovic, J. *et al.* Meta-Analysis of Circulating Cell-Free DNA's Role in the Prognosis of Pancreatic Cancer. *Cancers* **13**, 3378 (2021).
141. Kinugasa, H. *et al.* Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer* **121**, 2271–2280 (2015).
142. Takai, E. *et al.* Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **5**, 18425 (2015).
143. Hadano, N. *et al.* Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **115**, 59–65 (2016).
144. Cheng, H. *et al.* Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int. J. Cancer* **140**, 2344–2350 (2017).
145. Pietrasz, D. *et al.* Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 116–123 (2017).
146. Kim, M. K. *et al.* Prognostic Implications of Multiplex Detection of KRAS Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Chem.* **64**, 726–734 (2018).

147. Lin, M. *et al.* Circulating Tumor DNA as a Sensitive Marker in Patients Undergoing Irreversible Electroporation for Pancreatic Cancer. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **47**, 1556–1564 (2018).
148. Bernard, V. *et al.* Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **156**, 108-118.e4 (2019).
149. Pishvaian, M. J. *et al.* Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* **21**, 508–518 (2020).
150. Takai, E. *et al.* Clinical Utility of Circulating Tumor DNA for Molecular Assessment and Precision Medicine in Pancreatic Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **924**, 13–17 (2016).
151. Patel, H. *et al.* Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer. *J. Hematol. Oncol./J Hematol Oncol* **12**, 130 (2019).
152. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2018).
153. Kwak, E. L. *et al.* Molecular Heterogeneity and Receptor Coamplification Drive Resistance to Targeted Therapy in MET-Amplified Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov.* **5**, 1271–1281 (2015).
154. Pectasides, E. *et al.* Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* **8**, 37–48 (2018).
155. Ou, S.-H. I. *et al.* First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients With Advanced KRASG12C Solid Tumors (KRYSTAL-1). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* JCO2102752 (2022) doi:10.1200/JCO.21.02752.
156. Schram, A. M. *et al.* Efficacy and safety of zenocutuzumab in advanced pancreatic cancer and other solid tumors harboring NRG1 fusions. *ASCO 2021*.
157. Schizas, D. *et al.* Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update. *Cancer Treat. Rev.* **86**, 102016 (2020).
158. Mizrahi, J. D. *et al.* Pancreatic cancer. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 2008–2020 (2020).
159. Lemery, S. *et al.* First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1409–1412 (2017).
160. Marabelle, A. *et al.* Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **38**, 1–10 (2020).
161. Tian, S. K. *et al.* Optimizing Workflows and Processing of Cytologic Samples for Comprehensive Analysis by Next-Generation Sequencing: Memorial Sloan Kettering Cancer Center Experience. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **140**, 1200–1205 (2016).
162. Cohen, J. D. *et al.* Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 10202–10207 (2017).

# **Améliorer le diagnostic des lésions du pancréas grâce à l'analyse en biologie moléculaire des ponctions-biopsies pancréatiques et de l'ADN tumoral circulant. (ADIPAN)**

## Introduction:

While incidence of pancreatic adenocarcinoma (PA) is increasing, the only curative treatment remains surgery, for which only 20% of patients are eligible at diagnosis. In the absence of a validated biological marker for screening, and imperfect diagnostic methods currently available, we aimed to study interest of molecular biology on CytoLyt collected during upper gastrointestinal echo-endoscopy (EUS) and on circulating tumor DNA (ctDNA) in the diagnosis of pancreatic lesions.

## Method:

This ongoing prospective study began in March 2021, including patients referred to gastroenterology department of Poitiers University Hospital for EE as part of a diagnostic workup of a pancreatic lesion. For all patients, sample recovered thanks to fine needle biopsy (EUS-FNB) made during EUS benefit, in addition to the traditional anatomopathological analysis, from an analysis in molecular biology department using droplet digital PCR (ddPCR) and next-generation-sequencing (NGS) in order to highlight possible mutations within the lesion.

In addition, all patients benefit from ctDNA test in blood, both by ddPCR and NGS.

## Results:

First analysis shows that our population of 84 patients is on average 53 years old, with a sex ratio close to 1. Histological analysis of the first EUS-FNB concludes in more than half of PA (n=41/78; 52.4%) while the pathological diagnosis of PA was finally done for 50/84 patients (59.5%). After a single echo-endoscopy, for 15.4% of pancreatic lesion biopsy, it was “non-diagnostic” sample (n=12/78). The first molecular biology analyses have shown that ddPCR is the only method that has been able to detect ctDNA for the moment. The study is based on pre-analytical methods of ctDNA in accordance with current recommendations. Finally, our protocol ensured the necessary amount of DNA to provide sufficient sensitivity for NGS detection on EUS-FNB, without interfering with histological analysis.

## Conclusion:

Our study is therefore based on a representative population of pancreatic lesions and expertise in terms of endoscopy, anatomopathological analysis and molecular biology, to highlight the possible interest in the diagnosis of PA.

**Key-words:** Pancreatic adenocarcinoma, diagnostic, molecular biology, droplet digital PCR, next-generation-sequencing, circulating tumor DNA

# Serment d'Hippocrate



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !



# **Améliorer le diagnostic des lésions du pancréas grâce à l'analyse en biologie moléculaire des ponctions-biopsies pancréatiques et de l'ADN tumoral circulant. (ADIPAN)**

## Introduction:

While incidence of pancreatic adenocarcinoma (PA) is increasing, the only curative treatment remains surgery, for which only 20% of patients are eligible at diagnosis. In the absence of a validated biological marker for screening, and imperfect diagnostic methods currently available, we aimed to study interest of molecular biology on CytoLyt collected during upper gastrointestinal echo-endoscopy (EUS) and on circulating tumor DNA (ctDNA) in the diagnosis of pancreatic lesions.

## Method:

This ongoing prospective study began in March 2021, including patients referred to gastroenterology department of Poitiers University Hospital for EE as part of a diagnostic workup of a pancreatic lesion. For all patients, sample recovered thanks to fine needle biopsy (EUS-FNB) made during EUS benefit, in addition to the traditional anatomopathological analysis, from an analysis in molecular biology department using droplet digital PCR (ddPCR) and next-generation-sequencing (NGS) in order to highlight possible mutations within the lesion.

In addition, all patients benefit from ctDNA test in blood, both by ddPCR and NGS.

## Results:

First analysis shows that our population of 84 patients is on average 53 years old, with a sex ratio close to 1. Histological analysis of the first EUS-FNB concludes in more than half of PA (n=41/78; 52.4%) while the pathological diagnosis of PA was finally done for 50/84 patients (59.5%). After a single echo-endoscopy, for 15.4% of pancreatic lesion biopsy, it was “non-diagnostic” sample (n=12/78). The first molecular biology analyses have shown that ddPCR is the only method that has been able to detect ctDNA for the moment. The study is based on pre-analytical methods of ctDNA in accordance with current recommendations. Finally, our protocol ensured the necessary amount of DNA to provide sufficient sensitivity for NGS detection on EUS-FNB, without interfering with histological analysis.

## Conclusion:

Our study is therefore based on a representative population of pancreatic lesions and expertise in terms of endoscopy, anatomopathological analysis and molecular biology, to highlight the possible interest in the diagnosis of PA.

Key-words: Pancreatic adenocarcinoma, diagnostic, molecular biology, droplet digital PCR, next-generation-sequencing, circulating tumor DNA