

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2017

THESE

Thèse n°

POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(Décret du 16 janvier 2004)

Présentée et soutenue publiquement
le 28 septembre 2017 à Poitiers
par **Mlle Camille EVRARD**
Née le 07/10/1987

Impact pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie de
l'ADN circulant dans les adénocarcinomes pancréatiques non
résécables.

Composition du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Marc TOURANI

Membres :

Madame le Docteur Aurélie FERRU

Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON

Monsieur le Professeur Pierre LEVILLAIN

Monsieur le Professeur David TOUGERON

Directeurs de thèse : Monsieur le Professeur David TOUGERON

Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2017

THESE

Thèse n°

POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(Décret du 16 janvier 2004)

Présentée et soutenue publiquement
le 28 septembre 2017 à Poitiers
par **Mlle Camille EVRARD**
Née le 07/10/1987

Impact pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie de
l'ADN circulant dans les adénocarcinomes pancréatiques non
résécables.

Composition du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Marc TOURANI

Membres :

Madame le Docteur Aurélie FERRU

Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON

Monsieur le Professeur Pierre LEVILLAIN

Monsieur le Professeur David TOUGERON

Directeurs de thèse : Monsieur le Professeur David TOUGERON

Madame le Professeur Lucie KARAYAN-TAPON



UNIVERSITE DE POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie



Le Doyen,

Année universitaire 2016 - 2017

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

□ AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (**surnombre jusqu'en 08/2018**)

- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (**surnombre jusqu'en 08/2019**)
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)

□ KITZIS Alain, biologie cellulaire (**surnombre jusqu'en 08/2018**)

- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (**surnombre jusqu'en 08/2018**)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIoT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, oncologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FEIGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- FRASCA Denis, anesthésiologie – réanimation
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Maître de conférences des universités de médecine générale

- BOUSSAGEON Rémy

Professeur associé des disciplines médicales

- ROULLET Bernard, radiothérapie

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- DHAR Pujasree, maître de langue étrangère
- ELLIOTT Margaret, contractuelle enseignante

Professeurs émérites

- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2017)
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)
- POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)

- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- 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
- 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, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (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)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements au président du jury

Au Professeur Tourani,

Merci d'avoir accepté de présider au sein du jury de ma thèse.

Les cinq années passées dans votre service m'ont permis de m'épanouir dans mon futur métier. Votre disponibilité pour les internes en temps que « patron » est à souligner ainsi que votre facilité d'accès. Merci pour tout cela, je suis enchantée de poursuivre mon évolution dans votre service !

Remerciements aux directeurs de thèse

Au Professeur David Tougeron,

Un grand merci pour ce travail de thèse que vous m'avez permis de faire, avec un sujet très intéressant et un soutien sans faille de votre part.

Avec vous je peux découvrir d'autres aspects de la médecine : la recherche, les projets scientifiques et les essais thérapeutiques ainsi que la rigueur nécessaire à tout cela.

Vous avez grandement participé à mon envie de poursuivre ce projet au-delà de la thèse et m'investir pour la suite dans la recherche clinique.

Au Professeur Lucie Karayan-Tapon,

Quel plaisir de découvrir un tout autre monde, pas si éloigné, mais très différent de la médecine clinique !

Pour cela je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire pour me former et me donner la possibilité d'être autonome pour mes manipulations.

Nos discussions sont toujours très enrichissantes pour moi qui n'avait jamais pensé apprécier la recherche et le laboratoire. Pour tout cela merci.

Remerciements aux membres du jury

Au Professeur Levillain,

Merci d'avoir accepté d'être dans les membres de mon jury. Même si nous n'avons pas été amenés à travailler ensemble, je suis flattée que vous aillez accepté de juger ce travail avec votre œil aguerri sur les tumeurs pancréatiques.

Au Docteur Aurélie Ferru,

Avant même que j'arrive à Poitiers j'avais entendu parler de vous et je n'ai pas été déçue. Bien au contraire ! « Quand je serais grande je veux être Aurélie Ferru », voilà qui résume bien tout ce que j'ai à dire.

Alors merci, merci pour ce travail car vous avez pu me diriger vers David Tougeron, ça aurait été dommage de rater une collaboration si enrichissante pour moi. Merci pour mon mémoire de DES, le sujet des tumeurs neuro endocrines me tenait à cœur, aussi pour avoir l'occasion de travailler avec vous. Et merci pour tous les jours, toujours disponible, présente pour nous remonter le moral quand ça va moins bien, j'apprends tous les jours à vos côtés et j'espère bien que ça continu !

Remerciements à ma famille

Un immense merci à mes parents, ma mamounette et mon papou ! Merci de m'avoir laissé partir pour suivre mes convictions, l'oncologie ou rien ! Merci pour ces longues heures au téléphone où je vous raconte mes journées palpitantes et je vous saoule avec tous les détails. Merci d'être là tous les jours, quand je m'éclate dans mon boulot mais aussi quand je râle ou quand je doute. Je vous aime fort !

Merci à ma sœur Cécile et toute la p'tite famille Guillou, tu m'as montré le chemin des études et du travail. Même si nous sommes très différentes, je sais que je peux compter sur toi ! Merci à toi et à Matthieu de m'avoir donné mes deux magnifiques petites nièces Zélie et Izia.

David, merci du fond du cœur pour toutes ces années passées ensemble, tu m'as aidé à grandir et à m'épanouir. Tu m'as donné le courage de partir de Reims pour suivre la route que je voulais, merci de m'avoir suivi dans toutes ces épreuves. Merci pour toutes les bonnes choses que tu as apporté dans ma vie et les nombreux bons moments qu'on a vécu tous les deux.

Remerciements aux chefs du PRC

Merci à Armelle, mon ancienne co-interne, puis ma chef et bientôt co-CCA ! On se suit au fil des années et c'est toujours un plaisir de papoter avec toi des dossiers, des potins du PRC et bien d'autres choses... Je suis ravie de t'avoir en modèle pour me conseiller et me rassurer pour la suite des événements. J'espère qu'on pourra poursuivre notre collaboration et notre amitié encore pendant plusieurs années !

Merci à Paul-Arthur pour les 7 patients inclus dans ce travail (c'est toi le 1^{er} dans le top des inclusions), il faut dire que tu n'avais pas trop le choix, tu étais sous surveillance ! Merci aussi pour tes blagues de 20h15 en RCP digestive... on trouverait le temps long si tu n'y étais pas.

Merci à Anaïs qui est la dernière arrivée dans l'équipe de gastro mais qui a vite rattraper son retard en incluant 6 patients. J'apprécie ton dynamisme et ta disponibilité pour moi, on se soutient entre (futurs pour moi) jeunes docteurs.

Merci aux trois drôles de dames de mon quatrième semestre en hospitalisation complète ! Virginie (la petite rebelle), Emmanuelle (la grande blonde) et Laurence (tata Lolo). Pour un premier semestre en oncologie au CHU, quel accueil et quel semestre. Si c'est l'oncologie alors je reste ! J'ai appris énormément de choses avec vous trois, dans une très bonne ambiance, l'amitié entre vous se ressent lorsqu'on est interne et ça fait du bien.

Merci à Nadia, Stéphanie, Floriane et Patrick pour votre aide déjà ces cinq années passées et merci d'avance pour votre patience à venir avec moi lors de mes débuts en consultations de séno-gynéco (et ORL pour Floriane !). J'espère être à la hauteur de vos attentes pour vous seconder au mieux.

Nadia j'apprécie votre calme et votre flegmatisme. J'apprends beaucoup grâce à votre expérience. Mais j'apprécie aussi de pouvoir papoter avec vous d'autre chose que l'oncologie autour d'un café.

Stéphanie, toujours en forme, très pédagogue et posée mais aussi sacrément déjantée (pardon, mais c'est le mot que je cherchais) par moment !

Floriane, quel dommage mon binôme part avant que j'arrive ! Je vais tacher de bien m'occuper de tes patient(e)s, je te souhaite plein de bonheur pour toi et ta famille dans ta vie future loin de nous.

Patrick, la force tranquille ! Un sacré appui pour les internes et jeune CCA, on peut toujours compter sur toi... et tes entrées pas en forme du vendredi 18h en HDS !

Karine, j'étais sûre que j'allais apprécier de travailler à vos côtés en HDJ, mais pas autant que cela ! Votre dynamisme est bien connu au PRC mais j'ai découvert quelqu'un de très accessible et simple malgré les apparences, pleine d'auto-dérision et d'humour. J'ai appris à être systématique comme vous (j'y travaille encore) et efficace, et comme on dit « il n'y a jamais d'urgence pour faire une chimiothérapie ! »

Merci à Hélène et Grégory avec qui je n'ai pas encore eu l'occasion de beaucoup travailler mais ça va venir et je ne suis pas trop inquiète.

Merci à Corinne pour son caractère bien forgé et ses décisions efficaces. Merci pour les matins café avant de débiter la journée, pour s'évader un peu de la cancérologie, rien de tel que de papoter avec vous d'anglais médiéval, de dessins ou de confitures !

Remerciements à tous les membres du laboratoire de cancérologie

Merci à Gaelle pour son immense patience face à mes multiples questions au laboratoire, « c'est quoi ? ça sert à quoi ? pourquoi on fait comme ça ? comment ça marche... ? ». Merci de prendre le temps de m'expliquer et de me montrer comment réfléchir version laboratoire. Claire merci aussi pour ton aide dans les calculs de nombre de copies, dilution etc... loin de mon domaine.

Tristan, j'ai eu beaucoup de chance de mener mon projet avec toi, tu es une véritable aide pour moi, car le monde du laboratoire m'était tout à fait étranger alors merci de m'avoir aidé à prendre mes marques avec beaucoup de patience !

Merci à tous les techniciens de m'avoir supporté pendant 6 mois et encore de temps en temps, avec toute mon énergie à revendre et mes histoires sombres d'oncologie... Merci particulier à Nicolas pour avoir régulièrement réparer mes bêtises... chut ! Mais bon mon passage vous a permis de renouveler une bonne partie de votre matériel de labo !

Remerciements aux radiothérapeutes : séniors et juniors

Merci à Antoine Berger et Stéphane Guerif, même si le semestre a été un peu difficile pour moi, j'ai appris les bases de la radiothérapie à vos côtés et nous allons poursuivre notre collaboration les années à venir.

Merci à Florence qui m'a déjà aidé lors de mon semestre en radiothérapie et sur qui je sais que je vais pouvoir compter les années à venir pour me conseiller en ORL. Merci à Johann qui fait un très bon référent de radiothérapie et qui prend très à cœur son rôle de « vieil interne » de radiothérapie.

Remerciements aux hématologues

Merci à l'équipe d'hématologie qui m'a accueilli deux semestres lors de mon internat. Merci à Edouard pour son humour malgache et sa zenitude même en situation de crise. Merci à Natasha et Maud, coté allogreffe. Brigitte merci de m'avoir apporté un peu de votre savoir lors de mon semestre en HDJ, merci aussi à Cécile de m'avoir transmis sa rigueur et ses connaissances.

Mon semestre en HDJ m'a permis d'apprendre l'espagnol... ou presque, aux côtés de Pilar et José, rayons de soleil tout juste arrivés en hématologie.

Et enfin merci à Vincent, pilier indéboulonnable de l'HDS d'hématologie, quel plaisir de travailler avec vous et encore maintenant, toujours un petit mot gentil ou taquin !

Remerciements aux équipes de mes stages périphériques

Merci aux autres chefs de stages plus anciens, qui m'ont dès le début donné envie de faire de l'oncologie.... Je pense au Professeur Bouché à Reims, les débuts de cancérologie pour moi et mon choix de cette spécialité après l'ECN.

Mon deuxième semestre à Thouars... je suis partie avec des a priori à Thouars, mais ils se sont très vite envolés, une vraie petite famille, voilà comment je peux résumer cette équipe. Merci à Éric, Vincent et Larvi de m'avoir fait valider mes premières chimiothérapies !

Et puis merci aussi à toute l'équipe de Saintes où j'ai eu quelques moments difficiles mais j'étais très bien entourée alors le semestre a été très vite passé, merci à Florence, Ana-Laura, Isabelle et Laurent, sans oublier les meilleures secrétaires pour un bébé doc' : Sylvie et Virginie.

Remerciements à mes co-internes du PRC

Un grand merci à mes co internes d'HDS, Elise et Riyadh, me supporter dans les mois avant ma thèse ! Quel défi ! Elise (Madame Elise !) merci pour ton soutien dans mes débuts de « chef », c'est très confortable de débiter avec toi à mes côtés ! Riyadh, j'ai appris à te connaître lors de ce semestre un peu spécial pour moi, t'as bonne humeur est contagieuse mais tout cela dans une ambiance sérieuse lorsqu'il le faut ! Merci à vous deux et plein de bonheur pour la suite.

Merci à mes co internes vieux comme moi ! Voilà cette année c'est la fin de notre internat, alors merci à Etienne et je te souhaite plein de bonheur à Saintes. Merci à Fardeen, on devrait se retrouver comme jeunes chefs dans quelques mois, ça sera un plaisir de travailler avec toi ! Soyez heureux dans votre vie de jeunes mariés avec Coraline.

Merci à Cynthia, Lena et Thomas, bonne continuation pour la suite et plein de bonnes choses méritées, après ces cinq années passées.

Merci aux plus jeunes que je suis ravie de pouvoir continuer à suivre pour le restant de leur cursus : Matthieu (notre super référent), Anthony, Marjorie et Clotilde. Mais aussi ma petite Thérèse que j'adore et qui reste en oncologie avec nous ! Sans oublier Benoit et Margaux, une de mes jolies rencontres au boulot ! J'espère pouvoir vous aider un peu à progresser et à vous épanouir pendant la fin de votre internat !

Justine, Marine et Mélanie, les trois dernières arrivées, je suis sûre que l'on va pouvoir apprendre à mieux se connaître et bien travailler ensemble pendant mon clinicat.

Remerciements à mes autres co-internes

Mention très spéciale pour mes deux anges gardiens anapath et radiologue (qui l'eut cru !) Marie et Nicolas (et toute leur jolie troupe : Lucas, Samuel et Anna). Quelle rencontre ! En si peu de temps nous avons tissé de sacrés liens, Marie nous avons des caractères finalement très proches et Nicolas ton humour est assez similaire au mien (je ne sais pas si c'est un compliment !). J'aime la façon dont vous menez votre vie avec tous vos enfants et les difficultés que vous surmontez ! Merci pour ces moments à refaire ... le CHU (et non pas le monde) et ces RCP apéro très tardives chez vous ! Pourvu que notre collaboration perdure !

Merci à Faustine, ma co interne de premier semestre, heureusement qu'on était deux dans le même bateau ! On a transformé ce qui aurait pu être un calvaire en un super semestre ! Merci pour ça, et plein de bonheur à venir pour toi, ton chéri et ton heureux évènement !

Remerciements à l'équipe paramédicale

Les infirmières et infirmiers du PRC (je vais forcément en oublier... j'aurais dû prendre le « planning ide » !). D'abord merci pour mes « grands tubes violets », je vous ai beaucoup sollicité avec tout ça. Et merci pour le quotidien : le boulot dans la bonne humeur, les potins, les coups de gueule et les plaisanteries. Vous abattez un boulot énorme tous les jours qu'on ne sait pas faire sans vous nous les docteurs ! Je me lance à citer quelques prénoms :

Au 1^{er} étage : Adeline, Cécile (il y en a 2+1 si on compte les cadres de santé), Virginie, Karine, Véronique (2), Emilie, Séverine, Marion, Martine, Nathalie (3), Claire (2), Laure, Betty, sans oublier Jérôme.

Au 2^{ème} et 3^{ème} étages : Pauline, Marion, Alicia, Maud, Valérie, Sabrina, Aurélie, Virginie, Marine, Marine, France, Julie, Pascale, Louisa (Leïla pour les intimes), Sylvie, Adeline, Céline (2). Et impossible d'oublier notre Fabien !

Les aides-soignantes et aides-soignants, j'aime beaucoup vous voir au quotidien avec nos patients, vous prenez grand soin d'eux et en ce sens on travaille vraiment en équipe ! Vous êtes indispensables à mes yeux dans un service comme la cancérologie ! Alors merci à (désolée j'en oublie c'est certain) : Pascale, Sebastien, Cathy, Elodie, Manuella

Les secrétaires du « grand secrétariat », merci pour votre disponibilité, même si c'est juste en passant. Remerciement particulier à Brigitte pour son aide dans la gestion des dossiers. Merci aussi à Sophie, Séverine et Julie. Et merci à Marie-Lise pour la confection des nombreuses étiquettes pour mon travail.

Remerciements à mes copines de Saint Dizier

Mes amies d'avant la médecine qui sont restées : Astrid merci de me raconter les potins de nos anciens copains d'école, j'ai un peu décroché le fil des événements j'avoue ! J'aime me rappeler nos années collège et lycée avec toi ! Et Faustine, quel plaisir de te voir avec ta maman, ton mari et tes enfants, tout le chemin parcouru depuis la maternelle !

Abréviations

ACB : *animal cell binding*

ACL : *animal cell lysis*

ACW : *animal cell wash*

ADNcf: ADN *cell free* ou ADN total

ADNct : AND circulant tumoral

AMS : artère mésentérique supérieure

BEAMing: *Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics*

BSC: *best supportive care*

CAM: cystadénocarcinome mucineux

CDKN2A: *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

CPP : canal pancréatique principal

CPS : canaux pancréatiques secondaires

DFS : *desease free survival*

FA : fréquence allélique

FDA : *food and drug administration*

FAMMM : *Familial Atypical Multiples Mole Melanoma*

FFPE : *fixed and paraffin embedded*

GGT : gamma glutamyl transferase

GNAS : *guanine nucleotid binding protein*

HNPCC : *hereditary non polyposis colorectal cancer*

HTP : hypertension portale

IGF-1 : *insulin-like growth factor 1*

IMC : indice de masse corporelle

INVS : institut de veille sanitaire

KRAS : *Kirsten rat sarcoma*

LA : localement avancé

LMC : leucémie myéloïde chronique

LDH : lactate déshydrogénase

MMP 7 : matrix métalloprotéinase 7

MS : mésentérique supérieure

NEM : néoplasie endocrinienne multiple

NGS : *next generation sequencing*

OS : *overall survival*

PAL : phosphatase alcaline

PCAI : pancréatite chronique auto-immune

PCR : *polymerase chain reaction*

PD: *progression disease*

PFS : *progression free survival*

RNF43 : *RING-type zing finger protein 43*

RP : réponse partielle

RR : risque relatif

SG : survie globale

SNC : système nerveux central

SPARC: *secreted protein acidic and rich in cysteine*

SSP : survie sans progression

SSR : survie sans récurrence

TC : tronc cœliaque

TP : tronc porte

VB(P) : voie biliaire (principale)

VMS : veine mésentérique supérieure

VP : veine porte

Protocoles de chimiothérapie cités :

FF : J1 = J43

Acide folinique 200 mg/m² et 5-fluorouracil 2000 mg/ m² sur 24 h à J1, 8, 15 et 22.

FOLFIRI 3 : J1=J15

Irinotécan 90 mg/m² sur 60 min au J1, Acide folinique 400 mg/ m² as sur 2h au J1,

5-fluorouracil 2000 mg/ m² en perfusion continue de 46h et Irinotécan 90 mg/ m² au J3

FOLFIRINOX : J1=J15

Oxaliplatine 85 mg/m² au J1, Irinotécan 180 mg/m² au J1, Acide folinique 400 mg/ m² au j1

5-fluorouracil bolus 400 mg/ m² suivie de 5-fluorouracil 2400 g/m² en perfusion continue sur 46h

FOLFOX 4 : J1=J15

Oxaliplatine 85 mg/m² sur 2 h au J1, Acide folinique 400 mg/m² au J1

5-fluorouracil bolus 400 mg/ m² suivie de 5-fluorouracil 2400 g/m² en perfusion continue sur 46h

GEMZAR : J1=J28 (schéma de Burris)

Gemcitabine 1000 mg/m² sur 30 min à J1 toutes les semaines, 7 semaines/8 puis 3 semaines/4

GEMZAR-ABRAXANE : J1=J28

Gemcitabine 1000 mg/m² sur 30 min et Nab-Paclitaxel 125 mg/m² à J1-J8-J15

GEMZAR-CAPECITABINE : J1=J28

Gemcitabine 1000 mg/m² sur 30 min à J1-J8-J15

Capecitabine 830 mg/m² x 2 /j, en continu pendant 21 jours, puis 7 jours de repos

GEMZAR-CISPLATINE : J1= J15

Acide folinique 200 mg/ m² au j1, 5-fluorouracil bolus 400 mg/ m²

5-fluorouracil 2400 g/m² en perfusion continue sur 46h et Cisplatine 50 mg/m² sur 2h

OFF: J1= J43

Acide folinique 200 mg/ m² au j1,

5-fluorouracil 2000 g/m² en perfusion continue sur 24h au J1-J8-J15 et J22

Oxaliplatine 85 mg/m² sur 2 h au J8 et J22

Tables des matières

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

p.1

1) Pancréas normal	p.1
a. Embryologie et anatomie	p.1
b. Histologie	p.3
c. Physiologie pancréatique	p.3
i. Pancréas exocrine.....	p.3
ii. Pancréas endocrine	p.4
2) Epidémiologie des cancers du pancréas.....	p.6
a. Dans le monde.....	p.6
b. En France	p.7
3) Facteurs de risques et cancerogénèse.....	p.8
a. Facteurs de risque endogènes.....	p.8
i. Cancers du pancréas héréditaires.....	p.8
ii. Lésions précancéreuses.....	p.9
iii. Pathologies prédisposant au cancer pancréatique.....	p.11
b. Facteurs de risque exogènes.....	p.13
c. Biologie des lésions précancéreuses et des tumeurs pancréatiques.....	p.14
i. Les PanIN.....	p.14
ii. Les TIPMP.....	p.15
iii. Les cystadénomes mucineux.....	p.16
iv. Les adénocarcinomes pancréatiques.....	p.16
4) Diagnostic du cancer du pancréas.....	p.20
a. Tableau clinique.....	p.20
b. Biologie.....	p.21
c. Imagerie.....	p.22
d. Analyse anatomopathologique.....	p.24
5) Les différents types de cancers du pancréas.....	p.25
a. Tumeurs exocrines.....	p.25
i. Adénocarcinomes.....	p.25
ii. Cystadénocarcinomes.....	p.27
b. Tumeurs neuroendocrines pancréatiques (TNEP).....	p.27
i. Insulinome.....	p.27
ii. Gastrinome et syndrome de Zollinger-Ellison (SZE).....	p.28
iii. VIPome.....	p.28

iv. Glucagonome.....	p.28
v. Somatostatinome.....	p.28
6) Prise en charge chirurgicale du cancer du pancréas.....	p.28
a. Définition de la résécabilité.....	p.28
b. Chirurgie curative.....	p.29
i. Duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC).....	p.29
ii. Spléno-pancréatectomie gauche (SPG).....	p.32
c. Chirurgie palliative.....	p.32
7) Chimiothérapie et radiothérapie du cancer pancréatique.....	p.34
a. Chimiothérapie néo-adjuvante et cancers borderlines	p.34
b. Chimiothérapie adjuvante.....	p.35
c. Chimiothérapie palliative des cancers pancréatiques LA non résécables.....	p.36
d. Chimiothérapie palliative des cancers pancréatiques en 1 ^{ère} ligne métastatique....	p.37
e. 2eme ligne de chimiothérapie et plus.....	p.39
f. Stratégie thérapeutique actuelle.....	p.39
g. Facteurs pronostiques et prédictifs.....	p.40
8) ADN tumoral circulant et mutation <i>KRAS</i>	p.42
a. Du gène <i>Ras</i> à la protéine <i>KRAS</i>	p.42
i. Découverte et description du gène <i>Ras</i> et de ces mutations.....	p.42
ii. Protéine <i>KRAS</i> et transduction du signal.....	p.43
b. Concept de « biopsie liquide » et ADN tumoral circulant.....	p.47
i. ADN circulant et avancées techniques.....	p.47
ii. Utilisation de l'ADN circulant en cancérologie.....	p.51
c. ADN circulant dans le cancer du pancréas.....	p.53
i. Mutation <i>KRAS</i> et cancer du pancréas.....	p.53
ii. Place de l'ADNct muté <i>KRAS</i> pour le diagnostic de cancer du pancréas.....	p.55
iii. Place de l'ADNct muté <i>KRAS</i> en situation adjuvante.....	p.56
iv. Place de l'ADNct muté <i>KRAS</i> en situation non résécable.....	p.59

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE

p.66

1. Inclusion des patients.....	p.66
2. Recueil de données.....	p.67
3. Prélèvements sanguins et suivi.....	p.68
4. Extraction et dosage de l'ADN circulant.....	p.69

5. PCR digitale.....	p.70
a. Réalisation de la manipulation.....	p.70
b. Validation biologique de la ddPCR.....	p.72
6. Analyse statistique.....	p.76
a. Méthodes statistiques employées.....	p.76

TROISIEME PARTIE : RESULTATS **p.78**

1. Caractéristiques des patients et des traitements.....	p.78
2. Taux d'ADN circulant au diagnostic.....	p.80
3. Corrélations entre les caractéristiques tumorales et les taux d'ADN circulant.....	p.81
4. Impact prédictif de réponse à la chimiothérapie des taux initiaux d'ADN circulant...	p.82
5. Impact pronostic des taux bruts d'ADN circulant et de leurs variations.....	p.84
6. Impact prédictif de réponse à la chimiothérapie des variations des taux d'ADN circulant total.....	p.85
7. Impact prédictif de réponse à la chimiothérapie des variations des taux d'ADN circulant tumoral muté <i>KRAS</i>	p.86

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION **p.89**

CONCLUSION **p.95**

REFENRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **p.96**

ANNEXES **p.106**

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

1) Le pancréas normal

a. Embryologie et anatomie

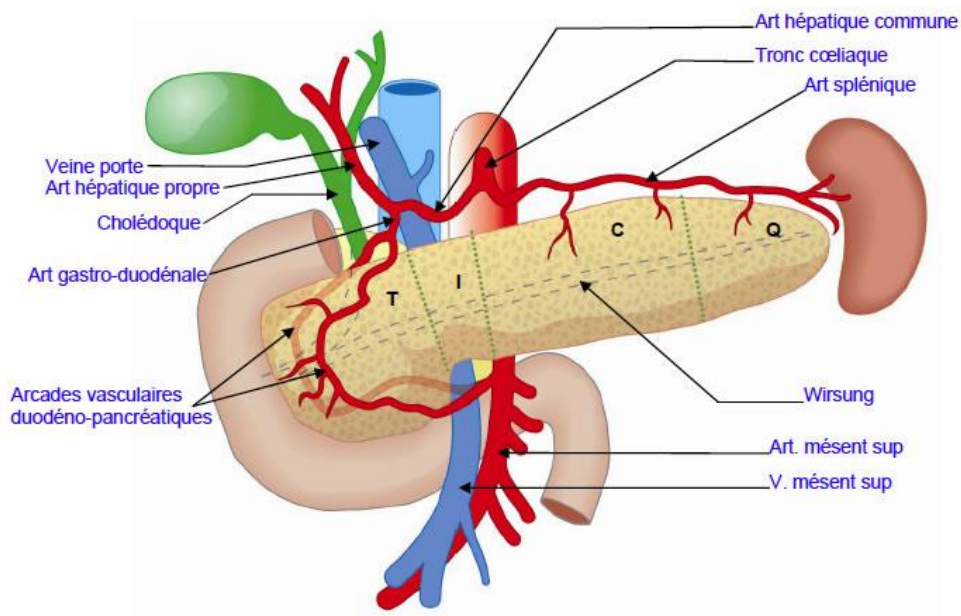
Le pancréas dérive de deux ébauches embryonnaires^{1,2} : le pancréas dorsal et le pancréas ventral, apparaissant respectivement aux J26 et J29 de vie. Le premier donne naissance à une partie de la tête, l'isthme, le corps et la queue du pancréas tandis que l'autre donne la deuxième partie de la tête du pancréas, le crochet, une partie du canal de Wirsung et les VB extra-hépatiques. Ces deux ébauches migrent l'une vers l'autre puis fusionnent dans la 6^{ème} semaine de maturation.

Le pancréas mature est un organe profond rétropéritonéal, en regard des vertèbres L1 et L2. Il mesure 15 x 6 x 2 cm et pèse 80 grammes. Il est sous-divisé en quatre parties (Figure 1) : la tête du pancréas, sertie par le cadre duodénal, elle présente des rapports très étroits avec les vaisseaux MS, le TP et la VBP, on observe à sa partie inférieure le « crochet » ou « processus unciné » ou « petit pancréas de Winslow ». L'isthme ou « col » pancréatique, est la zone du pancréas rétrécie en haut par l'échancrure duodénale et les vaisseaux MS. Le corps du pancréas situé dans le prolongement de l'isthme, présente des rapports intimes avec les vaisseaux spléniques, le TC et le mésocolon. Enfin la queue du pancréas correspond à son extrémité gauche.

La sécrétion pancréatique exocrine est assurée par deux canaux : le canal principal et le canal secondaire. Le canal de Wirsung est le canal principal, il se développe en s'élargissant, de la queue du pancréas vers le duodénum avec un coude sinueux au niveau de l'isthme. Dans sa portion terminale, il reçoit en arrière la VB puis se jette dans le duodénum via l'ampoule de Vater. On observe également des canaux collatéraux, 10 à 15, qui se « branchent » perpendiculairement sur son trajet. Le canal de Santorini, ou canal accessoire, naît au niveau du coude isthmique du Wirsung, et se dirige vers la papille duodénale mineure.

On distingue deux réseaux de vascularisation : le réseau céphalique, commun avec le duodénum et la partie basse de la VBP, il naît du TC et de l'AMS ; le réseau corporéo-caudal qui est lui commun avec la rate, naît de l'AMS. Le réseau veineux suit le réseau artériel et se draine dans la VMS et la veine splénique. Le pancréas reçoit une innervation sympathique (nerf splanchnique) responsable de la douleur et une innervation parasympathique (nerf vague) qui participe à la sécrétion exocrine.

Figure 1: Anatomie générale du pancréas



D'après : <http://chirurgie-digestive-sat.aphp.fr>

Il existe des variations anatomiques multiples en ce qui concerne la glande pancréatique, on cite ici les plus fréquentes. Le pancréas divisum (1 à 15/100) qui résulte de l'absence de fusion des deux ébauches embryonnaires et de leurs canaux, pouvant être responsable de pancréatites aiguës récidivantes. Le pancréas ectopique qui siège le plus souvent dans l'antrum gastrique ou dans l'intestin grêle, il peut causer des pancréatites voire des tumeurs (14 cas rapportés dans la littérature). Le pancréas annulaire (0.5/1000) est causé par une mauvaise rotation des ébauches pancréatiques embryologiques. Enfin l'agénésie ou l'hypoplasie pancréatique est très rare (<1/1 000 000), la sévérité des symptômes est en lien direct avec la quantité de parenchyme fonctionnel.

b. Histologie

Le pancréas³ est entouré d'une capsule conjonctive qui définit des lobules dans le parenchyme via des septa.

Le pancréas exocrine représente 80% de la glande, il est composé d'acini (amas de cellules sécrétoires) qui sont drainés dans les canaux intercalaires puis intra-lobulaires et enfin inter-lobulaires avant de rejoindre le canal pancréatique principal. Ces canaux sont bordés par un épithélium cubique, simple ou stratifié.

Le pancréas endocrine est composé des ilots de Langerhans qui ne représentent que 1% du parenchyme pancréatique adulte, ils sont composés d'amas cellulaires arrondis tous en contact étroit avec le réseau capillaire. On observe quatre types de cellules distincts : les cellules bêta (ou B) ou cellules à insulines, qui représentent 70% du contingent endocrine, riches en appareil sécrétoire, elles contiennent de nombreuses enzymes. Les cellules alpha (ou A) ou cellules à glucagon, comptent pour 10 à 30%, situées en périphérie des ilots de Langerhans avec un appareil sécrétoire riche mais moins d'enzymes. Les cellules delta (ou D) ou cellules à somatostatine, représentent moins de 10% des cellules endocrines, puis les cellules PP qui sont surtout présentes dans la tête du pancréas.

c. Physiologie pancréatique

Le pancréas est une glande amphicrine hétérotypique c'est-à-dire avec une fonction exocrine et une fonction endocrine assurées par des cellules différentes.

i. Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine sécrète environ 1 litre par jour de suc pancréatique riche en enzymes et en bicarbonates qu'il déverse dans le duodénum, pour neutraliser l'acidité gastrique et digérer les macromolécules afin de les rendre absorbables.

Le « pancréon » est l'unité fonctionnelle du pancréas comprenant les granules zymogènes des acini et les cellules canalaire qui sécrètent les ions bicarbonates (HCO_3^-).

Les acini pancréatiques sécrètent un grand nombre de protéines variées : des enzymes protéolytiques (trypsinogène...), des enzymes lipolytiques (lipase...) et des nucléases (deoxyribonucléase et ribonucléase). Toutes ces enzymes sont initialement inactives,

accompagnées d'inhibiteur dans le suc afin de protéger le pancréas d'une autodigestion. A leur arrivée dans le duodénum elles sont activées, par l'entérokinase de l'épithélium intestinal qui transforme le trypsinogène en trypsine puis celle-ci assure l'activation des autres zymogènes.

La régulation de cette sécrétion exocrine est découpée en quatre phases sécrétoires. La première est la phase céphalique : en réponse aux stimuli sensoriels via le nerf vague, il y a production de gastrine agissant sur la cellule acineuse pour libérer ses zymogènes. La deuxième phase est la phase gastrique : l'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac, provoque par sa distension la sécrétion enzymatique pancréatique. La troisième phase dite intestinale, répond à l'arrivée du chyme gastrique dans le duodénum avec la sécrétion adaptée des différentes protéines dans le suc pancréatique. Enfin la quatrième correspond à la phase inter digestive qui régule la sécrétion basale entre les repas, sans protéines dans la lumière intestinale, on aboutit à une faible production de suc pancréatique.

ii. Pancréas endocrine

Le pancréas endocrine (Figure 2) a pour principale fonction l'homéostasie glucidique via la synthèse d'hormones, hypoglycémiantes et hyperglycémiantes.

L'insuline est synthétisée par les cellules B des îlots de Langerhans, puis stockée et exocytée en cas de besoin. La pré-insuline, est composée de deux chaînes A et B réunies par le peptide C, l'hormone mature est libérée de ce peptide par protéolyse. L'hyperglycémie stimule la sécrétion d'insuline tout comme la stimulation para sympathique et les hormones gastro intestinales (gastrine, sécrétine...). L'hypoglycémie est obtenue par la pénétration active ou passive du glucose dans les cellules, mise en réserve hépatique sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et glycolyse pour consommer le sucre, tandis que la glycogénolyse est diminuée.

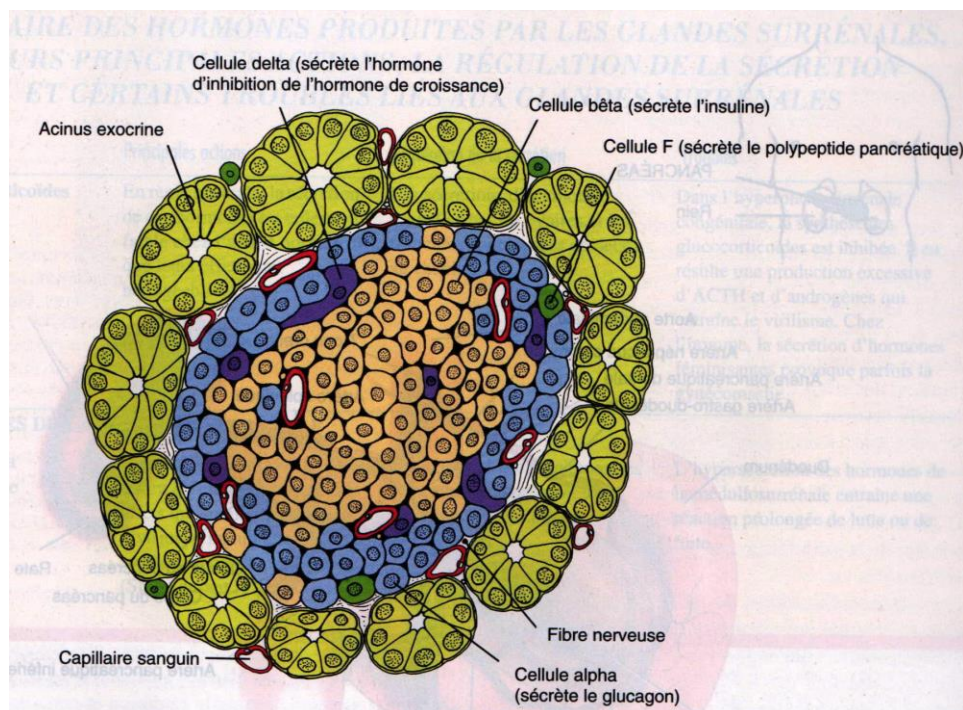
Le glucagon est produit dans les cellules A des îlots de Langerhans, la forme initiale est le préproglucagon, clivé par la trypsine en proglucagon, stocké sous cette forme il est clivé en peptide actif (glucagon) au moment de sa sécrétion endocrine, stimulée par l'hypoglycémie et par les repas riches en protéines ou la stimulation vagale. Son rôle hyperglycémiant passe

par l'augmentation de la glycogénolyse hépatique, l'inhibition de la glycolyse et de la glycogénèse, enfin la néoglucogénèse est favorisée.

La somatostatine (ou somatotropine) est synthétisée par les cellules D des îlots de Langerhans, mais également par les cellules D du tube digestif, de l'hypothalamus et d'autres structures du SNC. Sa sécrétion est activée par le glucagon ou par le manque d'insuline, mais aussi par l'hyperglycémie ou un repas riche en protéines. Le rôle de la somatostatine au niveau intestinal est de mettre l'intestin au repos, avec diminution de la motilité des organes digestifs et de l'absorption intestinale et diminution de la sécrétion pancréatique et digestive.

La dernière hormone synthétisée par la portion endocrine du pancréas est le polypeptide pancréatique (PP), produit par les cellules PP des îlots de Langerhans, son rôle reste mal défini mais il semble inhiber la sécrétion pancréatique exocrine.

Figure 2: Schéma d'un îlot pancréatique et des acini environnants



D'après Chevrier, <http://bio.m2osw.com>

2. Epidémiologie des cancers du pancréas

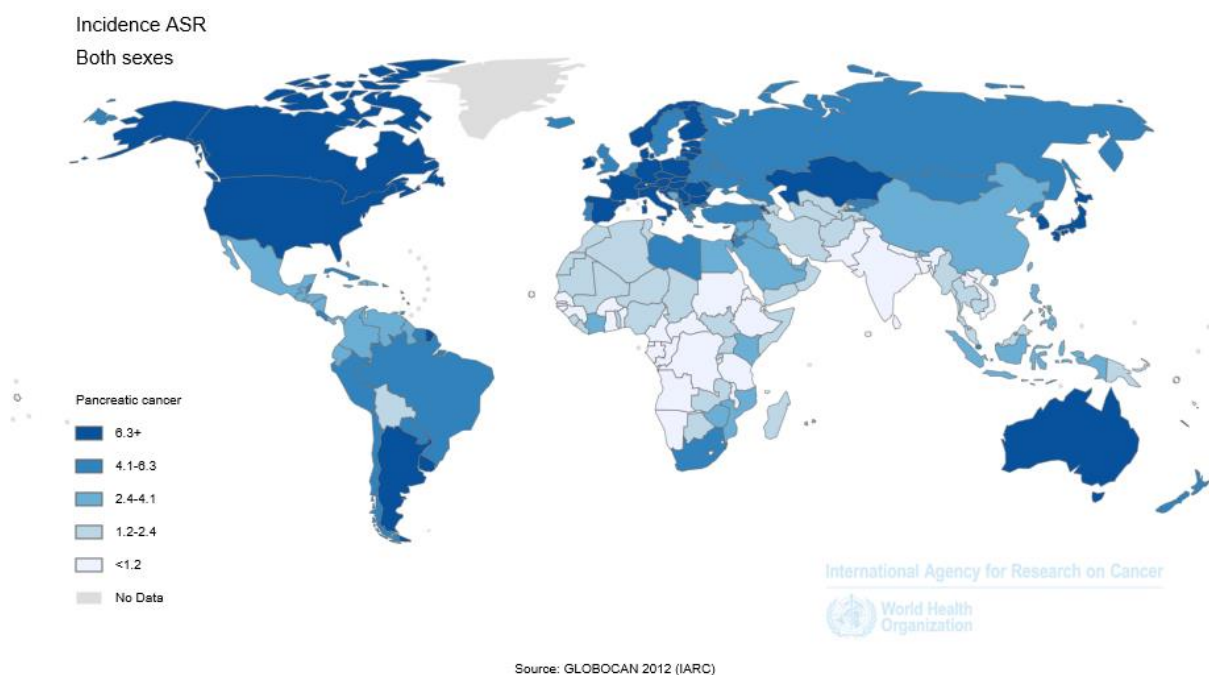
a. Dans le monde

En 2012, l'incidence mondiale⁴ des cancers pancréatiques (toutes histologies confondues) était estimée à environ 340 000 soit 4.2% de la globalité des cancers. La mortalité associée est pour ainsi dire égale à l'incidence avec 330 000 décès spécifiques liés au cancer.

On remarque un gradient Nord-Sud sur l'incidence du cancer du pancréas (Figure 3) et sur la mortalité définissant ainsi trois zones d'incidence :

- Zones à risque élevé ($> 6.3/100\ 000$) : USA, Canada, Argentine, Europe de l'ouest, Kazakhstan, Turquie, Japon, Australie
- Zones à risque intermédiaire (4.1 à 2.4 /100 000) : Amérique centrale et Amérique latine, Russie, Chine, Indonésie, Afrique du sud, Moyen-Orient
- Zones à faible risque ($<2.4/100\ 000$) : Afrique du Nord et centrale, Asie du sud-ouest

Figure 3: Incidence des cancers du pancréas

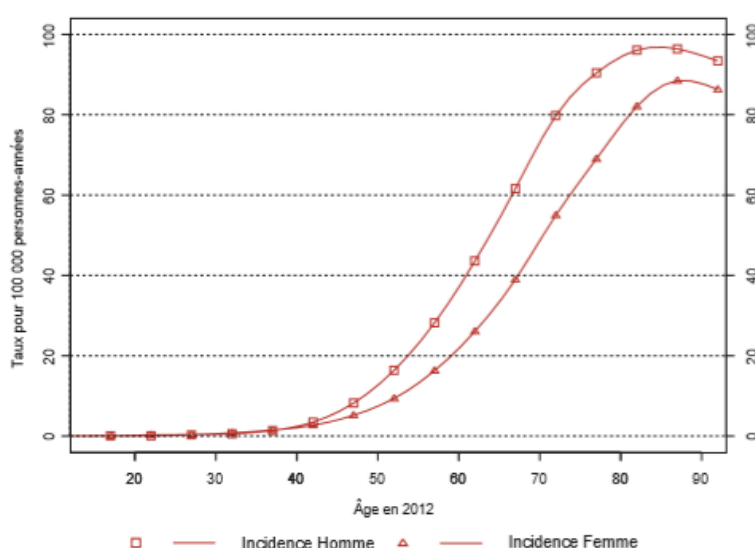


D'après Globocan 2012

a. En France

En France, cette même année 2012, les données de l'INVS⁵, ont estimé le nombre de nouveaux cas de cancer du pancréas à 11 600 dont 51% survenant chez l'homme. Les taux d'incidence standardisés sont de 10,2 chez l'homme et de 6,9 chez la femme (pour 100 000 habitants) en 2012 soit un rapport hommes/femmes de 1,48. L'incidence du cancer du pancréas augmente avec l'âge (Figure 4). L'évolution de l'incidence des cancers pancréatiques montre une augmentation continue depuis 1980 et une accélération entre 2005 et 2012 avec 4.5% d'augmentation annuelle de l'incidence chez l'homme et 5.4% chez la femme. Ainsi la tendance actuelle en France est à l'augmentation de l'incidence, de façon plus marquée chez les femmes, en vingt ans, le nombre de cas de cancer du pancréas a été multiplié par trois : 3500 cas diagnostiqués en 1990 contre 11 660 en 2012 (Figure 5). Les taux de mortalité semblent se stabiliser chez les hommes mais restent en légère augmentation chez les femmes.

Figure 4 : Incidence des cancers du pancréas en France, par âge, en 2012



D'après l'InVS

Figure 5 : Incidence des cancers du pancréas en France entre 1980 et 2012

		Année					
	Sexe	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence	Homme	1 715	1 982	2 902	3 802	5 202	5 963
	Femme	1 085	1 544	2 543	3 498	4 940	5 699

D'après l'InVS

3) Facteurs de risques et cancérogénèse

a. Facteurs de risque endogènes

i. Cancers du pancréas héréditaires

Ils représentent 5 à 10% des cancers du pancréas⁶, avec deux situations distinctes selon que l'on connaît ou non une mutation c'est à dire un syndrome génétique associé.

Dans les cas d'agrégation familiale, les cancers pancréatiques sont dits « non syndromiques », définis par la présence de deux cas au premier degré ou trois cas au deuxième degré dans une même famille sans qu'une mutation génétique connue ne soit retrouvée. Le RR de cancer augmente avec le nombre de cancer pancréatique déjà diagnostiqué dans la famille, ainsi le RR est de 4,5 pour un individu ayant 1 apparenté au 1^{er} degré atteint, de 6,4 pour un individu ayant 2 apparentés au 1^{er} degré atteints et de 32 pour un individu ayant 3 apparentés au 1^{er} degré atteints.

Les cancers pancréatiques liés à une mutation du gène *BRCA 1-2* (*BRCA 2* étant le plus fréquemment rencontré) sont associés à une anomalie d'un gène suppresseur de tumeur indispensable à la réparation de l'ADN. Après les cancers du sein et de l'ovaire, le 3^{ème} cancer associé à cette mutation est le cancer du pancréas avec un RR multiplié par 3.5 à 10 fois par rapport à la population générale. Ce risque varie en fonction du nombre de cas de cancer du pancréas chez les apparentés porteurs de la mutation.

Les familles dites HNPCC (ou Lynch) peuvent être touchées par le cancer pancréatique, qui fait partie du spectre élargi de ce syndrome, le RR varie de 2 à 5 selon la mutation impliquée et le nombre de cas de cancer du pancréas dans la famille. Les gènes impliqués sont les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (ou MMR) : *MSH2*, *MLH1* et *MSH6* et *PMS2*. La transmission est autosomique dominante.

Le syndrome de FAMMM, autosomique dominant, est lui aussi pourvoyeur de cancers pancréatiques il est lié à une mutation du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (9p21) codant pour la protéine p16. Les patients présentent en général de nombreux mélanomes malins, le RR de cancer du pancréas est de 9 à 38 et d'autres cancers comme les cancers du sein, de l'œsophage et les sarcomes sont fréquents.

Le syndrome de Peutz-Jeghers ou syndrome de polypose intestinale-pigmentation cutanée, est un syndrome à transmission autosomique dominante très rare (1 à 9 pour 1 000 000) lié à une mutation du gène *STK11* (19p13.3). On observe des polypes hamartomateux de tout le tube digestif, avec une lentiginose cutanéomuqueuse periorificielle. Le RR d'adénocarcinome pancréatique est de 75 à 130 fois celui de la population générale.

Pour ces patients à risque, le dépistage du cancer du pancréas doit débuter dès l'âge de 45 ans (ou 10 ans avant le cas index), dès 35 ans pour les cas de pancréatite héréditaire. La surveillance repose sur l'écho endoscopie et l'IRM pancréatique annuelles qui sont complémentaires, le premier examen étant meilleur pour les lésions solides de moins de 20 mm, tandis que le deuxième examen caractérise plus précisément les lésions kystiques. En cas d'anomalie détectée, toutes lésions du pancréas gauche doivent mener à une pancréatectomie gauche diagnostique. Une anomalie du pancréas droit doit faire réaliser une ponction sous écho-endoscopie pour aboutir à une chirurgie en cas de preuve histologique ou à d'autres explorations si les résultats sont non significatifs (car la chirurgie du pancréas droit est plus lourde et plus morbide que pour le pancréas gauche). Enfin le patient doit être informé de l'intérêt majeur d'arrêter l'intoxication tabagique le cas échéant et il doit être adressé en consultation d'oncogénétique.

ii. Lésions précancéreuses

Actuellement, la littérature décrit trois types de lésions pancréatiques précancéreuses⁷, leur histoire naturelle retrouve une dysplasie progressive (de grade croissant), un cancer *in situ* puis un cancer infiltrant. Toutes les mutations génétiques impliquées ne sont pas encore bien connues, même si certaines ont déjà une place bien définie comme *KRAS*, *TP53* et *CDKN2A/p16*.

➤ Les néoplasies pancréatiques intra-épithéliales ou PanIN

Lésion précancéreuse pancréatique la plus connue⁸, il s'agit d'une lésion canalaire non invasive, asymptomatique dont la prévalence augmente avec l'âge (surtout après 40 ans). On décrit trois grades de PanIN :

PanIN-1 : lésion avec atypies cyto-nucléaires minimales, les lésions 1A sont planes et les 1B sont papillaires. Au niveau moléculaire, on observe la présence précoce de la mutation *KRAS* (40% des cas) et un raccourcissement des télomères.

PanIN-2 : lésion plane ou en relief avec des atypies plus marquées (perte de polarité du noyau ou augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique), au niveau moléculaire on observe l'inactivation de la protéine p16 (50% des cas).

PanIN-3 : lésion le plus souvent micro papillaire, avec des atypies importantes. Ce stade correspond à un carcinome *in situ*.

Le diagnostic de ces lésions est principalement histologique car il s'agit d'anomalies microscopiques le plus souvent détectées sur pièces de pancréatectomie partielle, dont l'imagerie n'est pas spécifique. La prise en charge repose ensuite sur la chirurgie en cas de PanIN-3 ; les PanIN-2 peuvent être opérées ou surveillées (discussion au cas par cas) et les PanIN-1 relèvent d'une simple surveillance.

➤ Les tumeurs intra canalaire papillaires et mucineuses du pancréas ou TIPMP

Les TIPMP⁹ sont causées par la prolifération de l'épithélium canalaire qui secrète du mucus en quantité trop importante, amenant à une kystisation et une dilatation des canaux pancréatiques. Ces lésions intéressent le CPP et/ou les CPS, principalement dans la tête pancréatique. L'âge médian est de 65 ans avec un sex ratio à 3/2. Contrairement aux PanIN, ces TIPMP sont souvent symptomatiques avec perte de poids et douleurs abdominales en lien avec des épisodes de pancréatite aiguë secondaire à l'obstruction canalaire. L'anatomopathologie permet de définir 4 sous types : gastrique, intestinal, pancréato-bilaire et oncocytaire, avec des risques de dysplasie croissant.

Le risque de dégénérescence vers un carcinome invasif est hétérogène, moins de 20% pour les TIPMP des CPS et de 57 à 92% si la lésion est sur le CPP. La prise en charge est actuellement controversée même s'il existe des recommandations pour un traitement chirurgical (rendu difficile par la mauvaise estimation de l'étendue des lésions).

La cholangio-pancréatographie IRM permet de confirmer dans près de 100% des cas une suspicion de TIPMP évoquée au TDM. L'écho-endoscopie est également utile au bilan de TIPMP (recherche de communications entre les canaux ou de parois épaissies). La prise en

charge repose sur une simple surveillance dont le rythme n'est pas encore consensuel mais qui comprend un scanner pancréatique, une wirsung-IRM et une écho-endoscopie. La décision d'une sanction chirurgicale est prise selon des critères précis : atteinte du CPP, apparition de nodules muraux...

➤ Les cystadénomes mucineux (CM) et cystadénomes séreux (CS)

Les CM sont les lésions kystiques pancréatiques les plus fréquentes¹⁰, ils sont généralement uniques et mesurent plus de 2 cm, ils touchent le plus souvent les femmes (sex ratio = 20/1), avec un âge médian au diagnostic de 40 – 50 ans, et une localisation préférentielle dans le corps et la queue du pancréas. Les CM sont souvent symptomatiques (douleurs abdominales, pancréatite aiguë inaugurale...), leur évolution se fait selon la séquence adénome bénin, lésion *borderline* puis carcinome *in situ*; le risque de dégénérescence en cystadénocarcinome est évalué à 20% environ. Actuellement la prise en charge de ces CM repose sur la chirurgie étant donné leur caractère potentiellement malin.

Les CS sont composés de kystes plus petits (inférieurs à 2 cm) mais plus nombreux, l'épidémiologie et la clinique sont superposables aux CM mais ils ne présentent pas de risque de dégénérescence et ne relèvent donc pas d'une prise en charge chirurgicale ni de surveillance. Le seul risque est un risque compressif en cas de lésion volumineuse.

Le diagnostic de CM repose sur le scanner mais également sur l'IRM, l'intérêt de la cytologie est très variable d'une équipe à l'autre. Aujourd'hui, toute suspicion de CM doit faire réaliser son exérèse en raison du risque de dégénérescence, y compris en cas de tumeur asymptomatique. Cette exérèse, si elle est complète, permet de rassurer le patient et de s'affranchir d'une surveillance par imagerie.

iii. Pathologies prédisposant au cancer pancréatique

➤ Diabète

Le rôle du diabète¹¹ quant aux différents cancers reste controversé, il est difficile de savoir s'il en est la cause ou la conséquence. Concernant le cancer du pancréas, environ 1 patient sur 2 est porteur d'un diabète au moment du diagnostic. Une méta-analyse

regroupant 36 études s'est intéressée à cette question en 2005¹². En poolant toutes les données on retrouve un RR de 1.82 de développer un cancer du pancréas lorsque l'on est porteur d'un diabète de type 2 avec un risque moins élevé lorsque le diabète est ancien.

Différents mécanismes impliqués dans la cancérogénèse chez les patients diabétiques ont été rapportés¹³. Il s'agit d'une voie multifactorielle avec en chef de file l'insuline et l'IGF-1, l'hyperglycémie semble jouer un rôle important avec une activité métabolique et un transport de glucose membranaire majoré dans les cellules cancéreuses. L'état pro-inflammatoire et le surpoids des patients diabétiques ont également un rôle dans la cancérogénèse du cancer pancréatique.

➤ Pancréatite chronique (PC)

En France, on estime l'incidence de la pancréatite chronique¹⁴ (PC) à 26 pour 100 000 habitants, avec un âge moyen au diagnostic de 40 ans. Les principaux facteurs étiologiques sont l'alcool (80%) et le tabac puis arrivent les troubles métaboliques avec l'hypertriglycéridémie et l'hypercalcémie surtout, les formes héréditaires sont à évoquer avant 35 ans avec notamment les mutations des gènes *CFTR*, *SPINK1* ou *PRSS1* puis il faut penser aux formes auto-immunes (PCAI) dont le diagnostic doit être basé sur une imagerie qui est typique. La PC est une atteinte irréversible du pancréas qui devient pierreux, inflammatoire et fibrosé. Les lésions peuvent être focales, segmentaires ou diffuses avec tantôt des sténoses et tantôt des dilatations des canaux. Au cours de l'évolution naturelle les amas protéiques qui obstruent les canaux peuvent se calcifier, définissant ainsi l'entité « pancréatite chronique calcifiante » (ou PCC). Cliniquement la douleur est le principal symptôme, on peut aussi observer un ictère rétionnel et une insuffisance pancréatique exocrine (stéatorrhée) et endocrine (diabète). Le RR de cancer du pancréas est ici de 1.8 à 2, il s'agit d'un facteur indépendant, retrouvé quelle que soit l'étiologie de la PC.

➤ Autres :

Des résultats contradictoires^{15,16} ont été observés, concernant un lien entre gastrectomie partielle et cancer du pancréas, mais le tabagisme est un facteur confondant difficile à contourner dans ces études. La maladie de Biermer a également été associée dans une étude de 1988¹⁷ à une majoration du RR de cancer du pancréas (+ 0.3% par an).

b) Facteurs de risque exogènes

➤ Tabac

En 2010 une étude épidémiologique cas-témoins incluant environ 2500 patients a évalué le lien entre le tabagisme et le cancer du pancréas¹⁸, avec un odd ratio significatif, surtout pour les fumeurs actifs (OR à 3.40).

➤ Alcool

L'évaluation du lien entre la consommation excessive d'alcool et le cancer pancréatique¹⁹ est difficile car l'alcool est la cause de plus de trois quarts des PC pouvant évoluer vers le cancer et le facteur confondant tabac est très souvent présent dans les études. Récemment une méta-analyse regroupant 32 études a rapporté un RR de cancer du pancréas à 1.22 en cas de consommation de plus de 3 verres d'alcool par jour, avec prise en compte des facteurs confondants que pourraient être le tabac ou une pancréatite chronique alcoolique.

➤ Obésité et alimentation

Une méta-analyse²⁰ regroupant 33 études prospectives soit environ 9500 sujets, a évalué les liens entre l'IMC, l'obésité abdominale et le cancer du pancréas. Les résultats sont non significatifs mais montrent qu'une augmentation de 5 unités de l'IMC mène à un RR de cancer du pancréas de 1.10 ($p=0.20$) et une augmentation de 10 cm du tour de taille amène à un RR de cancer pancréatique de 1.11 ($p=0.74$).

➤ Consommation de café

Au début des années 80, une étude cas-témoins anglaise²¹ a rapporté une association significative entre la consommation de café et le cancer du pancréas. Ce postulat a été infirmé par une meta-analyse de 2011²² reprenant 54 études, ($n > 10\,000$), où l'on observe un RR de 1.08, résultat négatif confirmé en 2015 par une étude prospective²³, incluant environ 450 000 personnes aux Etats Unis.

➤ Facteurs environnementaux

Concernant l'exposition aux pesticides, une revue systématique de la littérature est parue en 2007²⁴ incluant 83 études dont 3 études concernant le cancer pancréatique, publiées au début des années 2000 et comptant chacune environ 400 patients. Ces 3 études rapportaient un lien de causalité significatif entre l'exposition aux pesticides et le développement de cancer du pancréas, avec des odds ratio variant de 1.5 pour les fongicides

à 3.4 pour les pesticides contenant de l'arsenic. Ces données ont été confirmées récemment²⁵, avec validation d'un lien entre pesticides et cancer du pancréas, mais aussi avec la description d'une tendance à l'association du cancer du pancréas avec l'exposition aux métaux lourds comme le chrome et le nickel.

c) Biologies des lésions précancéreuses et des tumeurs pancréatiques

Il existe trois types de lésions prédisposant au cancer du pancréas^{7,26} : les PanIN, les TIPMP et les CM. Plusieurs études se sont intéressées à leur évolution naturelle sur les plans immunohistochimiques et génétiques.

i. Les PanIN

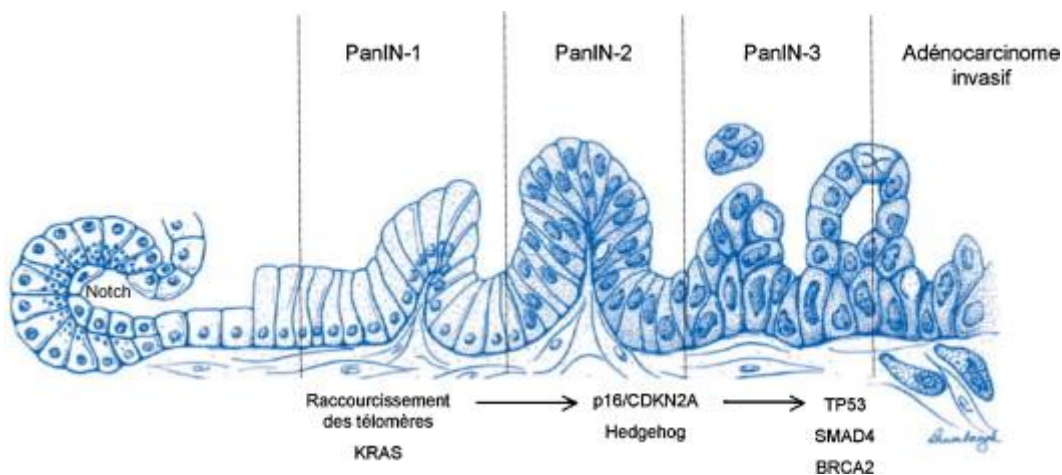
Les PanIN expriment l'apomucine MUC5AC dans les premiers grades d'évolution, avec en parallèle augmentation des MUC3 et 4. Les mucines sont des macromolécules recouvrant les cellules pour les protéger des agressions endogènes ou exogènes (sucs digestifs, micro-organismes, polluants...). Elles sont le composant principal du mucus, synthétisées par les cellules épithéliales, les gènes codant pour ses protéines sont les gènes *MUC*. La protéine MUC1 est présente dans les canaux pancréatiques normaux et de façon majorée dans les PanIN de haut grade puis les adénocarcinomes.

Sur le plan génétique (Figure 6) il est observé en premier lieu un raccourcissement des télomères²⁷ par une majoration de l'activité de la télomérase et de sa sous unité catalytique hTERT qui mène à une instabilité chromosomique par des cycles de cassures/fusions/ponts avec fusion anormale de chromosomes.

L'activation de l'oncogène *KRAS* est une mutation très précoce dans les PanIN et apparait comme un des *driver* principaux dans la carcinogénèse pancréatique. Il a été montré sur des modèles murins après injection de cellules pancréatiques mutées *KRAS*, le développement de lésions de type PanIN avec réactivation de voies de signalisation jusque-là quiescentes : Notch²⁸ qui en temps normal est éteint à l'âge adulte, se réactive dans les PanIN permettant là l'expression du facteur de transcription Hes1. Le taux de cyclooxygénase 2 (COX2)²⁸ est retrouvé élevé via l'activité majeure de la voie des prostaglandines dans les PanIN en comparaison aux cellules pancréatiques contrôles. Enfin l'expression de la MMP-7 favorise la tumorigénèse dans les PanIN tandis que en temps normal sa délétion homozygote inhibe le développement de lésions malignes²⁹.

Il est aussi rapporté une inactivation épigénétique de trois gènes suppresseurs⁷ de tumeur : le premier à être inactivé dans les PanIN précoces est le gène *p16/CDKN2A* qui une fois éteint ne peut plus bloquer le cycle cellulaire pour empêcher la prolifération. Survient ensuite, dans les stades plus tardifs de PanIN, l'inactivation des gènes *TP53* et *SMAD4/DPC4* ; le premier cité est impliqué dans les mécanismes d'apoptose là encore par régulation des cyclines kinases du cycle cellulaire, le deuxième est indispensable pour contrôler la croissance cellulaire. Toutes ces modifications épigénétiques se font principalement par hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs géniques, aboutissant au *gene silencing*.

Figure 6: Modèle de progression génétique d'un adénocarcinome pancréatique.



D'après Huguët F et al., 2011³⁰

ii. Les TIPMP

Les TIPMP expriment de façons différentes les protéines MUC et présentent des grades de dysplasie variables selon leurs sous-types. Par exemple le sous type pancréato-bilaire présente un niveau élevé de dysplasie et évolue rapidement vers du carcinome in situ, il exprime les protéines MUC1 - MUC5AC et touche surtout le CPP. A l'inverse le sous type gastrique se situe le plus souvent dans les canaux secondaires, avec une dysplasie de bas grade et exprime MUC5AC et MUC6.

Sur le plan génétique, les altérations sont similaires à celles retrouvées dans les PanIN (à savoir mutation du gène *KRAS* et inactivation des gènes *p16*, *TP53* et *SMAD4*). La mutation du gène *GNAS*³¹ apparaît au cours du développement et de la progression des TIPMP, il intervient dans la transduction du signal via l'activation de l'adénylate cyclase (AC). Au total

on observe 96% de TIPMP porteuses d'une mutation soit sur le gène *GNAS* soit sur le gène *KRAS*, et plus de la moitié porteuse des deux mutations simultanément. Dans quelques rares TIPMP⁷, on a pu observer des mutations moins fréquentes sur les gènes *PIK3CA* et *BRAF*. De la même façon que dans les PanIN, le mécanisme d'inactivation génétique est principalement l'hyperméthylation des îlots CpG, avec un taux de méthylation croissant parallèlement au grade de dysplasie.

iii. Les cystadénomes mucineux

Les cystadénomes mucineux (CM) sont les lésions pré cancéreuse les moins fréquentes parmi les trois décrites, elles sont donc moins bien connues. On sait qu'elles expriment précocement les protéines MUC2 et MUC5AC, puis lors de la progression vers une dysplasie de plus haut grade, il est observé une expression de MUC1.

Sur le plan génétique^{7,26} il est décrit des mutations de *KRAS* dans les CM dès la dysplasie de bas grade puis le taux augmente en parallèle du grade de la dysplasie. L'inactivation des gènes *p16*, *TP53* et *SMAD4* apparaît de façon plus tardive dans les CM en dysplasie de haut grade et dans les carcinomes invasifs. De façon plus récente le séquençage de génome a permis d'observer d'autres mutations plus rares notamment sur le gène *RNF43*, et aucune mutation spécifique n'a été observée dans les CM, permettant le diagnostic différentiel avec PanIN et TIPMP.

iv. Les adénocarcinomes

Dans les adénocarcinomes pancréatiques constitués on retrouve de nombreuses altérations génétiques (Tableau 1) qui sont de mieux en mieux décrites, notamment grâce au développement du NGS, appliqué sur la tumeur^{32,33}.

Tableau 1 : Principales études portant sur les mutations génétiques trouvées dans les tumeurs pancréatiques.

Population		Technique	Résultats
Jones et al., 2010	24 tumeurs avancées	Séquençage de haute sensibilité	12 voies de signalisation altérées dans 100% des cas. (Figure 7, Tableau 2)
Biankin et al., 2012	142 tumeurs localisées	NGS	Gènes classiquement retrouvés mutés : <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>SMAD4</i> , <i>MLL3</i> , <i>TGFBR2</i> , <i>ARID1A</i> et <i>SF3B1</i> Gènes modifiant la chromatine : <i>EPC1</i> , <i>ARID2</i> et <i>ATM</i>
Sausen et al., 2015	24 tumeurs stade II	NGS	<i>KRAS</i> (88%), <i>TP53</i> (77%), <i>SMAD4</i> (29%), <i>CDKN2A</i> (18%) and <i>TGFBR2</i> (7%) et gène agissant sur la chromatine : <i>ARID1A</i> (9%), <i>MLL3</i> (7%)
Witkiewicz et al., 2015	109 tumeurs résécables	Séquençage Sanger	<i>KRAS</i> (92%), <i>TP53</i> (50%), <i>SMAD4</i> (19%), <i>FLG</i> (10%), <i>ATXN1</i> (7%), <i>CDKN2A</i> (6%), <i>ARID1A</i> (6%)
Waddell et al., 2015	100 tumeurs	NGS	Définition de 4 sous-groupes de cancer : stable (20%), instable (14%), "dispersé" (36%) et localement réarrangé (30%)

Une analyse en NGS de 24 adénocarcinomes pancréatiques³³ a permis d'observer 12 voies de signalisation systématiquement altérées, mais par atteinte de différents gènes à différents niveaux de ces voies, expliquant l'hétérogénéité de la maladie, dans sa présentation initiale et dans sa réponse aux traitements. Les principales voies de signalisation retrouvées mutées concernaient : l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la voie Hedgehog, la signalisation par *KRAS*, et par TGFβ et la voie Notch (Figure 7, Tableau 2).

Figure 7: The 12 pathways and processes whose component genes were genetically altered in most pancreatic cancers.



D'après Jones S et al., 2008 ³³

Tableau 2: The complete listing of the gene sets defining twelve signaling pathways

Regulatory process or pathway	Nb of genetically altered genes detected	% of tumors with genetic alteration	Representative altered genes
Apoptosis	9	100%	<i>CASP10, VCP, CAD, HIP1</i>
DNA damage control	9	83%	<i>ERCC4, ERCC6, EP300, RANBP2, TP53</i>
Regulat° of G₁/S transition	19	100%	<i>CDKN2A, FBXW7, CHD1, APC2</i>
Hedgehog signaling	19	100%	<i>TBX5, SOX3, LRP2, GLI1, GLI3, BOC, BMPR2, CREBBP</i>
Homophilic cell adhesion	30	79%	<i>CDH1-10-2-7, FAT, PCDH15-17-18-9, PCDHB16-2, PCDHGA1-11, PCDHGC4</i>
Integrin signaling	24	67%	<i>ITGA4, ITGA9, ITGA11, LAMA1-4-5, FN1, ILK</i>

c-Jun N-terminal kinase signaling	9	96%	MAP4K3, TNF, ATF2, NFATC3
KRAS signaling	5	100%	KRAS, MAP2K4, RASGRP3
Regulation of invasion	46	92%	ADAM11-12-199-5220, ADAMTS15, DPP6, MEP1A, PCSK6, APG4A, PRSS23
Small GTPase–dependent signaling (other than KRAS)	33	79%	AGHGEF7, ARHGEF9, CDC42BPA, DEPDC2, PLCB3, PLCB4, RP1, PLXNB1, PRKCG
TGF-β signaling	37	100%	TGFBR2, BMPR2, SMAD4, SMAD3
Wnt/Notch signaling	29	100%	MYC, PPP2R3A, WNT9A, MAP2, TSC2, GATA6, TCF4

D'après Jones S et al., 2008 ³³

Récemment, il a été rapporté une treizième voie jouant un rôle crucial dans l'adénocarcinome pancréatique, il s'agit des gènes remodelant la chromatine. Les deux principaux exemples étudiés sont le gène *ARID1A* qui encode une protéine intervenant sur la chromatine. Le second est le gène *MLL3* (déjà connu dans la LMC) qui code pour une histone méthyltransferase, régulant ainsi la conformation de la chromatine.

L'adénocarcinome pancréatique est donc une tumeur très riche en altérations génétiques³³ (environ 1000 mutations somatiques sur 24 tumeurs analysées), au même niveau que les cancers pulmonaires, et supérieur aux tumeurs colorectales (environ 750 mutations retrouvées sur 11 tumeurs analysées). Il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens (83%) touchant de nombreuses voies de signalisation, et aboutissant à une maladie très hétérogène (Figure 8).

Figure 8 : *Summary of somatic mutations in four tumor types*

	Pancreas	Brain	Colorectal	Breast
Number of mutated genes	1007	685	769	1026
Number of nonsilent mutations	1163	748	849	1112
Missense	974 (83.7)	622 (83.2)	722 (85)	909 (81.7)
Nonsense	60 (5.2)	43 (5.7)	48 (5.7)	64 (5.8)
Insertion	4 (0.3)	3 (0.4)	4 (0.5)	5 (0.4)
Deletion	43 (3.7)	46 (6.1)	27 (3.2)	78 (7.0)
Duplication	31 (2.7)	7 (0.9)	18 (2.1)	3 (0.3)
Splice site or UTR	51 (4.4)	27 (3.6)	30 (3.5)	53 (4.8)
Total number of substitutions	1484	937	893	1157

D'après Jones S et al., 2008 ³³ ;

Rq : analyse faite sur 24 tumeurs pancréatiques, 21 tumeurs cérébrales, 11 tumeurs colorectales et 11 tumeurs pulmonaires

4) Diagnostic de cancer du pancréas

a. Tableau clinique

La symptomatologie dans les cancers du pancréas est très variable¹, selon la taille et le stade de la tumeur mais aussi en fonction de sa localisation sur la glande pancréatique.

Les tumeurs de la tête du pancréas (70% des cas), présentent la triade clinique classique avec altération de l'état général (perte importante de poids), un ictère rétionnel (40 à 80%) sans fièvre mais avec prurit (25%), et des douleurs épigastriques ou « solaires » majeures, transfixiantes et rapidement progressives (60 à 80%), c'est le syndrome pancréaticosolaire de Chauffard. Les tumeurs du corps ou de la queue du pancréas (20% des cas) sont moins bruyantes donc de diagnostic plus tardif, lorsque les symptômes douloureux apparaissent, cela traduit un envahissement de la région coélique ou rétro-péritonéale.

D'autres signes moins spécifiques peuvent être révélateurs : fièvre avec angiocholite ou pancréatite aiguë (3 à 9%), douleurs dorsales voire scapulaires par irradiation. Un tableau d'occlusion haute permet parfois de poser le diagnostic de cancer de la tête du pancréas par

compression tumorale duodénale (12%). La découverte d'un diabète (48%) déséquilibré ou l'aggravation d'un diabète jusque-là bien contrôlé, un accident thromboembolique veineux (8%) spontané (phlébite, embolie pulmonaire...) sont autant de tableaux par lesquels le patient peut entrer dans la maladie cancéreuse pancréatique. A noter qu'il existe souvent quelques mois avant le diagnostic de cancer du pancréas une dépression (8%) d'installation progressive souvent passée inaperçue. Ces symptômes aspécifiques peuvent retarder de plusieurs mois la prise en charge de la néoplasie pancréatique sous-jacente.

Enfin dans les cas où la maladie est d'emblée métastatique (50% des cas), on retrouve principalement des symptômes digestifs en lien avec des métastases hépatiques ou de la carcinose péritonéale qui sont les principaux sites métastatiques. Il peut aussi exister un ganglion sus claviculaire gauche (ganglion de Troisier) signifiant une maladie diffuse. De manière plus rare on peut observer des métastases pulmonaires ou pleurales synchrones provoquant une toux voire des hémoptysies. Les métastases osseuses³⁴ sont très rares au diagnostic tout comme l'envahissement médullaire.

b. Biologie

On distingue les dosages biologiques aidant au diagnostic et ceux utiles pour le suivi. Concernant le diagnostic, les marqueurs tumoraux CA 19-9 et ACE sont controversés en raison de sensibilités et spécificités médiocres.

L'antigène polysaccharidique CA 19-9 (*Carbohydrate Antigen 19-9*) décrit pour la première fois en 1979 est synthétisé dans de nombreux tissus (biliaire, gastrique colique, œsophagien et endométrial) et il est absent de manière physiologique chez 5 à 10% de la population générale porteuse du phénotype sanguin Lewis a- b-³⁵. Le CA 19-9 est retrouvé dans les sécrétions pancréatiques des sujets sains (200 U/ml) et porteurs de pathologies pancréatiques bénignes (1900 U/ml)³⁶. La cholestase fréquemment retrouvée dans les pathologies bilio-pancréatiques de tout type (bénignes ou malignes) augmente faussement le taux de CA 19-9³⁷. Tout ceci fait que ce marqueur ne possède pas une bonne spécificité pour le diagnostic d'une affection maligne. La sensibilité du CA 19-9, est corrélée à la taille de la tumeur, allant ainsi selon les séries de 10 à 90%. Cependant pour les tumeurs opérables (situation où le dépistage du cancer du pancréas est utile) la sensibilité se situe aux environs de 50% donc trop peu informatif dans ce contexte. La valeur prédictive positive est beaucoup trop faible avec < 1% de cancer du pancréas diagnostiqué chez les patients ayant un CA 19-9

supérieur à la normale, au sein d'une population de plus de 5000 patients asymptomatique³⁸, et en cas de positivité les investigations nécessaires sont trop coûteuses et l'impact psychologique trop lourd pour pouvoir préconiser ce marqueur en dépistage systématique ; d'autant plus que le diagnostic ne serait pas forcément fait à un stade opérable donc curable.

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE)³⁹ est une glycoprotéine, décrit pour la première fois en 1965, il est physiologiquement exprimé par le fœtus pendant les six premiers mois de vie embryonnaire. Il est lui aussi peu spécifique au cancer du pancréas puisqu'il est élevé dans des atteintes tumorales, ou non, du pancréas mais aussi d'autres organes comme les adénocarcinomes coliques, gastriques, mammaires ou pulmonaires mais également dans des pathologies chroniques comme l'insuffisance rénale et les maladies inflammatoires de l'intestin. Les taux d'ACE sont plus élevés chez l'homme, chez les personnes âgées et chez les patients tabagiques. Il manque de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic d'adénocarcinome pancréatique et n'est donc pas un bon outil diagnostique.

Ces deux « marqueurs tumoraux » sont médiocres dans les situations de diagnostic du cancer du pancréas. A ce jour, le CA19-9 est tout de même utilisé en routine pour le suivi post-opératoire après une chirurgie curative où sa décroissance signe un meilleur pronostic et également en situation métastatique, sa cinétique est utilisée pour évaluer la réponse à la chimiothérapie⁴⁰.

c. Imagerie⁴¹

Le premier examen généralement effectué est une échographie abdominale de débrouillage pour douleurs abdominales ou dyspepsie, celle-ci peut retrouver des signes directs en visualisant la masse pancréatique (dans seulement 20% des cas) ou des signes indirects avec des lésions hépatiques secondaires, une dilatation des voies biliaires ou pancréatiques ou de l'ascite. Sa sensibilité est de 70 à 80% mais dépend beaucoup de la taille de la tumeur et possède des limites inhérentes à la technique (faible reproductibilité, faible échogénicité si surpoids ou météorisme abdominal...). Ainsi en cas de suspicion de cancer du pancréas avec une échographie normale, il est indispensable de réaliser un scanner compte tenu du manque de sensibilité de l'échographie.

Le scanner abdominal injecté est l'examen de référence pour le diagnostic et l'évaluation de l'extension tumorale, il permet une meilleure visualisation de la tumeur pancréatique : glande hypertrophiée et hétérogène, plutôt hypo vascularisée avec des contours irréguliers. Il doit comporter trois temps : un temps abdominal sans injection, un temps artériel (45 sec) qui va permettre un bilan vasculaire précis et un temps portal (70-80 sec). On peut également observer les signes indirects précédemment cités et des métastases hépatiques, ganglionnaires ou des nodules de carcinose péritonéale. La sensibilité pour le diagnostic de cancer du pancréas est de 90% avec un bémol pour les tumeurs de moins de 20 mm. Le scanner est indispensable pour décider de la prise en charge de la tumeur puisqu'il permet de définir la résécabilité de la lésion (critères NCCN 2015, *National Comprehensive Cancer Network*) selon les contacts artériels et veineux et aussi selon l'envahissement ganglionnaire locorégional (péri-pancréatique, pylorique, mésentérique proximal, cystique, péricholédocien) ou à distance (hile hépatique, racine du mésentère, rétropéritonéal ou inter-aortico-cave). Concernant la carcinose péritonéale de grandes variations sont observées selon la corpulence du patient, la taille des implants péritonéaux (< 1cm), la présence d'ascite ou non. Des signes indirects de carcinose peuvent aider au diagnostic avec des compressions digestives ou urétérales, une infiltration du mésentère ou de la graisse péritonéale.

Le scanner thoraco-abdomino-pelvien est à réaliser systématiquement afin d'effectuer le bilan d'extension à distance. Selon les points d'appel clinique il pourra se discuter la réalisation d'un scanner voire d'une IRM cérébrale ainsi qu'une scintigraphie osseuse.

L'écho-endoscopie (EE)⁴² est très intéressante pour les petites tumeurs (< 3 cm) qui sont à risque de passer inaperçu en scanner, sa sensibilité est alors > 95% et ses performances sont meilleures que celles du scanner. L'EE visualise de façon précise les adénopathies péri-pancréatiques. Elle permet d'obtenir une histologie grâce à la ponction de la masse pancréatique, indispensable en cas de maladie non résécable ou de patient non opérable. Cependant cet examen est invasif et opérateur-dépendant avec une valeur prédictive négative faible et les ponctions sont parfois « blanches » ou avec peu de matériel tumoral nécessitant de répéter le geste en cas de négativité initiale (environ 20% de ponction blanche lors du premier geste⁴³).

La tomographie par émission de positions (TEP)⁴⁴ est utile en cas de doute diagnostic notamment concernant l'existence ou non de lésions métastatiques qui contre-indiqueraient une résection. L'apport de la TEP couplée au scanner améliore la sensibilité du TDM seul pour

les nodules de carcinose péritonéale passant ainsi de 22% à 66%, la spécificité n'est pas modifiée de façon significative. Le gain diagnostique est aussi important pour les éventuelles métastases extra-abdominales et les adénopathies tumorales à distance considérées comme des métastases. Cependant la définition morphologique de la tumeur pancréatique primitive est médiocre sur le TEP et il existe des faux positifs importants (captation du 18-FDG par l'estomac ou l'intestin) mais également des faux négatifs (adénocarcinome mucineux).

Pour améliorer la caractérisation de la tumeur primitive pancréatique mais également la détection des métastases hépatiques et péritonéales, l'IRM abdominale est aujourd'hui indiquée dans des situations précises. Sa résolution spatiale est moins bonne que le scanner, donc moins optimale pour le bilan locorégional mais la résolution en contraste est meilleure permettant une étude canalaire plus précise. La séquence T1 fat-sat (avec saturation des graisses) permet de révéler en hyposignal T1 la tumeur primitive mais également des micrométastases hépatiques passées inaperçues au TDM susceptibles de contre indiquer une prise en charge chirurgicale. La carcinose péritonéale est également mieux vue en IRM car il est possible de supprimer le signal de l'ascite, du liquide gastrique et de la graisse. Depuis peu, il est recommandé d'effectuer une IRM hépatique systématique pour les patients relevant d'une chirurgie pancréatique afin de ne pas méconnaître des métastases hépatiques qui contre indiqueraient la chirurgie.

d. Analyse anatomopathologique

Avant de débiter le traitement il est indispensable d'obtenir une preuve histologique de la tumeur. Pour cela, si la tumeur est non résécable (localement avancée ou métastatique d'emblée), ou le patient non opérable il est réalisé une EE avec biopsie de la masse pancréatique ou une biopsie sous scanner de lésion secondaire hépatique afin d'obtenir du matériel pour analyse anatomopathologique. Pour une tumeur apparemment extirpable, chez un patient opérable, et une imagerie en faveur d'un adénocarcinome, un diagnostic histologique pré-opératoire n'est pas indispensable. Environ 15% des patients sont reclassés en « non résécables » lors de l'exploration première de la cavité abdominale : il ne sera alors réalisé que des biopsies sur zones tumorales, sans geste curatif sur la tumeur primitive.

L'analyse anatomopathologique de la pièce opératoire doit comporter une mesure standardisée des marges de résection⁴⁵ pancréatique distale, choledocienne et gastrique ou

duodénale. Les marges vasculaires sont également évaluées avec une marge veineuse (VMS et VP) et une marge artérielle (en arrière de l'AMS). L'ensemble des marges vasculaires constituent la marge rétroporte (MRP) qui est une zone très souvent envahie, dans 50 à 80% des cas selon les séries et qui représente un facteur pronostique indépendant de récurrence locale et de survie. Aujourd'hui il est admis qu'une clearance optimale doit être de 1.5 mm sur ces marges de résection tumorale.

Concernant l'évaluation ganglionnaire, il est recommandé d'analyser au moins dix ganglions dans le curage associé au geste chirurgical curatif. En cas de doute sur une atteinte ganglionnaire à distance, un examen extemporané doit être effectué dans le premier temps chirurgical car s'il revient positif, il reclasse le patient dans la catégorie des tumeurs non résécables.

De façon commune à tous les prélèvements pour analyse histologique, il doit être mentionné le type de pièce reçue ainsi que la description macroscopique : mesure et localisation tumorale. Les aspects microscopiques sont également attendus avec le type histologique, la différenciation, l'envahissement local, lymphatique, vasculaire et périnerveux ainsi que l'état des marges comme décrit ci-dessus.

A la fin de l'analyse anatomopathologique, on peut déterminer la classification pTNM (pathologique) du cancer du pancréas diagnostiqué selon la 7ème édition de l'AJCC datant de 2009 (Annexe 1).

5) Les différents types de cancers du pancréas

a. Tumeurs exocrines

i. Adénocarcinome

L'adénocarcinome canalaire^{1,46} représente 90% des tumeurs pancréatiques exocrines, il se développe à partir des cellules des canaux excréteurs.

L'analyse macroscopique retrouve une tumeur ferme, jaunâtre et mal définie, généralement unifocale, le plus souvent localisée au niveau de la tête pancréatique. Il est possible de noter une dégénérescence canalaire ainsi qu'une importante réaction fibreuse.

L'analyse microscopique permet d'observer des lésions de type glandulaire, infiltrantes, classées de bien différenciées à indifférenciées. Les atypies nucléaires sont plus ou moins marquées avec un stroma^{47,48} caractéristique : très dense, fibreux, composé de fibroblastes, de facteurs de croissance et d'immunomodulateurs avec également de nombreuses cellules inflammatoires, il agit comme un « échafaudage » pour la croissance tumorale. On parle de réaction desmoplastique qui, d'après de nombreuses études, gêne la diffusion des cytotoxiques au sein de la lésion tumorale. L'invasion lymphatique est commune au sein des plages d'adénocarcinome pancréatique et les gros vaisseaux sont également souvent atteints. L'extension des cellules carcinomateuses se fait le long de la membrane basale vers les canaux pancréatiques ou biliaires et vers le duodénum.

L'analyse en immunohistochimie montre un profil de type CK7+, CK8+, CK19+ et CK20-. Le profil des mucines est généralement MUC1+, MUC2-, MUC4+, MUC5AC+ et MUC6+. Les autres protéines fréquemment observées sont la Claudin 4 qui est une cible de développement thérapeutique⁴⁹.

De nombreux sous types d'adénocarcinomes peuvent être identifiés sans impact thérapeutique à ce jour, ils représentent environ 10% des adénocarcinomes pancréatiques, les plus fréquents sont cités ici.

Le carcinome indifférencié (ou anaplasique ou sarcomatoïde) (2 à 7%) se présente sous la forme d'une large plage souvent hémorragique et nécrotique composée de cellules très peu cohésives, son pronostic est très mauvais.

Le carcinome adénosquameux (ou carcinome mucoépidermoïde ou adénoacanthome) (3 à 4%), de pronostic péjoratif, il est défini par au moins 30% de cellules à différenciation squameuse associée aux zones mucosécrétantes.

L'adénocarcinome mucineux non kystique (1 à 3%), plus de la moitié des cellules produisent du mucus.

Le carcinome pancréatique à cellules acineuses, (1 à 2%), présente une architecture en petites unités glandulaires sans stroma desmoplastique en revanche la micro vascularisation est importante.

Le carcinome à cellules en bague à chatons est composé d'au moins 50% de cellules non cohésives, infiltrantes, il est de très mauvais pronostic et son diagnostic nécessite d'avoir éliminé des métastases de cancer gastrique ou colique.

Le carcinome médullaire du pancréas⁵⁰ est un carcinome peu différencié riche en lymphocytes, avec une composante bourgeonnante majoritaire. Il existe souvent un contexte d'instabilité des microsatellites ou de syndrome de Lynch, et une association fréquente au virus EBV, par ailleurs, le statut *KRAS* est le plus souvent *wild type* dans ces tumeurs contrairement aux tumeurs canalaire.

On peut également citer le carcinome pancréatique à différenciation hépatocytaire, le carcinome pancréatique à cellules claires, le carcinome pancréatique colloïde ou encore des formes très rares comme le micro adénocarcinome, le choriocarcinome ou le lymphome pancréatique.

ii. Cystadénocarcinome mucineux

Le cystadénocarcinome mucineux (CAM) est le plus souvent retrouvé dans le corps ou la queue du pancréas, en microscopie on observe deux composantes : une épithéliale où les cellules possèdent un noyau basal avec un mucus riche et une « ovarian-like » composée de cellules très denses, allongées avec un cytoplasme épuré, l'épithélium peut être plan ou en relief définissant ainsi le caractère invasif ou non du CAM. Le pronostic est excellent si la tumeur peut être enlevée en totalité, donc les formes invasives sont de moins bon pronostic. Le cystadénocarcinome séreux est une tumeur rare d'architecture similaire à celles des adénomes microkystiques, le pronostic est intermédiaire avec une croissance lente.

b. Tumeurs neuroendocrines pancréatiques (TNEP)

Les TNEP^{1,51} représentent moins de 10% des tumeurs pancréatiques, elles sont très hétérogènes, certaines se développent dans le cadre de NEM avec un contexte génétique familial. Elles sont classées selon qu'elles soient fonctionnelles (15%) ou non (85%) c'est-à-dire que le peptide sécrété en excès soit symptomatique ou non.

i. Insulinome

C'est la TNEP la plus fréquente (incidence de 75 à 100 pour 100 000), sécrétant de l'insuline en trop grande quantité. L'entrée dans la maladie se fait par le biais d'épisode d'hypoglycémie (triade de Whipple). Le diagnostic est basé sur la sécrétion excessive, non contrôlée et inachevée (pro-insuline et peptide C) d'insuline, l'épreuve de jeûne est l'exploration clé qui objective l'absence de freinage de la sécrétion d'insuline par l'hypoglycémie. Le pronostic est le meilleur au sein des TNEP avec 90% de guérison.

ii. Gastrinome et syndrome de Zollinger-Ellison (SZE)

Dans 25 % des cas, le gastrinome appartient à un tableau de NEM1 (ou syndrome de Wermer). Ce type de TNEP est dans la plupart des cas fonctionnelle (95%) réalisant alors le SZE : vomissements, diarrhées et ulcère gastroduodénal (résistant aux traitements anti sécrétoires), par sécrétion excessive et non régulée de gastrine. Le diagnostic est posé avec un test dynamique : test à la sécrétine mesurant les variations du débit acide et de la gastrinémie.

iii. VIPome

Les VIPomes sont 20 fois moins fréquents que les insulinomes (incidence de 3 à 5 pour 100 000), ils portent également le nom de syndrome de Verner-Morrisson ou choléra pancréatique. Le peptide sécrété est le peptide vaso actif intestinal (VIP) qui entraîne une diarrhée hydrique profuse et des flushes. Le diagnostic repose principalement sur le dosage sanguin d'une hyperVIPémie.

iv. Glucagonome

Cette TNEP est 50 fois moins fréquente que l'insulinome (incidence de 1 à 2 pour 100 000), il s'agit d'une hyperproduction de glucagon, longtemps asymptomatique donc de diagnostic tardif. On retrouve une expression cutanée évolutive avec risque de surinfection, en lien avec un hyper-catabolisme azoté. Le diagnostic repose sur le dosage de glucagon : hyperglucagonémie associé à une forte proportion de proglucagon.

v. Somatostatine

Cette tumeur dérivant des cellules D est une rareté, sa localisation est pancréatique ou intestinale. Le tableau clinique typique associe un diabète, avec lithiase vésiculaire, stéatorrhée et amaigrissement.

6) Prise en charge chirurgicale du cancer du pancréas

a. Définition de la résécabilité

Avant de parler de la résécabilité de la tumeur pancréatique, il faut s'assurer de l'opérabilité du patient, c'est-à-dire de l'absence de comorbidité majeure empêchant une anesthésie générale et une chirurgie lourde. La résécabilité d'une tumeur pancréatique est définie grâce

au scanner abdominal et à l'échographie abdominale initiale, évaluant surtout l'atteinte vasculaire⁵² (critères NCCN 2015).

On décrit trois types de contre-indication opératoire ; la première concerne l'envahissement artériel (AMS, artère hépatique ou TC) qui témoigne d'une extension péri-tumorale importante⁵³ avec un risque micro-métastatique majeur, rendant la chirurgie inutile. Un envahissement > 180°, une sténose ou une occlusion de l'artère hépatique commune, du TC ou de l'AMS sont des contre-indications chirurgicales sauf en cas de réduction tumorale sous traitement.

L'envahissement veineux fait récuser la chirurgie en cas d'extension portant sur plus de 2 cm de la circonférence de la VMS ou de la VP. Il en va de même en cas d'envahissement inférieur à 50% de la VMS à sa partie proximale ou s'il existe des signes d'HTP pouvant faire évoquer un cavernome portal⁵⁴.

L'extension ganglionnaire⁵⁵ est le troisième facteur limitant, les ganglions tumoraux péri-pancréatiques ne sont pas une contre-indication chirurgicale⁵⁶. En revanche, une extension tumorale aux relais ganglionnaires à distance (hile hépatique, racine du mésentère, rétropéritonéal ou inter-aortico-cave) est considérée comme une extension métastatique et contre indique une chirurgie curative.

Suite à cette évaluation, on définit les cancers du pancréas d'emblée résécables, les cancers possiblement résécables après une chimiothérapie première aussi appelés cancers *Borderline* et les cancers non opérables car localement avancés ou métastatiques.

b. Chirurgie curative

Elle représente le seul traitement curatif⁵⁵ à l'heure actuelle (10 à 20% de survie à 5 ans) mais n'est possible que dans 10 à 15% des cancers du pancréas. Les tumeurs dites « *borderline* » sont des tumeurs présentant une contre-indication à la chirurgie première mais potentiellement opérables après 3 mois de chimiothérapie.

Le type de chirurgie dépend de la localisation de la lésion : une lésion céphalique mènera à une DPC, tandis qu'une lésion située sur le corps ou la queue du pancréas sera traitée par SPG.

i. Duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC)

Décrite pour la première fois par Whipple en 1935^{57,58}, elle est aujourd'hui réalisée en un seul temps opératoire (Figure 9). Le premier temps chirurgical⁵⁹ consiste en l'exposition du pancréas par décollement de l'angle colique droit, par la suite, dissection du pédicule hépatique avec dissection du bord inférieur du pancréas. L'étape suivante permet de décoller l'axe mésentérique de la face postérieure du pancréas. Enfin une gastrectomie polaire inférieure est réalisée avant de terminer par la section de l'isthme pancréatique avec libération de la VP (Figure 10).

Figure 9: DPC vue de face en macroscopie

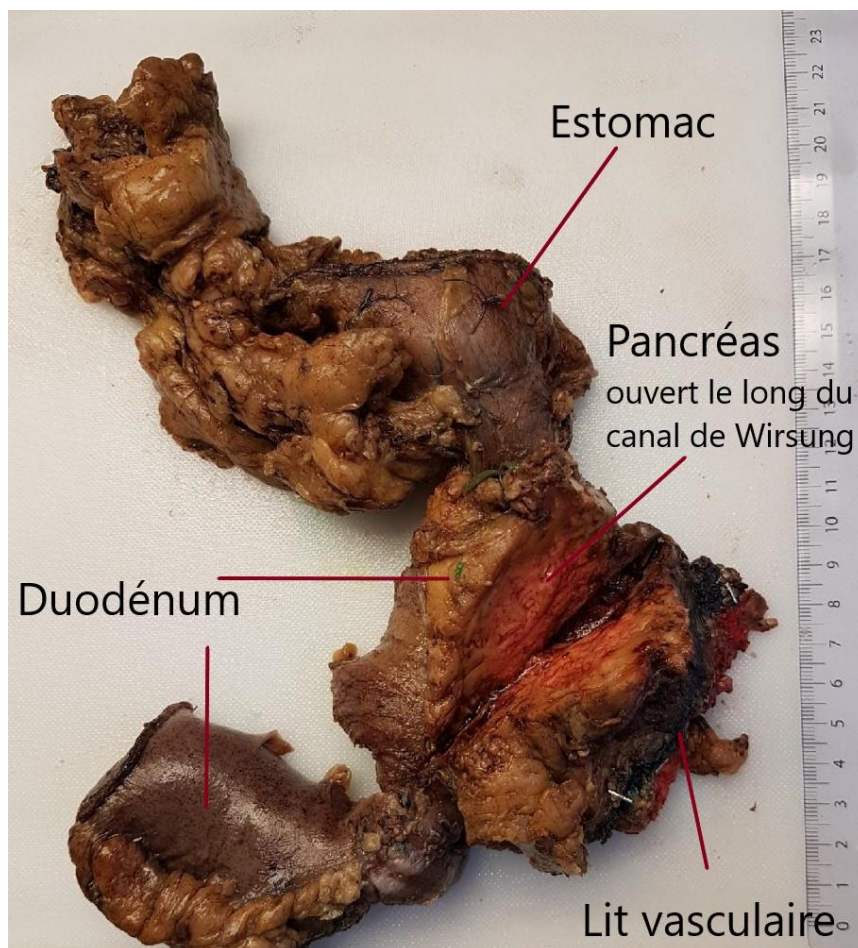
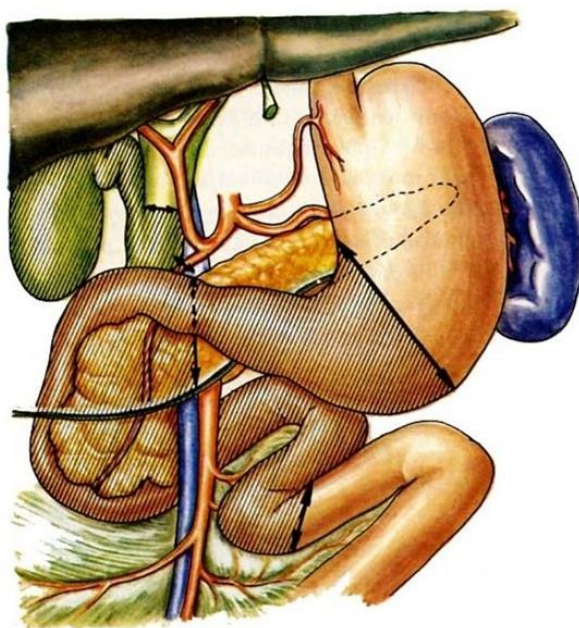


Figure 10: Schéma d'une DPC



D'après Dr MARTIN L., Hépato-gastroentérologue. Hôpital Goüin. CLICHY 92 Les pathologies du pancréas, 2015

Le rétablissement de continuité⁶⁰ pancréatique, biliaire et gastrique se fait classiquement par anastomose pancréatico-jéjunale termino-terminale. La lymphadénectomie régionale recommandée comporte l'analyse d'au moins 10 ganglions et concerne les ganglions péri-pancréatiques, hépatiques et sur le bord droit du TC et de l'AMS.

Récemment, la mortalité post DPC s'est beaucoup améliorée, aujourd'hui située entre 2 et 10% selon les centres avec un effet centre évident. La morbidité reste élevée touchant 30 à 50% des patients opérés avec en premier lieu des fistules pancréatiques⁵⁷ (10 à 30%).

En ce qui concerne le taux de récurrence élevé après DPC⁶¹, il s'explique par des DPC « macroscopiquement curatives » mais non « microscopiquement curatives » dans un tiers voire la moitié des cas. En effet, 30 à 50% de marges positives ont été observées sur différentes séries de DPC étudiées. Les marges de résection sont un facteur pronostique indépendant de récurrence locale et de SG dans le cancer du pancréas.

De façon générale, en cas d'ictère avant la chirurgie curative prévue, il n'y a pas d'indication à un drainage biliaire préopératoire car celui-ci majore les complications. Il est indiqué uniquement s'il existe une angiocholite, si le délai est long avant la chirurgie programmée, si la bilirubine est supérieure à 350 $\mu\text{mol/L}$ ou si l'ictère est prurigineux et réfractaire aux traitements.

Concernant la duodéno-pancréatectomie totale (ou DPT)⁵⁷, elle peut être intéressante pour trois raisons : possibilité d'une atteinte plurifocale du pancréas, envahissement de la tranche de section pancréatique et risque majeur de fistules post opératoires en cas de moignon pancréatique friable. Une telle chirurgie mène fréquemment à un diabète instable permanent et à une dénutrition majeure. Les indications sont donc très limitées : diagnostic extemporané d'un envahissement de la tranche de section pancréatique après DPC, tumeurs multiples, sutures pancréato-digestives d'emblée complexes et diabète insulino-dépendant pré existant.

ii. Spléno-pancréatectomie gauche (SPG)

Cette chirurgie concerne les tumeurs corporeo-caudales⁶², la voie d'abord de choix est la laparotomie sous costale gauche avec ouverture du petit épiploon et section du ligament gastro colique gauche permettant l'exploration du pancréas, du foie, du péritoine et des ganglions régionaux. L'épiploon gastro splénique est lui aussi sectionné afin de donner accès à l'artère splénique qui doit être contrôlée. Arrive ensuite la dissection de l'isthme et du corps du pancréas. L'artère splénique puis le pancréas au niveau de l'isthme sont sectionnés avec réalisation de l'hémostase et du drainage de la loge opératoire.

La mortalité opératoire est de 0.9% et la morbidité de 31%, les principales complications sont des fistules pancréatiques (5%), des hémorragies post-opératoires (4%) et des abcès intra abdominaux (4%).

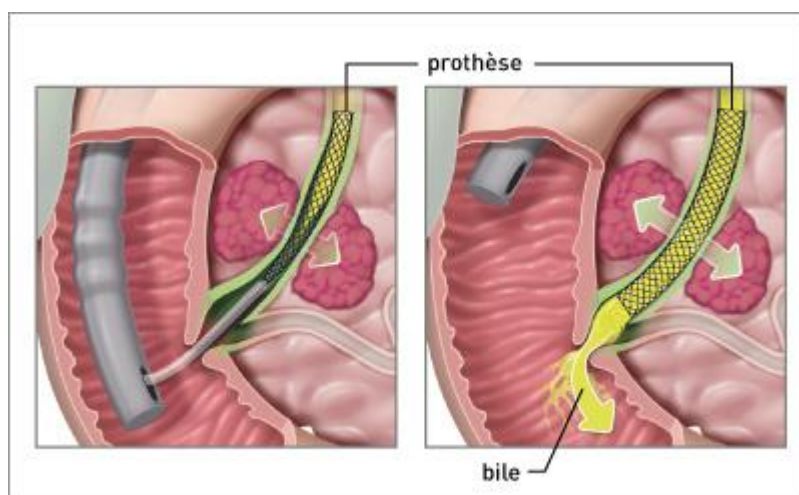
c. Chirurgie palliative

Lorsque la tumeur n'est pas résécable d'emblée ou lorsque la réponse à la chimiothérapie première est médiocre, la tumeur est non résécable, on propose alors une chirurgie palliative, à visée symptomatique uniquement.

L'ictère est une complication classique du cancer de la tête du pancréas, son drainage⁶³ peut être radiologique ou endoscopique avec la pose de prothèse biliaire (Figure 11). Ce geste est certes moins invasif que le drainage chirurgical mais on observe plus de récurrences.

La dérivation biliaire chirurgicale⁶⁴ se fait le plus souvent par anastomose bilio digestive, sur la VBP préférentiellement.

Figure 11 : Schéma de drainage biliaire par voie endoscopique



D'après l'INCa sur <http://www.e-cancer.fr>

La deuxième complication nécessitant une prise en charge chirurgicale palliative est la sténose duodénale qui peut mener à un syndrome occlusif haut. De la même façon, il est possible de poser une prothèse par voie endoscopique⁶⁵, réalisable dans 9 cas sur 10 elle permet de maintenir une alimentation orale dans 80% des cas. Une prise en charge chirurgicale de la sténose duodénale doit être discutée, avec dérivation digestive et anastomose gastro-jéjunale. Certaines équipes ont même proposé de réaliser cette dérivation de façon prophylactique⁶⁶ en cas de tumeur non résécable : retrouvant un gain significatif sur les occlusions digestives hautes tardives (19% *versus* 0% dans le groupe dérivé), sans modification des complications post opératoires ni de la survie.

Au final, il est recommandé de discuter une prise en charge chirurgicale par double dérivation bilio-digestive en cas d'estimation de survie supérieure à 6 mois et d'une tumeur symptomatique⁶⁷. A l'inverse en cas de survie estimée à moins de 6 mois, il est conseillé de privilégier un traitement endoscopique par prothèses biliaire et digestive.

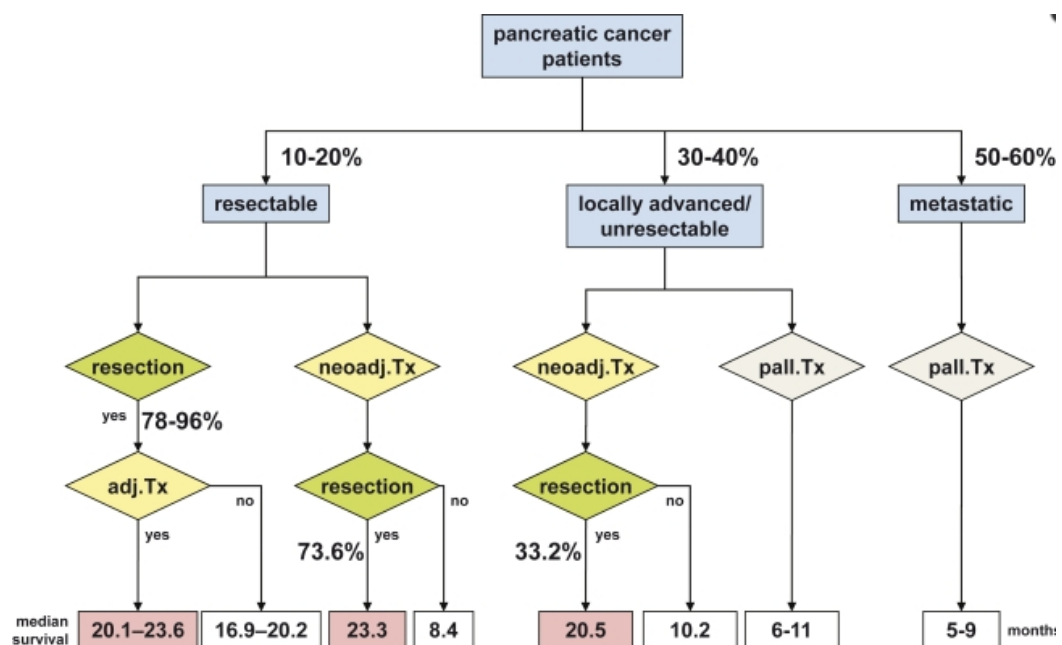
7) Chimiothérapie et radiothérapie du cancer pancréatique

a. Chimiothérapie néo-adjuvante

A ce jour, la chimiothérapie néo-adjuvante⁶⁸ n'a pas de place dans la prise en charge du cancer pancréatique résécable d'emblée en dehors d'un essai. En effet une méta analyse a montré que la survie était la même avec un schéma comportant une chirurgie première puis une chimiothérapie adjuvante⁶⁹.

Concernant les cancers pancréatiques difficilement résécables d'emblée, en raison d'un envahissement vasculaire, cancers définis comme *borderlines*, une chimiothérapie première associée ou non à une radiothérapie, permet un tiers de résections secondaires, avec une chirurgie R0 (Figure 12). Le pronostic des patients traités par résection secondaire est supérieur aux patients réséqués d'emblée (10 mois *versus* 20 mois de survie globale) probablement lié à la sélection des patients ne développant pas de métastases précocement, situation fréquente en cas de chimiothérapie première⁶⁹.

Figure 12: Summary overview of survival and resection percentages of different groups of patients with pancreatic cancer.



D'après Gillen S. et al, 2010 ⁶⁹

b. Chimiothérapie adjuvante

Une des premières études contrôlées, multicentriques, randomisées pour la prise en charge adjuvante du cancer pancréatique est l'étude Conko 001⁷⁰, qui comparait chez les patients en résection R0 ou R1, six mois de GEMCITABINE *versus* une surveillance (Tableau 3). Au total, 368 patients ont été inclus, l'objectif principal était positif avec une SSR qui passait de 6.9 mois dans le groupe surveillance à 13.4 mois dans le groupe GEMCITABINE ($p < 0.01$). La SG était aussi significativement augmentée passant de 20.2 à 22.5 mois ($p < 0.005$).

Tableau 3 : Résultats de l'essai Conko001

	GEMCITABINE	Surveillance	<i>P value</i>
SG (en mois)	22.5	20.2	< 0.005
SSP (en mois)	13.4	6.9	<0.01

D'après Oettle H. et al., 2007 ⁷⁰

Récemment l'étude ESPAC-4⁷¹ a randomisé 730 patients entre une chimiothérapie adjuvante par GEMCITABINE seule ou associée à de la CAPECITABINE. Le bras « GEM-CAP » apporte un gain en survie médiane (28.0 *versus* 25.5 mois, $p = 0.032$). Il n'a pas été noté de différence majeure concernant les effets secondaires ni la qualité de vie, amenant ainsi le protocole « GEM-CAP » à devenir un nouveau standard de chimiothérapie adjuvante du cancer du pancréas.

Concernant la RCT en adjuvant, l'étude ESPAC-1⁷² suggère un effet délétère de la RCT en adjuvant, *versus* la chimiothérapie seule. Néanmoins, une RCT (50.4 Gy associé au 5-FU continu ou à la CAPECITABINE) peut se discuter après chimiothérapie adjuvante pour les patients opérés en résection R1 ou R2.

Les premiers résultats de l'essai PROGIGE 24 – ACCORD 24 multicentrique, randomisé qui compare GEMCITABINE et FOLFIRINOX en traitement adjuvant devraient être publiés en septembre 2018, avec un objectif principal de SSP. L'étude APACT qui compare GEMCITABINE seule *versus* GEMCITABINE et ABRAXANE devrait donner des premiers résultats en 2019. Le standard actuel reste le protocole GEMCITABINE – CAPECITABINE publié dans l'essai ESPAC-4.

c. Chimiothérapie palliative des cancers pancréatiques LA non résécables

Pour ces tumeurs localement avancées non résécables et non métastatiques, il est discuté une radio chimiothérapie (RCT) après chimiothérapie de sélection⁷³, permettant d'exclure des tumeurs très agressives, rapidement évolutive qui ne bénéficieront pas d'un tel traitement. Ainsi une étude⁷⁴ a recueilli les données rétrospectives de 160 patients porteurs d'un adénocarcinome localement avancé (LA), les patients n'ayant pas progressé après 3 mois de chimiothérapie pouvaient poursuivre la chimiothérapie seule ou bien recevoir une RCT (55Gy, boost de 10 Gy et 5-FU, 250 mg/m²/jour en continu). Sur cette série, il a été observé un gain en SSP mais également en OS chez les patients recevant chimiothérapie puis RCT, respectivement : 10.8 *versus* 7.4 mois (p=0.005) et 15.0 *versus* 11.7 mois (p=0.0009). Cependant cette étude était rétrospective et présentait différents biais : hétérogénéité des protocoles de chimiothérapie, RCT avec 5FU en continu intra-veineux et choix de chimiothérapie ou de RCT fait par le clinicien. L'essai randomisé de phase III LAP 07⁷⁵ comparait la RCT (CAPECITABINE 1600mg/m²/j et 54 Gy) *versus* la poursuite de la chimiothérapie seule chez les patients avec un adénocarcinome du pancréas localement avancée contrôlé par la chimiothérapie. Les résultats sont superposables dans les deux bras, sans différence significative.

La RCT première⁷⁶ semble par ailleurs donner de moins bons résultats que la chimiothérapie seule (GEMCITABINE seule 1000mg/m²/semaine pendant 7 semaines) et il est à noter que le meilleur radio-sensibilisant à utiliser pour la RCT paraît être la CAPECITABINE : meilleurs résultats en SSP et en SG que la GEMCITABINE dans l'étude SCALOP⁷⁷.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il y a un risque de dissémination métastatique très élevé. Ainsi, le plus important dans les formes localement avancées est de limiter la dissémination de la maladie pour pouvoir ensuite traiter la maladie locale si elle est restée inopérable. L'intérêt d'une radiothérapie de clôture reste néanmoins à démontrer. Les résultats des nouveaux protocoles de chimiothérapie validés en situation métastatique sont actuellement testés en situation localement avancée, notamment le FOLFIRINOX et le GEMZAR ABRAXANE.

d. Chimiothérapie palliative des cancers pancréatiques en 1^{ère} ligne métastatique

En 1996, la GEMCITABINE⁷⁸ est la première chimiothérapie à obtenir une AMM en tant que traitement standard pour les adénocarcinomes pancréatiques en première ligne métastatique. Comparé au 5-FU à 600mg/m²/semaine une fois par semaine, la GEMCITABINE 1000mg/m²/semaine (sept semaines d'affilée puis 1 semaine de pause puis trois semaines sur quatre) permet un bénéfice clinique significatif (notamment sur l'état général et la douleur). Ainsi l'objectif principal de l'étude (amélioration clinique) est positif : 23.8% *versus* 4.8% (p=0.022) et il existe également un gain sur la SG médiane dans le bras GEMCITABINE avec 5.6 *versus* 4.4 mois (p=0.0025).

A noter que plusieurs schémas d'administration de la GEMCITABINE sont possibles, le schéma dit de « Burris »⁷⁹ : 1000mg/m² sur 30 minutes, sept semaines sur huit puis trois semaines sur quatre et le schéma dit de « Tempero » : 1500 mg/m² sur 150 minutes, trois semaines sur quatre⁸⁰.

Par la suite le début des années 2000 a vu naître de nombreux essais, tous négatifs, d'association de la GEMCITABINE : avec l'IRINOTECAN, un sel de platine, ou encore du PEMETREXED. Concernant une éventuelle association de la GEMCITABINE à une thérapie ciblée, là encore de nombreux essais ont été menés et sont revenus négatifs : ajout du BEVACIZUMAB ou de l'AFLIBERCEPT⁸² (anti-angiogéniques), association à du CETUXIMAB (anti-EGFR) ou inhibiteurs de métallo-protéases. La GEMCITABINE associée à l'ERLOTINIB⁸³ à 100 mg/j a donné des résultats plus intéressants, il est la seule thérapie ciblée approuvée à ce jour par la FDA dans le cancer du pancréas. Cependant le bénéfice est très modeste avec une SSR de 7.8 mois avec l'Erlotinib et 6.5 mois sans (p = 0,09), pour un coût et une toxicité majorés, il n'est pas remboursé dans de nombreux pays comme la France.

Un protocole « Gemzar-free » a ensuite vu le jour dans les années 2010 avec le FOLFIRINOX (essai ACCORD 11-PRODIGE 4) comparé à la GEMCITABINE seule⁸⁴. Ce protocole a permis de dépasser pour la première fois les 10 mois de médiane de survie (Tableau 4). Les effets secondaires (hématotoxicité et diarrhées) sont plus fréquents et de plus haut grade, mais au total la qualité de vie reste conservée plus longtemps avec le schéma FOLFIRINOX. Ce protocole est donc devenu le nouveau standard de traitement pour les patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique en première ligne métastatique. Il faut cependant sélectionner les patients aptes à recevoir cette chimiothérapie « agressive » : *Performans status* à 0 ou 1,

âge inférieur ou égal à 75 ans et bilirubine inférieure à 1.5 fois la normale, ce qui ne concerne qu'une petite partie des patients.

Le deuxième schéma validé après 2010 par l'étude MPACT⁸⁵ est la combinaison GEMCITABINE plus ABRIXANE. Cette molécule est composée d'un taxane, le PACLITAXEL, qui est combiné à des nanoparticules d'albumine qui facilitent le transport intracellulaire de la molécule active et permet une plus forte concentration intra tumorale. Le bénéfice lié à l'ajout de l'ABRIXANE à la GEMCITABINE a été démontré (Tableau 4). Les effets secondaires sont là encore plus marqués avec l'association des deux drogues, notamment en ce qui concerne l'hématotoxicité, la fatigue et la neuropathie, spécifique aux taxanes.

Tableau 4 : Résultats des essais ACCORD 11-PRODIGE 4 et MPACT

ACCORD 11-PRODIGE 4	FOLFIRINOX	GEMCITABINE	<i>P value</i>	HR
SG (en mois)	11,1	6,8	< 0,001	
SSP (en mois)	6,4	3,3	<0,001	
Taux de réponse (en %)	31,6	9,4	0,001	
MPACT	GEMCITABINE-ABRIXANE	GEMCITABINE	<i>P value</i>	HR
SG (en mois)	8,5	6,7	<0,001	0,72
SSP (en mois)	5,5	3,7	<0,001	0,69
Taux de réponse (en %)	23	7	<0,001	

D'après Conroy T. et al. 2011 ⁸⁴ ; DD. Von Hoff et al.2013 ⁸⁵

Un protocole séquentiel a été étudié dans un essai de phase II : alternant du FOLFIRI 3 avec de la GEMCITABINE. L'étude FIRGEM⁸⁶ a comparé ce protocole à l'administration classique de GEMCITABINE en 1^{ère} ligne métastatique, rapportant un bon compromis entre l'efficacité et la tolérance de ce traitement séquentiel. Les effets secondaires étaient comme attendus, plus fréquents et plus sévères dans le bras FIRGEM, mais la tolérance est acceptable. Il reste à comparer dans un essai de phase III ce traitement séquentiel aux traitements de référence en première ligne métastatique des cancers pancréatiques pour les patients « fit », à savoir le FOLFIRINOX et GEMCITABINE-ABRIXANE avant de pouvoir valider ce protocole.

En faisant le parallèle avec d'autres cancers (colon, poumon...), la question d'une maintenance se pose en cas de bonne réponse au traitement. Un essai randomisé de phase II⁸⁷ a étudié le SUNITINIB à 37.5 mg/j en continu *versus* surveillance pour ces patients. La SSP

(objectif principal) à six mois est revenue positive à 3% dans le bras observation *versus* 23% dans le bras SUNITINIB ($p=0.001$), avec une tolérance tout à fait acceptable.

e. 2eme ligne de chimiothérapie et plus

La deuxième ligne de chimiothérapie dans le cancer du pancréas concerne environ 60% des patients mais peu de protocoles sont actuellement validés par des essais randomisés, et les résultats ne sont pas satisfaisants.

Une première étude a comparé une chimiothérapie selon le protocole OFF à un bras BSC, arrêtée précocement en raison d'une perte de chance dans le bras BSC. Par la suite le protocole OFF a été comparé au protocole FF⁸⁸ rapportant un bénéfice en terme de SG dans le bras OFF avec 5.9 mois *versus* 3.3 mois dans le bras FF.

Plus récemment l'étude randomisée de phase III NAPOLI-1⁸⁹ a comparé en 2^{ème} ligne après GEMCITABINE un traitement par IRINOTECAN nanoliposomal (NAL-IRI) *versus* LV5FU2 (bras contrôle) *versus* LV5FU2 associé à l'IRINOTECAN liposomal. L'association a montré un gain en survie médiane avec : 4.2 mois dans le bras contrôle LV5FU2, 4.9 mois dans le bras IRINOTECAN nanoliposomal seul et 6.1 mois dans le bras testant l'association ($p=0.012$, HR=0.67). Les effets secondaires étaient ceux attendus dans l'association, notamment la neutropénie, les troubles digestifs et la fatigue.

Le protocole classique FOLFOX 4⁹⁰ peut être utilisé, tout comme le protocole GEMCITABINE-CISPLATINE⁹¹, tous les deux font l'objet d'un avis d'expert pour une utilisation en 2^{ème} ligne ou plus dans les cancers pancréatiques.

f. Stratégie thérapeutique actuelle

Ainsi aujourd'hui, devant un cancer du pancréas opérable d'emblée, il est proposé une chirurgie suivie de 6 mois de traitement adjuvant par « GEM-CAP » ou GEMCITABINE seule. En cas de marges de résection positives (R1 ou R2) sur la pièce opératoire, une RCT doit se discuter après une phase de chimiothérapie adjuvante.

En cas de maladie non résécable d'emblée, donc *Borderline*, une chimiothérapie par FOLFIRINOX avec une réévaluation précoce à 2 mois doivent être proposées avec, en cas de bonne réponse, une chirurgie si la tumeur est devenue résécable. A noter que dans certains

cas, la chimiothérapie est suivie d'une RCT avant la chirurgie. Par la suite le patient reçoit une chimiothérapie adjuvante.

Pour les tumeurs localement avancées non résécables, il n'existe pas de standard de traitement mais deux options thérapeutiques : chimiothérapie seule ou dans certains centres de traitement, chimiothérapie suivie d'une RCT pour les patients stables ou répondeurs après 6 mois de chimiothérapie.

Enfin concernant les cancers pancréatiques métastatiques, les patients reçoivent du FOLFIRINOX en cas d'état général conservé (*PS* 0 ou 1) et d'un taux de bilirubine inférieur à 1.5N, le protocole GEMCITABINE-ABRAXANE est à proposer aux patients dont le *PS* est ≤ 2 . Pour les patients plus altérés (*PS* >2) la GEMCITABINE en monothérapie est une bonne alternative ; en revanche en cas de *PS* à 3 ou 4 avec des comorbidités lourdes et une espérance de vie courte, les soins de confort sont à privilégier.

Les traitements de seconde ligne métastatique ne sont pas standardisés, les patients trop altérés doivent bénéficier d'un traitement uniquement symptomatique en cas de progression après une première ligne. En revanche, si l'état général le permet, les patients ayant reçus une chimiothérapie de première ligne par FOLFIRINOX pourront bénéficier d'un traitement à base de GEMCITABINE (seule ou avec ABRAXANE) ; à l'inverse les patients traités par GEMCITABINE en première intention tireront un bénéfice d'une chimiothérapie par FOLFOX.

En cas de cancer du pancréas dans un contexte de mutation *BRCA*, il a été prouvé une efficacité supérieure des sels de platine⁹², ainsi les protocoles FOLFIRINOX et 5FU-CDDP sont à privilégier pour ces patients.

g. Facteurs pronostiques et prédictifs

A propos des marqueurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie en adjuvant dans le cancer du pancréas, plusieurs voies ont été explorées, mais aucun n'est à ce jour utilisée en routine, faute de résultats significatifs et/ou l'absence d'alternative thérapeutique et/ou en raison d'un manque d'homogénéité dans les techniques et les résultats.

Le principal marqueur est l'expression de hENT1, transporteur transmembranaire (*human equilibrative nucleoside transporter 1*) impliqué dans la pénétration de la GEMCITABINE dans

la cellule. Avec 350 patients étudiés⁹³ il a été mis en évidence un gain en SG pour les patients avec une forte expression d'hENT1 dans le groupe GEMCITABINE seule: 26.2 mois *versus* 17.1 mois ($p=0.002$) pour les patients hENT1 faible. Cette différence selon l'expression d'hENT1 n'a pas été retrouvée pour les patients traités par 5FU seul : survie médiane de 25.6 mois pour les hENT1 fort et 21.9 mois pour les hENT1 faible ($p=0.362$).

L'activation de la prodrogue de la GEMCITABINE passe par sa phosphorylation par la dCK (déoxycytidine kinase). Sur une cohorte de 434 patients⁹⁴, 142 n'ont pas reçus de traitements adjuvant, 49 ont reçus un traitement non à base de GEMCITABINE (pas de données sur le type de chimiothérapie car seulement abstract disponible) il n'y avait alors aucun impact du taux d'expression de la dCK sur la SG. Pour les 243 patients traités en adjuvant par de la GEMCITABINE, le taux d'expression de la dCK était corrélé avec la SG ($p=0.001$). En analyse multivariée, ajustée sur le centre, le grade tumoral, la taille tumorale, le statut N et les marges de résection, la SG est améliorée dans le groupe traité par GEMCITABINE en cas de taux élevé d'expression de la dCK (HR: 0.57, $p=0.001$).

Une autre voie de recherche concerne la protéine SPARC, impliquée dans la migration, l'adhésion cellulaire, l'interaction avec la matrice extracellulaire et l'angiogenèse. L'expression de SPARC⁹⁵ a été analysée en immunohistochimie sur 160 prélèvements : il a été montré une valeur prédictive péjorative lorsqu'elle est surexprimée pour les patients traités par GEMCITABINE en adjuvant. Ainsi si l'on compare une forte expression de SPARC *versus* une faible expression, la SSR passe de 9 à 12.6 mois ($p=0.005$) et la SG de 19.8 à 26.6 mois ($p=0.033$). Cependant ces résultats méritent d'être approfondis d'autant qu'une étude plus récente s'est intéressée à la protéine SPARC pour des patients en situation adjuvant traités par GEMCITABINE $\pm$ ABRAXANE⁹⁶ et qu'il n'a été retrouvée aucune corrélation avec la SG, ni dans le bras GEMCITABINE seule ni dans le bras avec l'ABRAXANE.

8) ADN tumoral circulant et mutation *KRAS*

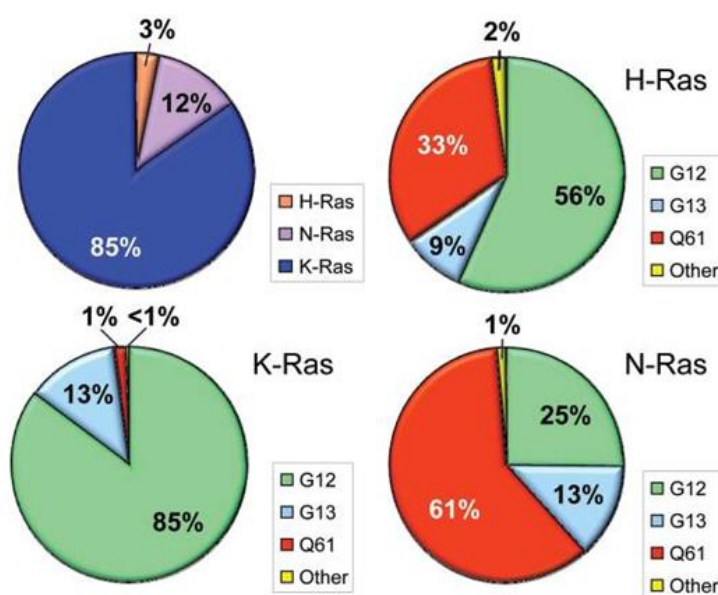
a. Du gène *Ras* à la protéine *KRAS*

i. Découverte et description du gène *Ras* et de ces mutations

La découverte de la mutation activatrice du gène *Ras*⁹⁷⁻⁹⁹ dans les cancers chez l'homme a eu lieu en 1982 par Chang et Der et a mené à beaucoup de changement dans le domaine de la recherche contre le cancer : intérêt majeur pour les mécanismes moléculaires à l'origine des cellules cancéreuses, travail sur la notion de transduction du signal et mise en évidence de l'importance de la famille des petites protéines GTPases.

Initialement, la découverte des gènes de la famille *Ras* a été faite dans le cadre de l'étude des virus oncogéniques pourvoyeurs de sarcomes chez le rat (*rat sarcoma*), par Harvey pour le gène *HRAS* et par Kirsten pour le *KRAS*, respectivement en 1964 et 1967. Ces deux gènes codent pour une protéine transmembranaire (21 kDa et 188 aa) dite « binaire », porteuse d'une molécule de GDP ou de GTP selon son statut ON ou OFF, elle permet ainsi la transduction du signal en intra-cellulaire lorsqu'elle est activée. Le début des années 80 voit émerger un troisième isoforme de *Ras* : *NRAS* (découvert sur des lignées cellulaires de neuroblastome) situé sur le chromosome 1. Les deux autres isoformes sont portés par des gènes homologues sur les chromosomes 12 pour la mutation *KRAS* et 1 pour la mutation *HRAS*. Parmi les différents isoformes de *Ras*, la mutation la plus fréquemment rencontrée dans les cancers humains est la mutation sur le gène *KRAS* (85%), puis *NRAS* (12%) et enfin *HRAS* (3%) (Figure 13). Les trois principaux codons concernés sont les codons 12, 13 et 61, il existe une hétérogénéité au sein de ces isoformes, tant sur le plan de la position de la mutation que de l'acide aminé impliqué. La mutation se situe sur le domaine de fixation des nucléotides GTP/GDP, le changement de nucléotide induit un changement conformationnel qui induit une répercussion fonctionnelle sur la protéine.

Figure 13 : *Distribution of Ras missense mutations in cancer. The distribution of mutations in HRAS, KRAS and NRAS was calculated from data in COSMIC.*



D'après Cox A. et al. 2010 ⁹⁷

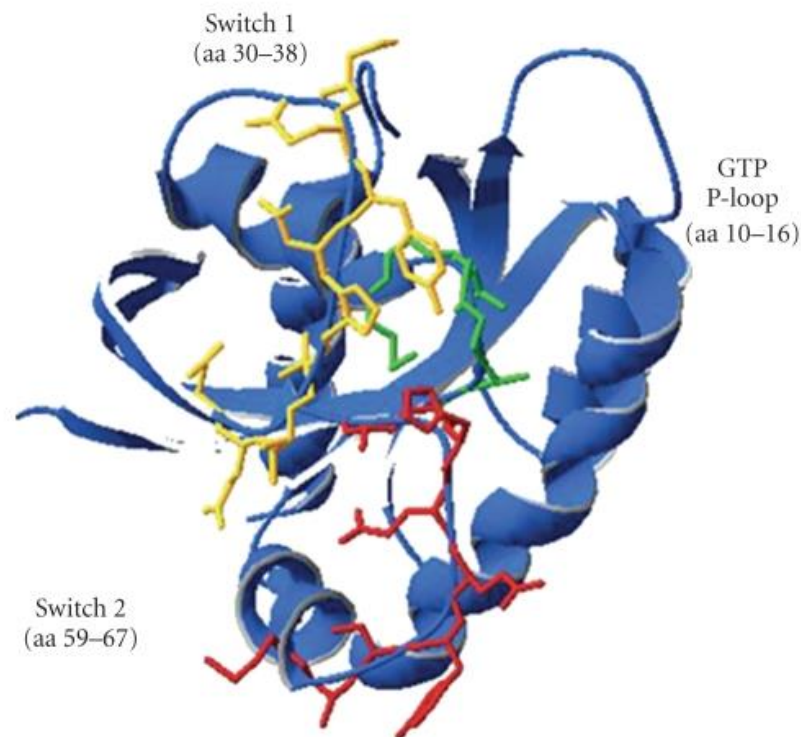
Récemment, le séquençage du génome, a permis de définir qu'un cancer survenait suite à l'altération successive de plusieurs gènes avec d'une part des mutations fréquentes sur un ensemble de gènes classiques, « *passagers* », nécessaires mais non suffisantes, ne déclenchant pas elles même un processus cancéreux. Et d'autre part, l'adjonction de mutations moins fréquentes, spécifiques à chaque individu, qui sont responsables du développement des cellules cancéreuses et que l'on nomme « *drivers* ». De façon plus imagée il est décrit l'émergence de cancers par l'association de deux types de mutations : des « *mountains* » qui sont des mutations fréquentes d'un petit nombre de gène et d'autres part des « *hills* » qui sont des mutations peu fréquentes sur des gènes spécifiques pour chaque individu. La mutation *KRAS* apparait comme la principale mutation « *mountains* » des cancers colorectaux et pancréatiques.

ii. Protéine KRAS et transduction du signal

La protéine KRAS appartient à la superfamille des protéines Ras qui sont comptées parmi les petites protéines GTPases (*Small GTPases*), elle est composée de quatre sites distincts (Figure 14). Le domaine G, commun à toutes les protéines de la famille GTPases qui comporte la « poche à GTP » où l'on peut observer la « GTP P-loop » indispensable au fonctionnement protéique. La région centrale (« *core effector* ») est indispensable pour

l'interaction avec les effecteurs en aval de la protéine et enfin le domaine C-terminal qui est le site d'attachement à la membrane.

Figure 14 : *Model of the KRAS protein with important domains highlighted*



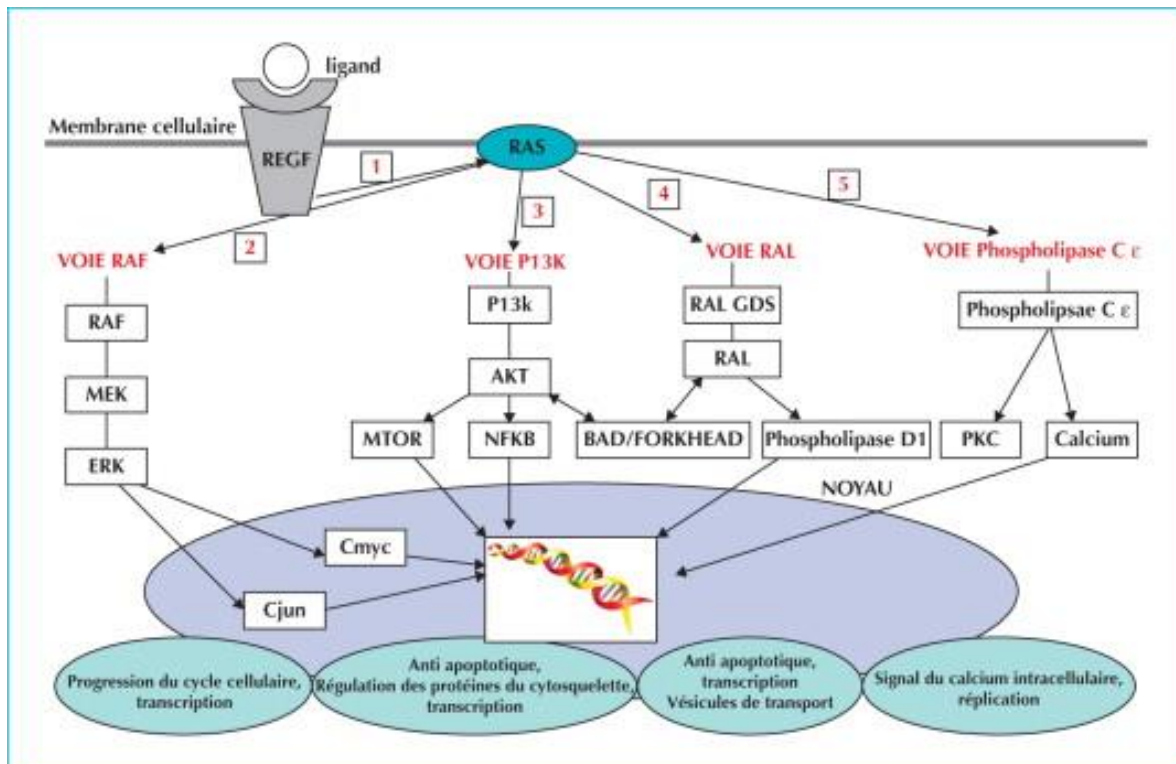
D'après Jancik S et al. 2010 ⁹⁸

En situation physiologique, la protéine KRAS est synthétisée sous la forme d'un précurseur soluble dans le cytosol, elle va subir plusieurs modifications post-transcriptionnelles sur ces radicaux C-terminaux avec farnésylation par la farnésyltransferase (FTase), lui permettant ainsi de s'intégrer dans la membrane cellulaire pour devenir transmembranaire. La protéine KRAS fonctionne alors comme un interrupteur, ON ou OFF, selon qu'elle est associée respectivement à une protéine de GTP ou de GDP, qui déclenche le signal de transduction ou non.

En conformation inactive, la protéine KRAS est porteuse sur son domaine G d'une protéine de GDP, elle est donc « fermée » et ne permet pas la transduction du signal en aval. L'activation de la protéine transmembranaire est rendue possible grâce à la *Guanine nucleotide exchange factor (GEF)* qui permet de remplacer le GDP par du GTP sur le domaine G. En parallèle on observe lors de l'activation des changements conformationnels sur les régions clés appelées *Switch 1 et 2*, domaines fondamentaux dans l'interaction de KRAS avec ses régulateurs (GEF

et GAP) mais aussi avec ses effecteurs. La protéine KRAS active, porteuse d'un GTP, va permettre la transduction du signal de l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau, par phosphorylation de ses effecteurs, notamment sur les voies PI3K/AKT ou Raf/MEK (Figure 15). Des instructions de croissance, de division voire de différenciation sont alors données à la cellule de façon régulée selon les besoins de l'homéostasie.

Figure 15: Principales voies de signalisation d'aval de RAS



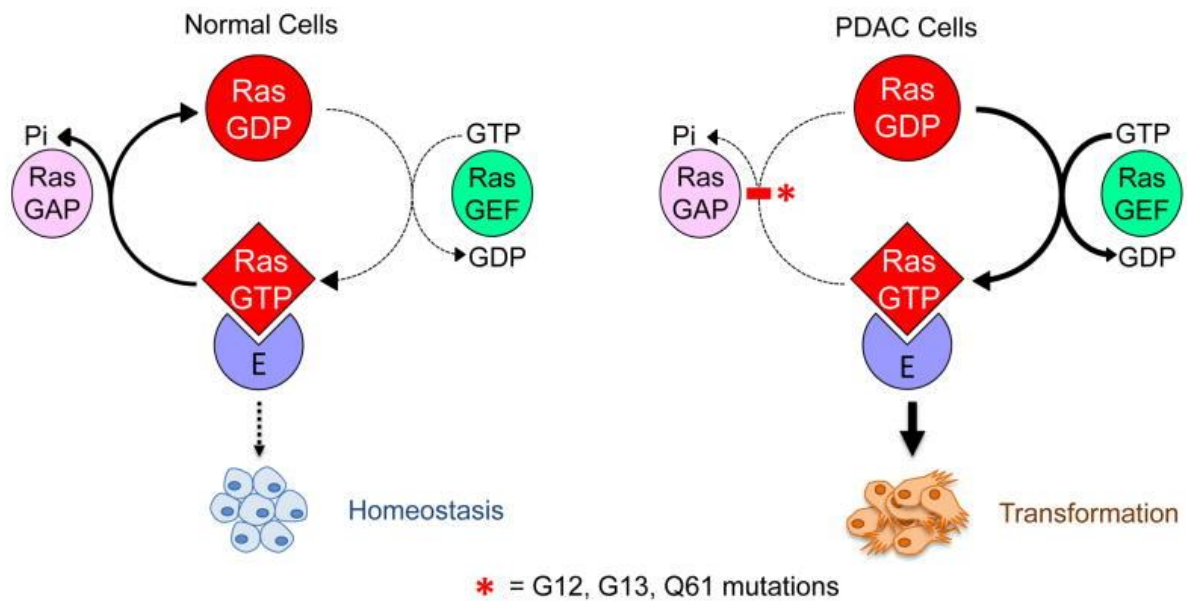
D'après Mansi et al. 2011¹⁰⁰

Par la suite, la protéine GAP (*GTPase activating protein*) va permettre à l'interrupteur KRAS de revenir sur un mode inactif, en accélérant l'hydrolyse du GTP pour redevenir un GDP. La protéine transmembranaire KRAS est donc à nouveau sur la position OFF, ne laissant pas passer le signal en intra-cellulaire.

En cas de mutation du gène *Ras*, la protéine KRAS anormale est active en permanence, la transduction du signal échappe alors à toute régulation, aboutissant à un signal de croissance et de prolifération constant pour la cellule avec également suppression de l'apoptose et redistribution du métabolisme glucidique au profit de l'indépendance de cette cellule (Figure 16). Selon le site de mutation, le mécanisme d'échappement est différent :

obstacle stérique empêchant l'action de la protéine GAP ou molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse du GTP manquant⁹⁹ par exemple. L'activation constitutive de la protéine KRAS aboutit à l'activation constante de ces seconds messagers qui deviennent donc eux aussi indépendants et mènent finalement à la croissance aberrante et non contrôlée de la cellule.

Figure 16: *Mutant KRAS is persistently GTP-bound and active. Wild type KRAS cycles between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state.*



D'après Bryant K. et al., 2014⁹⁹

Les pistes étudiées actuellement pour bloquer cette voie *KRAS* en cas de mutation sont nombreuses, on peut citer les inhibiteurs de la farnésyltransferase (FTIs) qui empêchent l'ancrage de la protéine *KRAS* dans la membrane mais on observe rapidement l'apparition de voies de suppléance alternes. Des travaux sur le blocage d'enzymes du réticulum endoplasmique sont en cours, principalement Rce1 (Ras and a factor converting enzyme 1) et Icmt (Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase). Enfin la principale voie en développement concerne l'inhibition des nombreux seconds messagers dans les principales voies de signalisation : Raf-MEK-ERK et PI3K-AKT-mTOR.

b. Concept de « biopsie liquide » et ADN circulant

i. ADN circulant et avancées techniques

C'est un peu avant les années 50 que la notion d'ADN fragmenté circulant^{101,102} dans le sang a commencé à être évoqué par Mandel et Métais, il avait alors été démontré que l'ADN circulant était relâché de manière physiologique lors de l'apoptose cellulaire. Cette théorie a ouvert la porte à de nombreuses voies de recherche dont la première application sera l'analyse de l'ADN fœtal en anténatal pour les embryons de couples à haut risque de transmettre une pathologie congénitale.

En oncologie la recherche de l'ADN circulant tumoral (ADNct) a été confronté à plusieurs difficultés : distinguer l'ADNct de l'ADN circulant total aussi dénommé ADN *cell free* (ou ADNcf, qui comprend l'ADN circulant tumoral et non tumoral), détecter des taux parfois très faible d'ADNct et savoir le quantifier précisément pour le suivi. Tout cela est aujourd'hui possible en raison des mutations somatiques (le plus souvent substitution d'une paire de bases) présentes dans la tumeur et donc dans son ADN relargué. La difficulté à les détecter repose sur le fait que cet ADNct est morcelé en fragments de 180 à 200 paires de bases et « noyé » dans l'ADNcf nécessitant l'utilisation de techniques très sensibles, notamment la ddPCR.

Actuellement, dans la grande majorité des cas, la recherche de mutations se fait par ddPCR ou par BEAMING (Tableau 5) lorsque la mutation recherchée est connue (exemple de l'EGFR dans les cancers pulmonaires), il s'agit de techniques très sensibles. A l'inverse, lorsque la mutation d'intérêt n'est pas encore connue, le séquençage de tout le génome tumoral est effectué de façon non ciblée, par NGS qui est moins sensible et moins spécifique.

Tableau 5 : Techniques disponibles pour l'analyse de l'ADN circulant

Principe de détection	Nom des techniques	Sensibilité	Avantages	Limites
Séquençage Sanger	Sanger	> 20%	Peu coûteux	Faible sensibilité et protocole complexe

PCR	Bi-PAP, PCR-RFLP	0,1 à 10%	Utilisation facile, peu coûteux	Faible sensibilité
PCR digitale	ddPCR, BEAMing	0,01 à 0,1%	Haute sensibilité	Equipe ment spécifique et coûteux
Séquençage ciblé et profond	CAPP-Seq	0,01 à 0,1%	Haute sensibilité, coût moindre	Erreurs de séquençage
Séquençage du génome entier	NGS, PARE	1%	Concerne tout le génome	Amélioration de la sensibilité en cours, coût

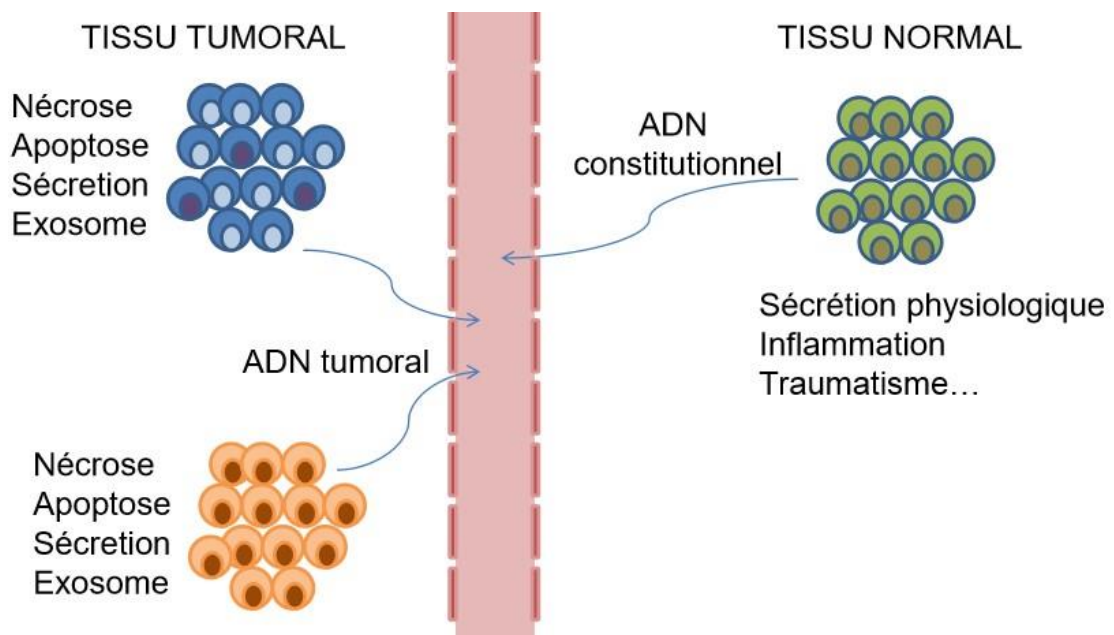
Légende: BEAMing: beads, emulsion, amplification, and magnetics; Bi-PAP: bidirectional pyrophosphorolysisactivated polymerization; CAPP-Seq: cancer personalized profiling by deep sequencing; ddPCR : digital droplet PCR; NGS : Next Generation Sequencing; PARE: personalized analysis of rearranged ends; PCR: polymerase chain reaction; Safe-SeqS: safe-sequencing system

De façon générale le taux d'ADNcf est plus élevé chez les patients porteurs d'un cancer (par rapport à un patient sain) en raison d'un turnover cellulaire augmenté, dépassant les capacités des phagocytes avec un relargage de débris cellulaires plus important. En 1977, Leon et al¹⁰³. proposent des valeurs « normales » d'ADNcf de 0 à 100 ng/mL avec 93% des patients possédant un taux d'ADNcf inférieur à 50 ng/mL. Plusieurs causes de faux positifs sont connues pour majorer les taux d'ADNcf, toutes les causes d'inflammation comme montré dans l'étude de Szpechcinski¹⁰⁴ : les patients porteurs d'asthme, de sarcoïdose et de BPCO ont une concentration en ADNcf plasmatique plus élevée que les patients sains. Les taux sont également plus élevés en cas de sepsis sévère, d'infarctus du myocarde, d'ischémie mésentérique et autres lésions aiguës. L'ADNcf est d'ailleurs étudié en tant que marqueur dans les services de réanimation et d'urgence¹⁰⁵.

L'origine de l'ADNct est multiple (Figure 17), avec de l'ADN relargué par sécrétion active mais également par le mécanisme d'apoptose et par la nécrose tumorale, ainsi les taux retrouvés sont très variables allant de 0.001% à 90%. Le bénéfice de l'ADNct (ou biopsie liquide) réside dans plusieurs points stratégiques tout d'abord il permet de gommer l'hétérogénéité tumorale (temporelle et spatiale) ; ensuite le caractère invasif et parfois peu contributif de la biopsie tumorale par rapport à la simple prise de sang facilement reproductible effectuée pour la recherche d'ADNct. La demi-vie courte (2h) de cet ADNct

permet une évaluation de la charge tumorale quasiment en direct contrairement aux marqueurs sériques tumoraux (ACE, PSA, CA-125...) qui ont une demie vie longue (quelques semaines voire quelques mois).

Figure 17: Origines multiples de l'ADN circulant



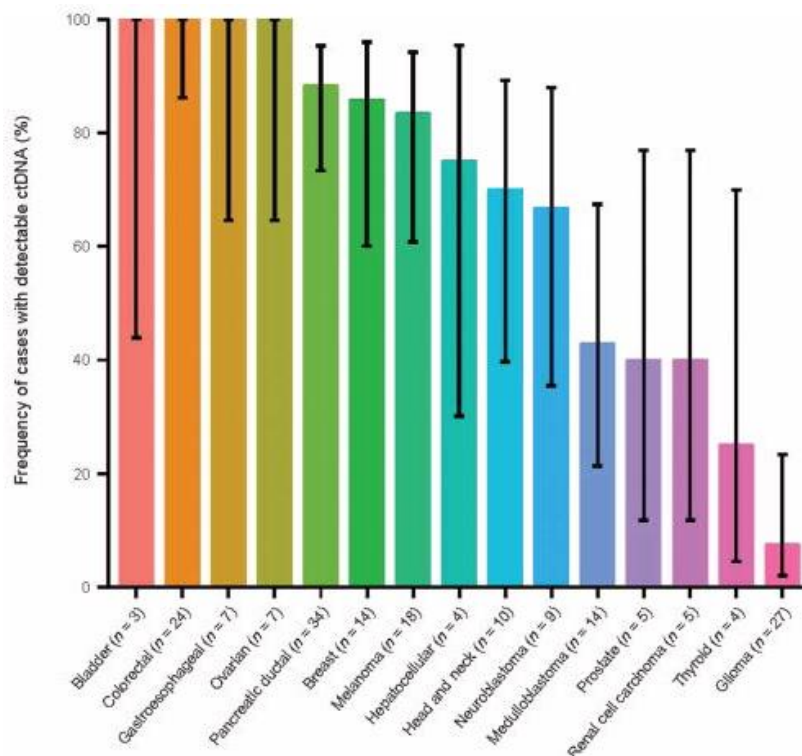
D'après Dr Rouleau E., IGR, 2016

Globalement il est observé dans les études, deux stratégies d'utilisation de l'ADNct, soit débiter par l'analyse du tissu tumoral, s'il est disponible, afin de définir une mutation d'intérêt à rechercher puis à suivre sur l'ADNct, soit d'emblée l'analyse en aveugle de l'ADNct au niveau des gènes d'intérêt si le tissu tumoral n'est pas disponible. Les résultats d'ADNct sont donnés en nombre de copies mutées par millilitre de plasma ou en pourcentage de fréquence allélique (FA) mutée.

Une vaste étude¹⁰² de 2014 s'est intéressée à l'ADNct dans des tumeurs de toutes origines confondues, localisées ou métastatiques. Ainsi il a été montré que dans le groupe de tumeurs métastatiques (n=136), les origines ovariennes, pancréatiques, coliques et pulmonaires (entre autres) présentent dans plus de 80% des cas de l'ADNct détectable (Figure 18), au contraire des tumeurs rénales, prostatiques et thyroïdiennes, les tumeurs du système nerveux central sont les plus pauvres en ADNct (<10%) probablement en lien avec la barrière

hémato-encéphalique. Cette même étude a pu corrélérer le pourcentage de patients avec de l'ADNct détectable (tous primitifs confondus) et le statut localisé ou métastatique de la maladie : 55% en cas de statut localisé *versus* 82% en cas de tumeur métastatique. Il en était de même pour les stades tumoraux, l'ADNct est plus fréquemment détecté lorsque l'on s'élève dans les stades : 47%, 55%, 69% et 82% respectivement pour les stades I, II, III et IV.

Figure 18: *Fraction of patients with detectable ctDNA.*



D'après Bettegowda C. et al., 2014 ¹⁰²

De manière générale, la détection de l'ADNct se démocratise en oncologie¹⁰⁶. Ainsi il est maintenant établi que l'extraction d'ADN à partir du plasma est meilleure que celle effectuée à partir du sérum en raison d'un taux d'ADNcf élevé dans le sérum causé par l'ADN des éléments figurés du sang présents dans le sérum (principalement les leucocytes) mais pas dans le plasma. Enfin il est mis en évidence dans les différentes études un temps de rendu plus court des résultats lors de l'analyse mutationnelle sur plasma par rapport à celle faite sur tissu FFPE.

ii. Utilisation de l'ADN circulant en cancérologie

Les applications cliniques de l'ADN circulant semblent multiples, à tous les niveaux de la maladie cancéreuse : au diagnostic pour écarter les diagnostics différentiels, en adjuvant pour guider le traitement post-opératoire et évaluer le risque de rechute puis au stade métastatique pour évaluer la réponse tumorale et anticiper un échappement tumoral mais également pour travailler sur les modifications mutationnelles au sein de la tumeur selon la pression thérapeutique (résistance secondaire).

Un état des lieux concernant l'ADNct a été réalisé en 2016 par Pietrasz et al.¹⁰⁷ dans les cancers colorectaux, pulmonaires et pancréatiques, regroupant les trois principales techniques de biologie moléculaire utilisées à l'heure actuelle pour ce genre d'études : PCR digitale, BEAMing et NGS. Il est là question de corrélation entre les taux de mutation *KRAS* trouvés sur l'ADN provenant du tissu tumoral et l'ADNct, celle-ci est évaluée à 77% ; avec entre autres une mise en avant de l'hétérogénéité du tissu tumoral.

A propos de l'utilisation de l'ADNct comme outil diagnostic, les techniques de détection de mutations dans l'ADNct semblent encore trop peu sensibles à ce jour pour une utilisation en routine sur une population tout venant. L'exemple du cancer colique permet de mieux comprendre cette notion : le test fécal immunologique effectué pour le dépistage ne routine affiche une sensibilité de 79% et une spécificité de 94%¹⁰⁸. L'ADNct muté *KRAS* permet d'atteindre 20 à 60% de sensibilité pour les tumeurs non métastatiques et 80 à 100% pour les métastatiques¹⁰⁹, or le dépistage est surtout intéressant au stade localisé de la maladie.

Dans le domaine du cancer colique, l'utilité de l'ADNct¹¹⁰ *KRAS* muté est démontrée en situation adjuvante : la présence d'ADNct détectable en pré-opératoire est associée à un stade tumoral plus avancé, avec risque de récurrence plus élevé ; la corrélation de l'ADNct muté *KRAS* en pré opératoire avec la survie globale n'a pas été mise en évidence dans une étude de juin 2017 portant sur 66 patients opérés¹¹¹. En post-opératoire, l'ADNct permet de détecter une maladie résiduelle microscopique, avec une corrélation au risque de rechute ($p < 0.01$) et donc un intérêt pour orienter vers une chimiothérapie adjuvante¹¹⁰ devant le caractère pronostique de l'ADNct post-opératoire.

En situation métastatique dans le cancer colique, l'ADNct est le reflet de la charge tumorale et possède une valeur prédictive et pronostique, en effet en présence d'un taux

d'ADNct élevé au début d'une chimiothérapie de 1^{ère} ligne métastatique, on observe un taux de contrôle faible et une SSP plus courte¹¹⁰.

Enfin l'apparition d'une mutation de résistance, liée à la pression de sélection par les anti-EGFR pourrait permettre de changer précocement de traitement, avant la progression et à l'inverse la disparition d'une telle mutation permettrait de rechallenger un traitement déjà utilisé¹¹⁰, ce type de prise en charge basé sur le caractère prédictif de l'ADNct n'est pas encore validé prospectivement donc pas utilisé en routine aujourd'hui.

Le cancer pulmonaire est l'organe où l'ADNct est le plus utilisé en routine¹¹². Une corrélation est retrouvée entre la présence d'une mutation de l'EGFR sur l'ADNct ou sur le matériel tumoral et une meilleure SSP pour les patients traités par anti-EGFR, à l'inverse la corrélation existe pour la mutation *KRAS* mais de façon péjorative. La place majeure de l'ADNct dans le cancer pulmonaire se situe lors de la progression tumorale sous anti-EGFR. La recherche de la mutation de résistance *T790M* sur le gène de l'*EGFR* se fait le plus souvent par prise de sang, évitant ainsi la re-biopsie pulmonaire. Il existe une AMM basée sur la recherche de cette mutation *T790M* de l'*EGFR* sur tissu tumoral ou sur ADNct pour l'OSIMERTINIB (HAS santé : « La recherche de cette mutation peut être effectuée sur ADN tumoral circulant et/ou biopsie tumorale. »)

Il existe encore de nombreuses limites à ces travaux¹⁰⁶ qui ne permettent pas à ce jour une large utilisation en routine. En effet la grande majorité des études présente un nombre de patients modestes, avec une puissance statistique discutable et surtout l'absence de validation prospective. Il est important de travailler sur la standardisation des techniques utilisées pour obtenir des résultats homogènes et comparables. Enfin il reste à déterminer le meilleur moment de réalisation de la prise de sang pour analyser l'ADNct, en améliorant les connaissances concernant la dynamique de relargage de l'ADNct par la tumeur. De plus, il est indispensable de valider son intérêt prospectivement dans des études randomisées de stratégie thérapeutique de large échelle.

c. ADN tumoral circulant dans le cancer du pancréas

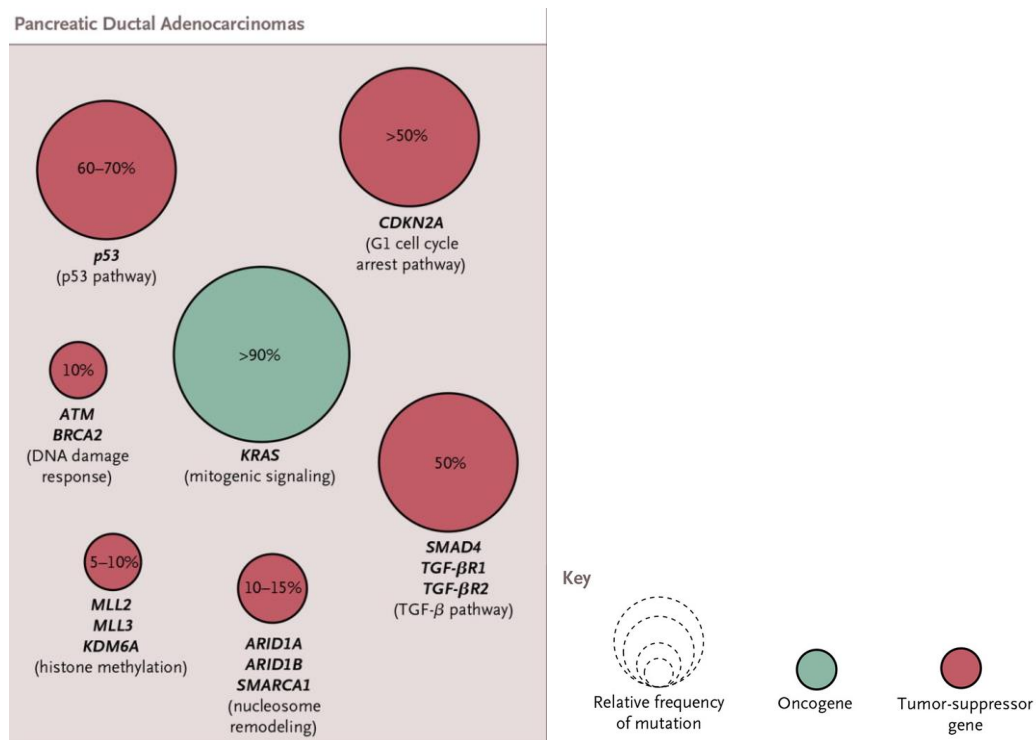
i. Mutation *KRAS* et cancer du pancréas

La première description précise de la présence de *KRAS* dans le tissu pancréatique date de 1988 par Almoguera et al.¹¹³ avec 21 tumeurs mutées *KRAS* codon 12 sur les 22 analysées et 7 métastases sur 7 contenant la même mutation *KRAS*. La technique alors utilisée était la « *RNAse cleavage method* » avec lecture par électrophorèse. L'importance du gène *KRAS* dans l'oncogénèse pancréatique était déjà évoquée il y a 30 ans.

La mutation du gène *KRAS* est très fréquemment retrouvée dans les adénocarcinomes pancréatiques (Figures 19 et 20), dans une étude récente qui a analysé 150 tumeurs¹¹⁴, elle a été retrouvée dans 93% des cas (soit 140 tumeurs) sous forme d'une amplification avec pour les trois principales mutations retrouvées des mutations de type G12D (Gly12Asp) pour 62 tumeurs (41%) puis G12V (Gly12Val) pour 41 tumeurs (27%) et enfin G12R (Gly12Arg) pour 28 tumeurs soit 19%. Les autres mutations étaient développées sur les codons 12 et 61. Il a été observé 4 tumeurs (2,6%) bi allélique pour *KRAS* comportant donc différentes mutations de *KRAS* dont 3 était porteuses de l'association des mutations G12V et G12R. Il existe aussi des tumeurs composées de différents sous-clones de cellules, là aussi avec différentes mutations *KRAS*. A noter que la mutation *KRAS* est mutuellement exclusive avec (entre autres) *NRAS*, *HRAS*, *EGFR*, *ALK* et *BRAF*.

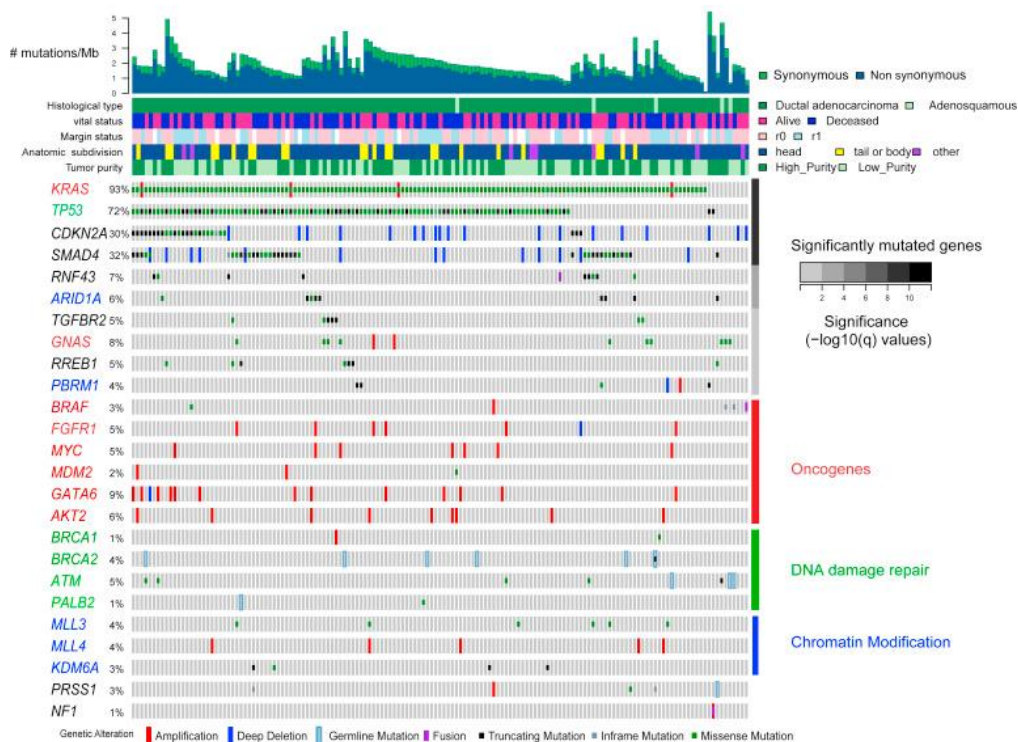
En deuxième position par ordre de fréquence, c'est la mutation de *TP53* qui est observée dans 72% des cas avec une mutation faux-sens puis on retrouve *CDKN2A* et *SMAD4* dans environ 30% des tumeurs étudiées. Les mutations de *GNAS* et *BRAF* sont plus rares, ce sont des amplifications, respectivement vues dans 8 et 3% des cancers pancréatiques.

Figure 19: Approximate Frequencies of Mutations in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinomas



D'après Ryan D et al. 2014¹¹⁵

Figure 20: Landscape of Genomic Alterations in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma



D'après Raphael BJ et al. 2017¹¹⁴

Une deuxième étude récente¹¹⁶ portant sur 168 patients porteurs d'un cancer du pancréas a retrouvé des chiffres globalement similaires à savoir 74% de mutations *KRAS* sur les codons 12 et 13, 5% sur le codon 61 soit un total de 79% de mutation *KRAS* retrouvé. Les types de mutations observés étaient principalement : G12D (49%), puis G12V (34%) et G12R (14%). Aucune mutation n'a été retrouvée sur le gène *KRAS* exon 4 ni sur le gène *NRAS* au sein des 168 tumeurs testées.

Il existe très peu de littérature concernant l'isoforme *HRAS* dans les cancers du pancréas, cependant il semblerait que la perte du gène *HRAS wild type*¹¹⁷ accélère et favorise la survenue d'un cancer du pancréas.

Compte tenu de la fréquence des mutations *Ras* dans les cancers du pancréas, la détection de l'ADNct muté *KRAS* semble intéressante afin d'adapter la stratégie thérapeutique.

ii. Place de l'ADNct muté *KRAS* pour le diagnostic de cancer du pancréas

Le diagnostic de cancer du pancréas est souvent fait à un stade tardif en raison de signes cliniques et biologiques peu spécifiques et de diagnostics différentiels difficiles à écarter notamment la pancréatite chronique ou les lésions précancéreuses comme les TIPMP. Contrairement au cancer colique, à ce jour, aucune recommandation n'est validée concernant le dépistage du cancer du pancréas, ce qui laisse plus de place au travail avec l'ADNct dans ce domaine.

En 1999¹¹⁸ Theodor et al. utilisent pour la première fois de façon combinée l'ADNct muté *KRAS* (codon 12 uniquement) et le CA19-9 pour augmenter le seuil de détection des cancers pancréatiques. Leur étude était faite sur 20 patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique, 6 PC et 5 patients sains. 14 patients sur les 20 présentaient une mutation de *KRAS* contre aucun des patients porteurs d'une PC ou du groupe contrôle. En combinant une élévation de l'ADNct muté *KRAS* ou du CA19-9, 19 patients sur les 20 porteurs d'un adénocarcinome pancréatique étaient diagnostiqués. Ainsi l'idée s'installe d'utiliser l'ADNct muté *KRAS*, au mieux combiné au CA19-9 ou lorsque le CA19-9 est ininterprétable ou non significatif notamment pour le diagnostic différentiel de PC¹¹⁹. La revue de 15 ans de

littérature de De-Qing en 2014¹²⁰, montre que la valeur de la mutation *KRAS* pour différencier une pancréatite chronique d'un cancer débutant reste trop incertaine pour une utilisation en routine. Cependant la présence ou non de la mutation *KRAS* améliore la sensibilité de l'aspiration à l'aiguille fine et de l'écho-endoscopie rétrograde, notamment pour détecter les patients porteurs d'une pancréatite chronique et à haut risque de développer un cancer du pancréas.

D'autres études se sont intéressées à des cibles différentes de l'ADNct muté *KRAS*, notamment les micro-RNA ou les cellules tumorales circulantes comme aides au diagnostic des adénocarcinomes pancréatiques¹²¹⁻¹²⁴.

iii. En situation adjuvante

Les cancers du pancréas peuvent être pris en charge par une chirurgie première dans environ un quart des cas, avec une chirurgie « lourde » suivie d'une chimiothérapie adjuvante.

L'ADN tumoral circulant *KRAS* muté a été étudié dans cette situation post-opératoire pour la première fois en 1996 par S Nomoto *et al.*¹²⁵ : il a été observé l'absence de mutation *KRAS* détectable en pré-opératoire dans la sang circulant mais son apparition lors de la laparotomie (en per-opératoire) et sa persistance à 15 jours de la chirurgie. Il était alors donné comme explication que le stress de la chirurgie pouvait causer une dissémination hématogène des cellules cancéreuses, appuyant ainsi l'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante, quel que soit le stade tumoral initial. Par la suite, aucune étude similaire n'a recherché une variation per opératoire du taux d'ADNct muté *KRAS*.

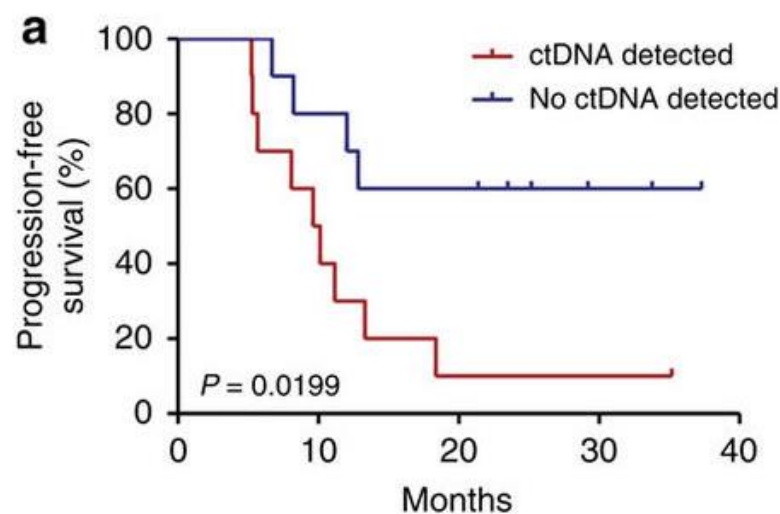
En 1998, T Yamada *et al.*¹²⁶ ont montré sur une cohorte de 21 patients que la présence d'ADNct muté *KRAS* en pré-opératoire est corrélée avec une taille plus importante de la tumeur et une chirurgie plus fréquemment R1. En fin de traitement adjuvant, la persistance de *KRAS* dans l'ADNct était associée à un pronostic défavorable avec des rechutes plus précoces. A noter que la sensibilité de la méthode utilisée était de 1%.

Une autre étude de 2006 portant sur 30 patients a rapporté la difficulté à détecter une mutation de *KRAS* dans l'ADNct avec une technique plus ancienne qui est la restriction de longueur de fragments (PCR-RFLP). En effet, R Marchese *et al.*¹²⁷ ont retrouvé 70% de mutation *KRAS* sur le tissu et aucune mutation dans le plasma, ce qui semble aujourd'hui

étonnant même s'il s'agissait de patients opérables avec donc une charge tumorale relativement faible. La sensibilité de cette étude étant probablement insuffisante.

L'année 2015 a été très riche en publications mettant en relation étroite l'ADNct muté *KRAS* et le pronostic de façon globale. En effet il est montré dans ces études^{128,129} que la présence d'ADNct détectable en pré-opératoire est un facteur de risque de rechute car il est associé à un envahissement vasculaire et à un statut micro-métastatique. L'intérêt en post-opératoire est également confirmé par plusieurs études : ainsi Sausen et al. (Figure 21) montre sur une cohorte de 101 patients porteurs d'un cancer du pancréas opérable, l'intérêt du taux d'ADNct en post opératoire (détection de 116 gènes au total dont *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* et *SMAD4*) pour anticiper une rechute précoce ($p=0.019$). Le délai médian de diagnostic de la rechute au scanner est de 9.6 mois contre 3.1 mois avec l'ADNct ($p=0.0004$)¹³⁰, le delta moyen était de 6.5 mois ce qui signifie que l'élévation du taux d'ADNct permet de déceler 6.5 mois plus tôt une rechute tumorale.

Figure 21: Patients with detectable ctDNA after surgical resection ($n=10$) were more likely to relapse and die from disease compared with those with undetectable ctDNA ($n=10$).

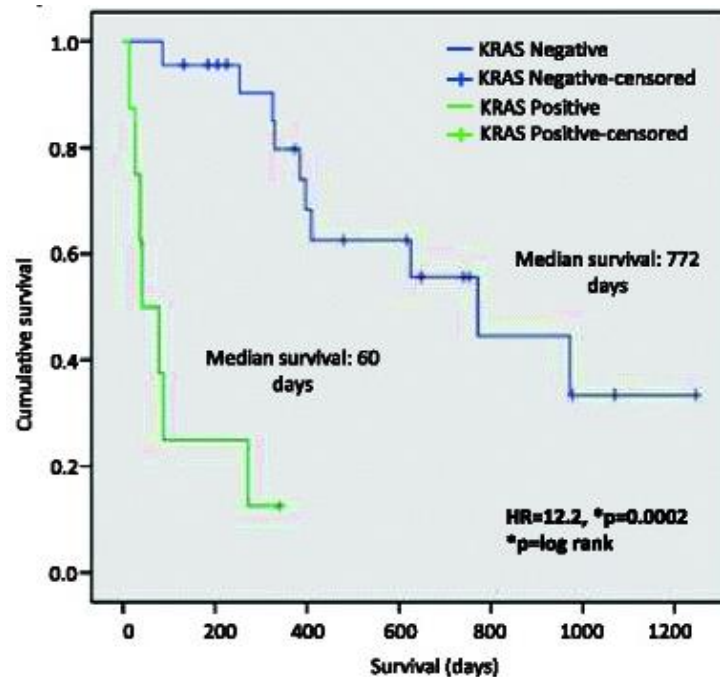


D'après Sausen et al. 2015¹³⁰

Dans l'essai de Takai et al. qui portait sur 259 patients dont 108 opérables¹²², 9 patients avaient une mutation *KRAS* retrouvée dans leur ADNct, dont 5 ont eu une rechute très précoce avec l'apparition de métastases dans les 6 mois post-opératoire.

Enfin l'étude menée par Earl et al. (Figure 22) a inclus 45 patients dont 14 porteurs d'un cancer du pancréas résécable, la SG des patients positifs avant la chirurgie pour la mutation *KRAS* dans le plasma était de 60 jours contre 772 jours en cas d'absence de mutation *KRAS* retrouvée ($p=0.0002$)¹²³.

Figure 22: Kaplan Meier survival analysis of *KRAS* mutation status in plasma cfDNA



D'après Earl J et al. 2015 ¹²³

Enfin de façon très récente, l'étude de D Pietrasz et al.¹³¹ a analysé une cohorte de 31 patients réséqués d'un adénocarcinome pancréatique, permettant de confirmer les données de corrélations entre l'ADNct muté *KRAS* détectable ou non en post-opératoire et la SSR : 4.6 vs 17.6 mois ($p=0.03$) ainsi que avec la SG : 19.3 vs 32.2 mois ($p=0.027$).

Néanmoins ces résultats ont peu d'impact en pratique courante car il n'y a à ce jour aucun protocole validé « d'intensification » de la chimiothérapie adjuvante. De plus il n'y a pas non plus de validation prospective quant à un gain sur le pronostic en cas de début plus précoce de la chimiothérapie en cas de récurrence. L'utilisation de l'ADNct muté *KRAS* en situation adjuvante nécessite donc davantage d'essais prospectifs.

iv. En situation localement avancée et métastatique (non résécable)

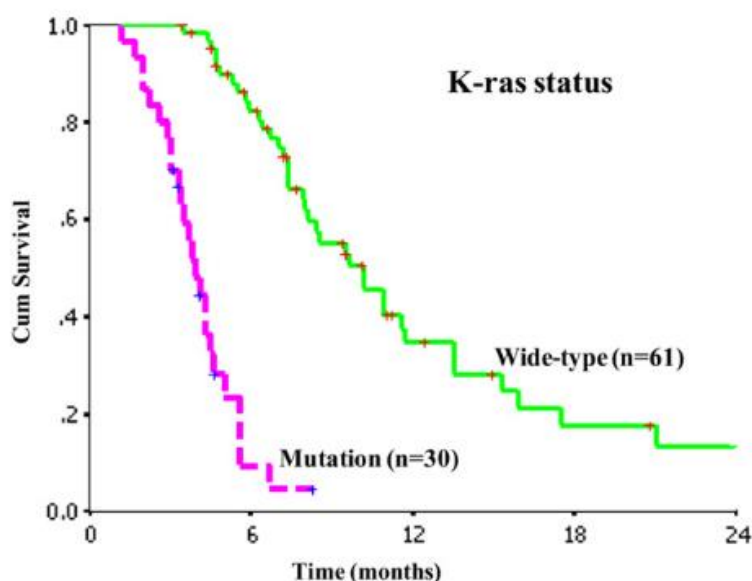
En ce qui concerne les travaux portant sur l'ADN circulant, effectués plus spécifiquement sur l'adénocarcinome du pancréas non résécable, on retrouve à l'heure actuelle une dizaine d'études (Tableau 6).

Les études sur ce sujet débutent en 1993¹³² avec l'idée de comparer le taux de mutations *KRAS* dans le tissu tumoral, les sécrétions pancréatiques (n=10) et le sang (n=8). La population était composée de patients japonais (dont 6 patients contrôles) et la technique utilisée était une PCR de haute sensibilité. Les résultats étaient cohérents à 100% entre les mutations *KRAS* trouvées dans les sécrétions pancréatiques (7 positifs parmi les 7 cancers et 3 négatifs sur les 3 patients contrôles) et sur le tissu tumoral. Les résultats ont permis de confirmer que de l'ADN tumoral circule dans le sang et que la PCR est une technique qui permet une très bonne sensibilité dans la détection des mutations : 2 mutations *KRAS* ont été observées sur les 8 patients pour lesquels du sang périphérique était disponible (dont 2 patients contrôles).

Cinq années plus tard, Mulcahy et al.¹³³ mènent une étude avec 21 patients et deux groupes « contrôles » comportant des patients porteurs d'une pancréatite chronique (PC) et des patients sains. Ils mettent ainsi en évidence par technique de PCR-RFLP (*restriction fragment lenght polymorphisme*) une mutation *KRAS* sur l'ADNct dans 81% des cas dans le groupe adénocarcinome pancréatique (tous non résécables) et 0% pour les groupes contrôles. Ils observent 100% de correspondance avec la recherche de *KRAS* effectuée sur 10 biopsies tumorales.

A partir de 2010, le nombre d'études portant sur l'ADNct augmente très vite. Chen et al. (Figure 23) avec 91 prélèvements sanguins de patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique non résécable sont les premiers à montrer une corrélation entre l'ADNct muté *KRAS* et la classification TNM de la tumeur (p=0.033) et également la présence de métastases hépatiques (p=0.014)¹³⁴. Ils mettent également en évidence une corrélation entre la présence d'une mutation *KRAS* dans l'ADNct et une survie globale plus courte : 10.2 *versus* 3.9 mois (p<0.001).

Figure 23: The Probability of Survival on advanced pancreatic patients with wild-type *KRAS* gene (solid line) or *KRAS* mutations (dashed line) in plasma DNA samples.



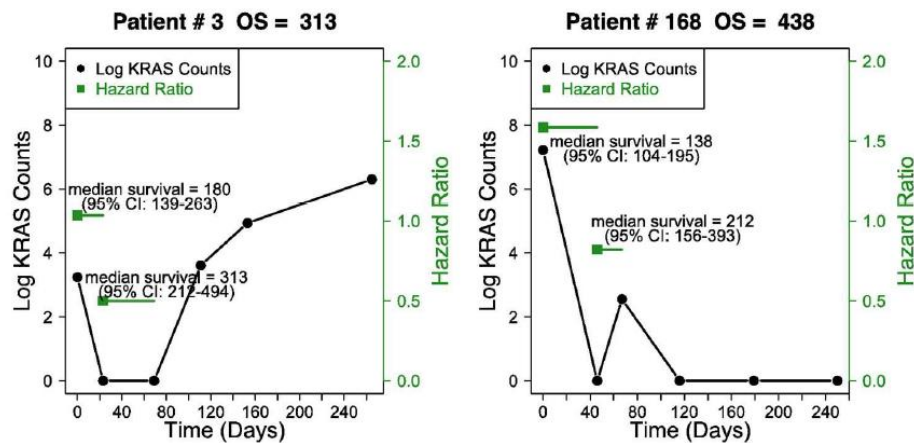
D'après Chen H. et al., 2010 ¹³⁴

Par la suite d'autres études ^{135,136} ont validé le caractère péjoratif de la mutation *KRAS* dans l'ADNct sur la SSP et la SG. Les voies de recherche sont multiples avec des essais portant sur l'apparition de la mutation *KRAS* après pression thérapeutique par des anti-EGFR.

Une des toutes premières études à s'intéresser à la cinétique du taux de mutant *KRAS* dans l'ADNct et en parallèle au taux de CA19-9 est rapportée à Chicago au congrès de l'ASCO en 2015¹³⁷, les données sont peu détaillées mais l'étude est prospective-rétrospective sur 182 patients non résécables (134 métastatiques et 48 LA) traités en 1^{ère} ligne de chimiothérapie par GEMCITABINE ou FOLFIRINOX. Le premier prélèvement avant le début du traitement est effectué à partir des plasmas archivés et la technique utilisée est le NGS. Il est ainsi détecté en *baseline* 81% de mutations *KRAS* codon 12/13 (> 1 copie mutée *KRAS*). L'évaluation de la corrélation entre la présence d'une mutation *KRAS*, le CA19-9 et la SG est faite à l'aide d'un seuil permettant de dichotomiser les résultats : 41 copies mutées pour la mutation *KRAS* et 314 U/ml pour le CA19-9. Ainsi un taux de copies mutées *KRAS* élevé associé à un CA19-9 élevé impactent tous les deux négativement la SG, HR = 3 (95% CI : 2.0 to 4.6) ; tandis que l'ADNct muté *KRAS* fort et le CA19-9 fort *versus* faible pris séparément donnent respectivement des odds ratio à 2.1 (95% CI : 1.5 to 2.8) et 1.8 (95% CI: 1.3 to 2.6). Le suivi du taux d'ADNct *KRAS* muté est effectué avec un prélèvement sanguin fait 2 semaines après la première injection de chimiothérapie. Les résultats semblent montrer grâce à un « modèle temps dépendant »

qu'un tel monitoring permet une évaluation plus précise de la réponse au traitement et est associé de façon prédictive à la survie mais les résultats chiffrés ne sont pas communiqués. Seules les données de deux patients sont extraites sous forme de courbe (Figure 24).

Figure 24 : *Time-dependent model that allows adjustment of estimated patient survival based on the combination of pre-treatment ctDNA KRAS levels and KRAS levels after 2 weeks on first line chemotherapy.*



D'après Johansen et al. 2015¹³⁷

Cette même année 2015, le NGS a été utilisé par Zill et al.¹³⁸ sur une cohorte de 26 patients, comprenant du tissu tumoral et du sang afin de rechercher la mutation *KRAS* (entre autres) sur ces deux sites. Sur la tumeur, 62% de *KRAS* est retrouvé, contre 85% sur l'ADNct cependant sur cet effectif, 9 patients (35%) ne disposaient pas d'assez de matériel tumoral et / ou d'ADN extrait (information non précisée dans l'article) pour permettre une analyse NGS.

Récemment Pietrasz et al.¹³¹, ont analysé une cohorte de patients (n=135) porteurs d'adénocarcinomes pancréatiques localement avancés (n=36) ou métastatiques (n=68), l'analyse sur l'ADN circulant était d'abord faite en NGS (sensibilité à 1%) permettant de détecter différents gènes : *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *NRAS*, *PIK3CA* et *STK11* ; puis une ddPCR (sensibilité à 0.1%) était réalisée à la recherche d'une des trois mutation *KRAS* les plus fréquentes (p.G12V, p.G12D et p.G12R).

48% des patients inclus avaient un ADNct détectable avec au moins une mutation retrouvée et 41.3% présentaient une mutation *KRAS*. Il a été confirmé la corrélation forte entre le taux d'ADNct *KRAS* muté et le grade histologique de la tumeur (peu, moyennement ou bien différencié) avec respectivement $P = 0.036$ et $P = 0.042$, ainsi que son stade localement avancé ou métastatique ($P < 0.001$).

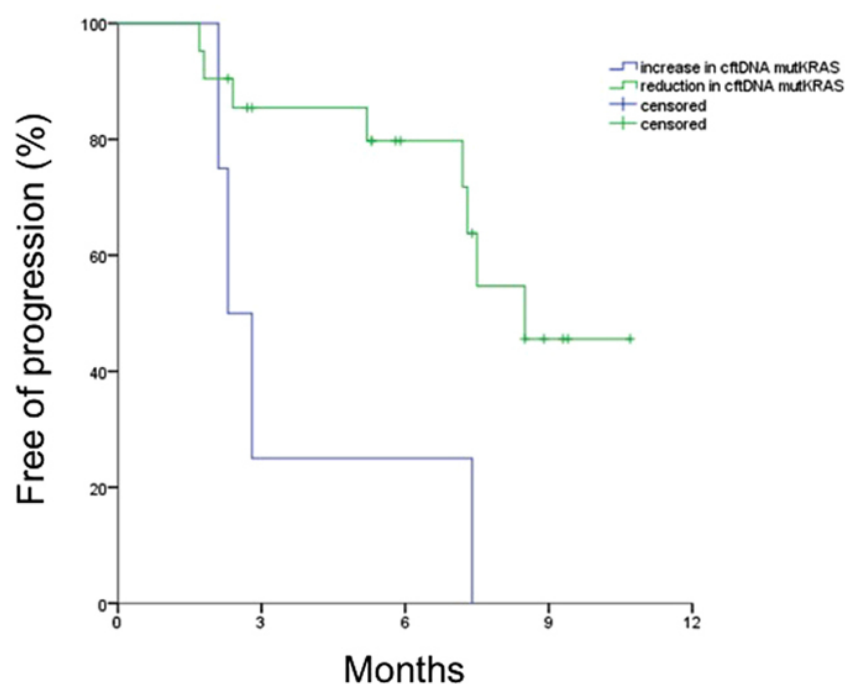
Concernant la SSP, la présence d'ADNct muté *KRAS* était fortement corrélé à une SSP plus courte avec 6.5 *versus* 19,0 mois ($P < 0.001$). L'analyse de la SG a été faite en répartissant les taux d'ADNct (toutes mutations confondues, pas uniquement *KRAS*) en tertiles, il était observé respectivement pour les taux d'ADNct faible, moyen et fort des survies de 18.9, 7.8, et 4.9 mois ($P < 0.001$). Cette association avec la SG restait significative ($HR = 1.96$; $P = 0.007$) en analyse multivariée ajustée sur l'ADNct, l'âge, le sexe et le stade tumoral.

Par ailleurs, cette étude a infirmé l'idée que le type de mutation puisse avoir un impact sur la survie, en 2015 un essai¹³⁹ avait apporté des résultats montrant que la mutation G12V du gène *KRAS* était de plus mauvais pronostic que les autres mutations (219 *versus* 410 jours, $P = 0.006$), cette idée est ici contre dite puisque la SG n'était pas spécifiquement impactée avec en cas de mutation G12V.

De plus il a été effectué une cinétique du taux de *KRAS* dans l'ADNct au cours du traitement pour les patients non résécables, pour 8 patients, 3 à 4 prélèvements ont été faits. Le très faible effectif n'a pas permis de conclure quand à un lien prédictif de réponse à la chimio de la diminution du taux d'ADNct d'autant que pour 4 patients, l'ADNct était indétectable ; cependant cette piste de recherche paraît très intéressante et encore trop peu explorée.

Dernièrement Del Re M et al¹⁴⁰. ont effectué un travail avec 27 patients (4 LA et 23 métastatiques) sur la valeur de la variation du taux d'ADNct muté *KRAS* au cours de la chimiothérapie en effectuant un prélèvement *baseline* (avant la chimiothérapie), un prélèvement à 15 jours de traitement et un prélèvement à chaque évaluation clinique. La ddPCR était la technique utilisée avec en cas de positivité, un contrôle par pyroséquencage permettant également de définir le type de mutation *KRAS*. Le prélèvement *baseline* a rapporté 70.4% de mutation *KRAS* avec des taux allant de 80 à 64 800 copies /mL de plasma. Il n'a pas été retrouvé de corrélation entre la valeur d'ADNct muté *KRAS* en *baseline* et le sexe, l'OMS ou le stade tumoral. Cependant un lien significatif est décrit avec la présence de métastases hépatiques ($P=0.008$) et le taux de CA19-9 ($P=0.011$). Concernant la SSP et la SG, il n'a pas été montré de corrélation avec la présence ou non d'ADNct muté *KRAS* en *baseline* : P respectivement 0.24 et 0.16. La variation observée au J15 (augmentation *versus* stabilisation ou diminution) est significativement liée à la SSP 2.5 vs. 7.5 mois ($P = 0.03$) (Figure 25), il en est de même pour la SG avec 6.5 vs. 11.5 mois ($P = 0.009$).

Figure 25: PFS according to early mut KRAS cftDNA variation (increase vs. reduction).



D'après Del Re et al. 2017¹⁴⁰

Tableau 6 : Principaux travaux portant sur l'ADNct muté *KRAS* et cancer du pancréas non résecable

Auteur	Année	Population	Matériel analysé	Technique	Résultats
Tada et al. ¹³²	1993	n=18, 10 secrétions pancréatiques et 8 sang périphérique, dont 12 AdKC et 6 contrôles	Tumeur, suc pancréatique et sang	PCR	1 mutation ADNct <i>KRAS</i> retrouvée sur tumeur métastatique et 1 sur tumeur LA
Mulcahy et al. ¹³³	1998	n =21, non résécables	Tumeur et sang	PCR-RFLP	81% de mutation <i>KRAS</i> sur l'ADNct, 100% de concordance avec la tumeur

Dabritz et al. ¹³⁶	2009	n= 56 dont 23 inopérables; groupe contrôle n=13	Sang	PCR	36% de mutation <i>KRAS</i> dans l'ADNct, 0% dans groupe contrôle
					Association de l'ADNct muté <i>KRAS</i> et CA19-9 : Se = 91% pour diagnostic de cancer pancréas
Chen et al. ¹³⁴	2010	n=91, non résécables	Sang	PCR puis séquençage	Corrélation ADNct muté <i>KRAS</i> et classification TNM (p=0,033) / et métastases hépatiques (p=0,014)
					Corrélation ADNct muté <i>KRAS</i> et SG courte : 10.2 mois <i>versus</i> 3.9 mois (p<0.001).
Dabritz et al. ¹³⁵	2012	n=38 dont 21 non résécables	Sang	PCR	31% de mutation <i>KRAS</i> sur l'ADNct
					Corrélation avec une progression tumorale au TDM
Johanse n et al. ¹³⁷	2015	n = 182 (134 métastatiques, 48 LA)	Sang	NGS	Corrélation SG, ADNct muté <i>KRAS</i> et CA19-9 (HR=3,0)
Zill et al. ¹³⁸	2015	n=26 dont 18 cancer du pancréas	Tumeur et sang	NGS	23% de bénéfice de l'analyse de l'ADNct car détection d'une mutation non vue sur tissu
Pietrasz et al. ¹³¹	2017	n=135 dont 104 non résécables	Sang	NGS puis ddPCR	Corrélation ADNct <i>KRAS</i> muté et grade histo peu/moyen/bien différencié (P = 0.036 et P = 0.042) et stade M+ ou LA (P < 0.001).

					Corrélation ADNct <i>KRAS</i> muté et SSP (6.5 vs. 19.0 mois ; $P < 0.001$)
Del Re et al. ¹⁴⁰	2017	n = 27 non résécables 4 LA et 23 M+	Sang	ddPCR puis pyroséquencage pour les prélèvements positifs	Corrélation ADNct <i>KRAS</i> muté en baseline avec M+ foie ($P=0.008$) et taux CA19-9 ($P=0.011$) Pas de corrélation SSP ni SG
					Corrélation Δ ADNct <i>KRAS</i> muté au J15 avec SSP : 2.5 vs. 7.5 m ($P = 0.03$), et SG avec 6.5 vs. 11.5 m ($P = 0.009$).

Légende : Δ = variation

Le travail présenté ici a pour objectif d'évaluer l'intérêt de l'ADN circulant total (ADNcf) et de l'ADN circulant muté *KRAS* (ADNct) dans l'adénocarcinome pancréatique localement avancé ou métastatique, donc non résécable. Les analyses effectuées se sont intéressées à la valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie mais également à la valeur pronostique de cet ADN circulant. Plusieurs paramètres de l'ADN circulant ont été évalués : les taux bruts au J1, au J15 et au J28 ainsi que les variations de ces valeurs à 15 jours et à 1 mois.

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE

1) Inclusion des patients

La population de cette étude concerne les patients consécutifs porteurs d'un adénocarcinome pancréatique non résécable, vus en consultation au CHU de Poitiers, au Pôle Régional de Cancérologie, entre mai 2016 et juillet 2017. L'identification des patients s'est faite en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire d'oncologie digestive.

Les critères d'inclusion étaient :

- un adénocarcinome pancréatique prouvé histologiquement
- d'emblée métastatique ou localement avancé, considérés initialement comme inopérables
- chimiothérapie de 1^{ère} ligne proposée
- les patients déjà traités par chirurgie puis chimiothérapie adjuvante présentant une rechute métastatique plus de 6 mois après la fin du traitement étaient également incluables

Les critères d'exclusion étaient

- un traitement déjà reçu par chimiothérapie ou radiothérapie pour le cancer du pancréas non résécable (hors traitement adjuvant)
- un antécédent de cancer dans les 5 ans précédents l'inclusion
- patient mineur
- cancer pancréatique résécable

Une note informative expliquant l'étude (Annexe 2) était remise lors de la consultation d'annonce avec un consentement à signer pour donner leur accord. Après recueil du consentement écrit, les dossiers des patients inclus portaient la mention « *KRASCIPANC* » (*KRAS mutant CIrculating tumor DNA for monitoring response to first line chemotherapy in locally advanced and metastatic PANcreatic Cancer*) sur leur dossier afin de mieux organiser les prélèvements sanguins itératifs. Un exemplaire du consentement était remis au patient et l'original était conservé par le médecin responsable, dans le classeur de l'étude avec le registre des échantillons.

Cette étude a été approuvée par le Comité de protection des personnes (CPP) qui a émis un avis favorable le 23 mars 2016 pour la déclaration de collection d'échantillon « KRASCIPANC ». Les informations recueillies ont été traitées confidentiellement conformément à la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. La Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) a émis un avis favorable pour cette étude. Il a été expliqué au patient via la note informative l'utilisation des prélèvements de sang à des fins de recherche. Les échantillons seront détruits après analyse de l'ADN circulant. Aucune conservation ni autre utilisation n'est prévue.

Tous les patients ont reçu de la chimiothérapie « standard » pour le cancer du pancréas, selon les recommandations actuelles⁶⁸. Leur inclusion dans l'étude n'a en rien changé leur prise en charge diagnostique ni thérapeutique. Au moment de l'inclusion, il a été attribué à chaque patient un code de type « numéro-première lettre du prénom et première lettre du nom » (exemple : 03-CE pour le 3^{ème} patient inclus s'appelant Camille Evrard) afin d'anonymiser les prélèvements.

2) Recueil de données

Les données cliniques suivantes ont été recueillies dans les dossiers médicaux (dossier papier et logiciel Télémaque) : date du diagnostic anatomopathologique, âge au diagnostic, type histologique, localisation tumorale, grade histologique tumoral, localisation et nombre de sites métastatiques et protocole de chimiothérapie prescrit. Les modifications de chimiothérapie ont également été répertoriées : réduction de dose, désescalade thérapeutique, modifications de type de chimiothérapie et modification de ligne à la progression.

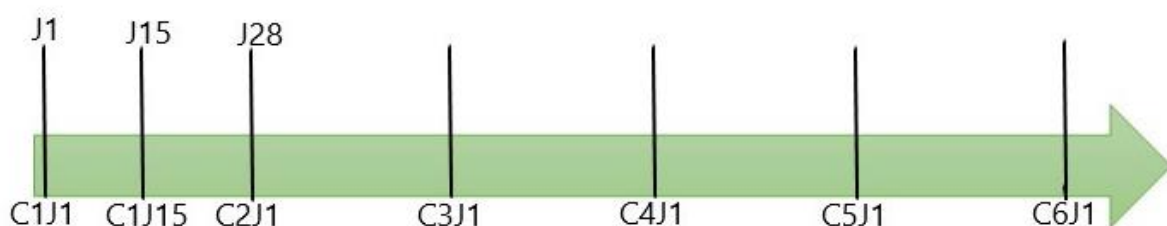
Avant le début du traitement, les données biologiques suivantes étaient recueillies : albumine, LDH et bilirubine car ce sont des marqueurs pronostiques identifiés dans les adénocarcinomes pancréatiques non résécables. En parallèle du recueil pour l'ADN circulant, le dosage des marqueurs ACE et CA 19-9 était effectué en parallèle lors des mêmes prélèvements car ils sont potentiellement prédictifs de la réponse au traitement.

3) Prélèvements sanguins et suivi

Les différents prélèvements sanguins ont été effectués sur la chambre implantable (PAC) avant le branchement de la chimiothérapie. En cas d'absence de PAC ou de défaillance de celui-ci, la collecte de sang était faite sur voie veineuse périphérique, toujours juste avant la chimiothérapie, permettant ainsi de ne pas rajouter de ponctions veineuses supplémentaires aux patients. Trois tubes EDTA de 7ml ont été prélevés à chaque fois, conservés à 4°C puis centrifugés dans les 3 à 4h à 3000 rpm pendant 10min à 4°C. Le plasma ainsi isolé était aliquoté dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml et conservé à -80°C pour un stockage prolongé, en évitant les cycles de congélation / décongélation (recueil en moyenne de 7.5 ml de plasma par patient).

Le schéma de recueil sanguin (Figure 26) était le suivant : cure 1 jours 1 et 15, puis cure 2 jour 1, cure 3 jour 1, cure 4 jour 1, cure 5 jour 1, cure 6 jour 1 et un dernier prélèvement était effectué en cas de non progression à 3 mois de la fin des 6 cures de chimiothérapies (pas de prélèvement s'il y avait eu progression). Au total le patient avait donc 8 prélèvements maximum, les dates étaient flexibles selon les aléas médicaux (fièvre, asthénie, neutropénie...) ou organisationnels du service (traitement décalé de quelques jours en raison de la disponibilité des places...).

Figure 26 : Situation des prélèvements effectués



Légende : J1=J28, 1 cycle = 2 injections

Une évaluation tumorale était faite classiquement à 3 mois et à 6 mois selon la pratique courante de notre centre avec un bilan biologique complet (albumine, bilirubine et LDH) et un scanner thoraco-abdomino-pelvien évalué selon les critères RECIST 1.1.

4) Extraction et dosage de l'ADN circulant

Les différentes analyses moléculaires des prélèvements sanguins ont été réalisées au sein du laboratoire de Cancérologie Biologique (Plateforme labellisée par l'Inca) du CHU de Poitiers. Après recueil des plasmas stockés à -80° , nous avons réalisé une extraction de l'ADN avec le kit « QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit® » (Qiagen, Düsseldorf, Allemagne). Pour cela les plasmas stockés sont décongelés à température ambiante et subissent une deuxième centrifugation (1^{ère} centrifugation lors du recueil de sang total) à 13 200 rpm pendant 10 min afin d'éliminer un maximum de fibrine. L'extraction comporte ensuite quatre étapes (Annexe 3) avec lyse des protéines, lipides et vésicules liées à l'ADN, fixation de l'ADN sur colonnes, lavage puis élution. La technique a été réalisée à deux reprises pour un même prélèvement dans des tubes Falcon de 15 mL, avec utilisation pour une extraction de 2.5 mL de plasma, ajout du tampon de lyse ACL (2.4mL), de protéinase K (300uL) et de 5.6 uL de *RNA carrier* reconstitué ; la solution est vortexée puis mise à incuber 30 minutes au bain marie (60°C). Par la suite le tampon de liaison ACB est ajouté (5.4 mL) avant de laisser refroidir 5 minutes dans de la glace.

L'étape suivante est la fixation de l'ADN sur un système de colonne avec utilisation du *Vac-Man* branché sur le vide mural, le premier passage sert à fixer l'ADN sur les mini colonnes.

Ensuite l'ADN est filtré à plusieurs reprises après ajout de différents tampons de lavage (ACW 1 et 2 puis Ethanol 100%, respectivement 600 uL puis 700 et 700 uL) ; le temps de filtration est variable d'un échantillon à l'autre. A la fin de cette étape de filtration/lavage, les mini colonnes sont placées sur des tubes collecteurs avant de subir une centrifugation (13 200 rpm pendant 3 min) puis une incubation au bain sec (10 minutes à 56°C) après avoir changé les tubes collecteurs.

Enfin l'étape d'élution se fait avec des tubes *Low bind* utilisés pour recueillir l'ADN après ajout de tampon d'élution AVE (55 uL) avant une dernière incubation à température ambiante (3 minutes) puis centrifugation (13 200 rpm pendant 1 minute). Les mini colonnes sont alors jetées et l'ADN est recueilli dans les tubes *Low bind* de 1.5 mL. Avant d'être stocké au -80°C pour leur utilisation prochaine, la concentration des ADN est dosée afin de permettre les calculs pour les manipulations à venir.

A noter que lors de chaque manipulation un contrôle d'extraction était effectué, avec un contrôle positif et un contrôle négatif.

Le dosage de la concentration d'ADN a été fait avec le fluorimètre Quantus[®], il permet une mesure sensible et spécifique des acides nucléiques, en prélevant 2 uL de l'ADN à doser, on y ajoute du tampon TE à 1X[®] (98 uL) et du QuantiFluo dsDNA à 1X[®] (100 uL) avant de laisser incuber 5 minutes à température ambiante puis de réaliser la lecture de la concentration en ng/uL grâce à l'appareil. De la même façon, deux contrôles sont effectués ici, un contrôle blanc et un contrôle dit « Standard » avec l'ADN fourni pour calibrer le lecteur.

5) PCR digitale

a. Réalisation de la manipulation

Après extraction et quantification de l'ADN de chaque prélèvement, la recherche de mutation des gènes *KRAS* était effectuée par droplet digital PCR ou ddPCR (Bio-Rad QX200 Droplet Digital PCR System[®]). Les sept mutations de *KRAS* les plus fréquemment vues en cancérologie étaient recherchées grâce à un kit multiplex, à savoir : G12V (41% des mutations dans les cancers du pancréas dans la littérature¹³¹), G12D (41%), G12R (9.3%), G12C (2.3%), G12A, G12S, et G13D. Cette technique récente est parmi les plus sensibles à ce jour avec un seuil de détection à 0,1% sous réserve de pouvoir déposer initialement environ 10 ng d'ADN par prélèvement ce qui permet la détection de 3 copies d'ADN mutées parmi 3000 copies d'ADN déposées.

Le principe de cette technique repose sur le partitionnement de l'échantillon en de nombreuses gouttelettes lipidiques permettant une répartition aléatoire de l'échantillon et autant de PCR pour un même échantillon, il y a ainsi de 0 à 3 copies d'ADN dans chaque gouttelette. Une loi statistique permet ensuite de connaître la concentration en nombre de copies par millilitres de PCR selon le ratio de gouttelettes positives et négatives, comptées par le lecteur QX200[®] en cytométrie de flux. La loi statistique utilisée est la loi de Poisson, qui est une loi de probabilité discrète basée sur une distribution aléatoire des événements permettant une estimation fine de la quantité initiale de cibles présentes dans l'échantillon de départ.

Pour réaliser la manipulation, on dépose dans des barrettes de micro tubes, 11 uL de mix contenant 10 uL de ddPCR supermix pour sondes (no UTP) et 1 uL de *KRAS* multiplex primers/probes (FAM et HEX) et 9 uL de l'échantillon d'ADN, pour un total de 20 uL par puit.

Les échantillons sont ensuite transférés, avec une pipette multicanaux, délicatement, dans les cartouches où l'on dépose en parallèle de l'huile afin de pouvoir générer les gouttelettes lipidiques de partitionnement grâce au générateur de gouttelettes. Les gouttelettes contenant l'ADN sont prélevées avec précaution (risque de déformation) et déposées sur la plaque 96 puits (Figure 27), les manipulations se font par colonnes, avec pour chaque prélèvement, 2 à 3 puits selon la concentration initiale en ADN (dosée au Quantus) puis la plaque est scellée pour subir un thermocyclage (40 cycles, 1h56min).

Figure 27 : Transfert des gouttelettes générées de la cartouche vers la plaque 96 puits à l'aide d'une pipette multicanaux.



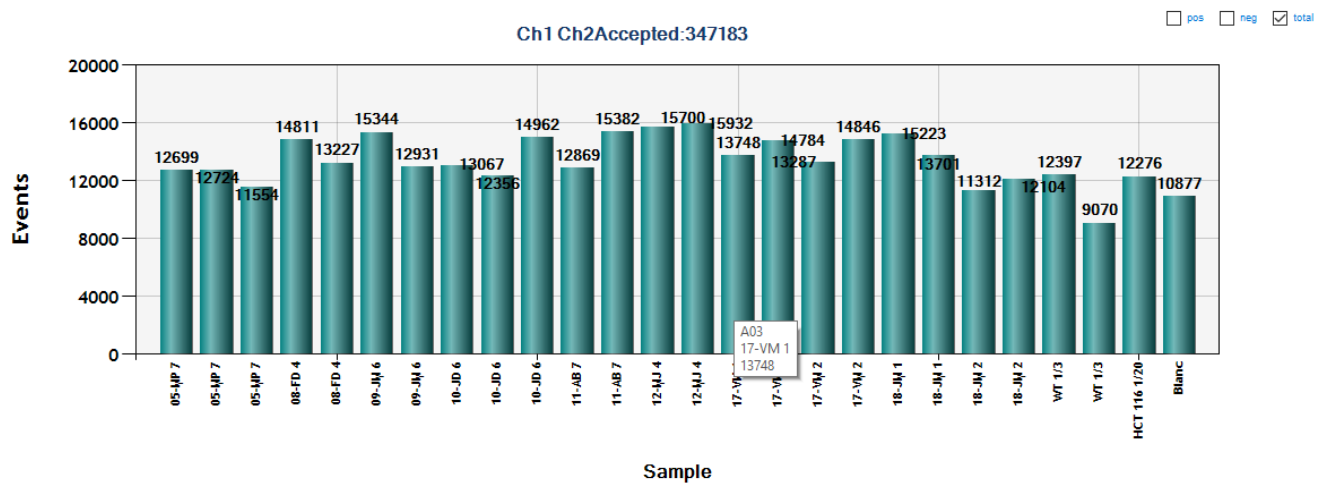
Enfin la dernière étape consiste en la lecture de la ddPCR par le lecteur de gouttelettes QX200® (durée de lecture proportionnelle au nombre de puits utilisés). A la fin du run, les fichiers .*bkp* et .*q/p* sont transférés pour utilisation avec le logiciel adapté : Quanta Soft®.

A noter que lors de chaque ddPCR, il est réalisé au minimum 1 puit Blanc, 1 puit muté *KRAS* (utilisation de la lignée cellulaire *HCT 116*) et 2 puits d'échantillon *wild type*, permettant ainsi un contrôle de la qualité interne de la manipulation (Annexe 4).

b. Validation biologique de la ddPCR

La validation biologique se fait avec le logiciel Quant Soft® et débute par le contrôle du nombre de gouttelettes générées (ou *Events*) qui est un gage de qualité de la manipulation (Figure 28), celui-ci doit être supérieur à 10 000 par puits, si ce n'est pas le cas, cela signifie que les gouttelettes ne se sont pas correctement formées, le puit est alors annulé, les résultats ne peuvent pas être retenus.

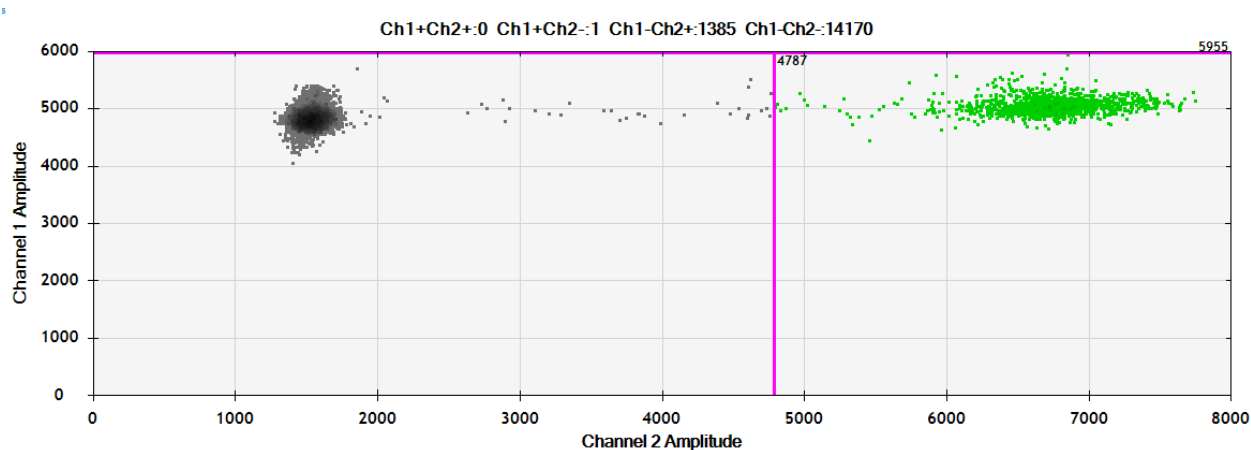
Figure 28 : Contrôle du nombre de gouttelettes générées ou « *Events* »



Légende : 1 puit à 9070 gouttelettes qui ne pourra donc pas être pris en compte pour l'analyse.

Par la suite, l'échantillon blanc est contrôlé, puis les deux puits de *wild-type* (Figure 29) dans le mode *2D amplitude* avec positionnement des barres de séparation : barre horizontale pour séparer les gouttelettes d'ADN sauvage et muté et barre verticale pour séparer les gouttelettes vides de celles contenant de l'ADN sauvage.

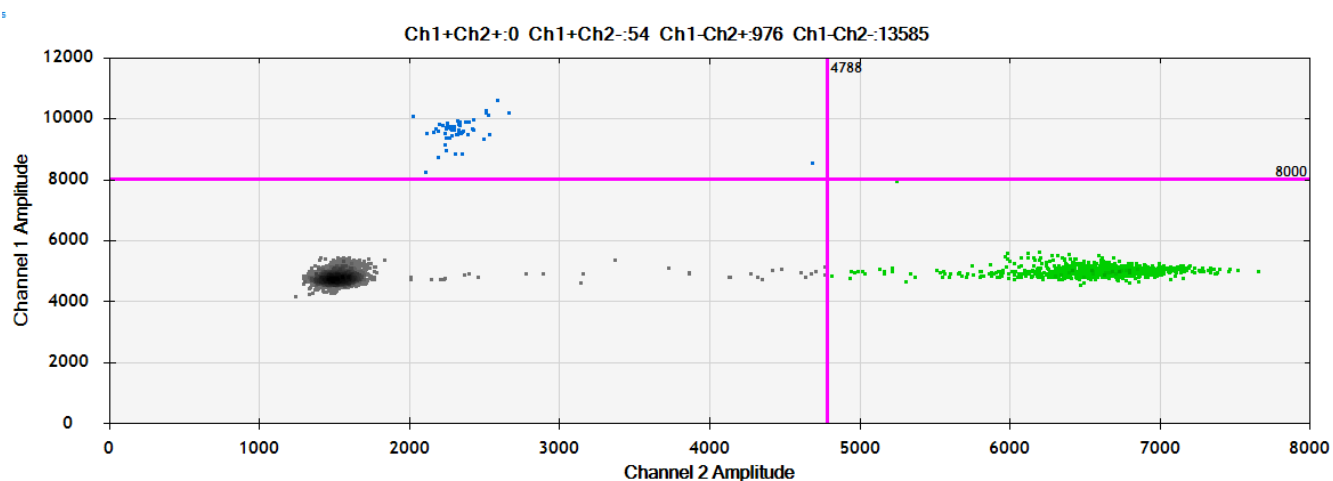
Figure 269 : Configuration des bornes sur l'échantillon "*wild-type*" en mode *2D amplitude*



Légende : les gouttelettes vides sont représentées par le nuage de gouttelettes grises (à gauche), le nuage vert représente les gouttelettes *wild-type* (à droite). On définit ici une barre verticale à 4787 et une barre horizontale à 5955.

On rentre ensuite dans le logiciel la moyenne de ces barres verticales et horizontales définit sur les puits *wild-type* pour analyser les puits contenant les échantillons des patients. Avant cela on valide un dernier paramètre de contrôle de qualité de la manipulation avec les puits de lignée cellulaire mutée *HCT116* (Figure 30) qui doivent mettre en avant des gouttelettes contenant de l'ADN muté *KRAS*, bleues sur le schéma, c'est le « contrôle positif ».

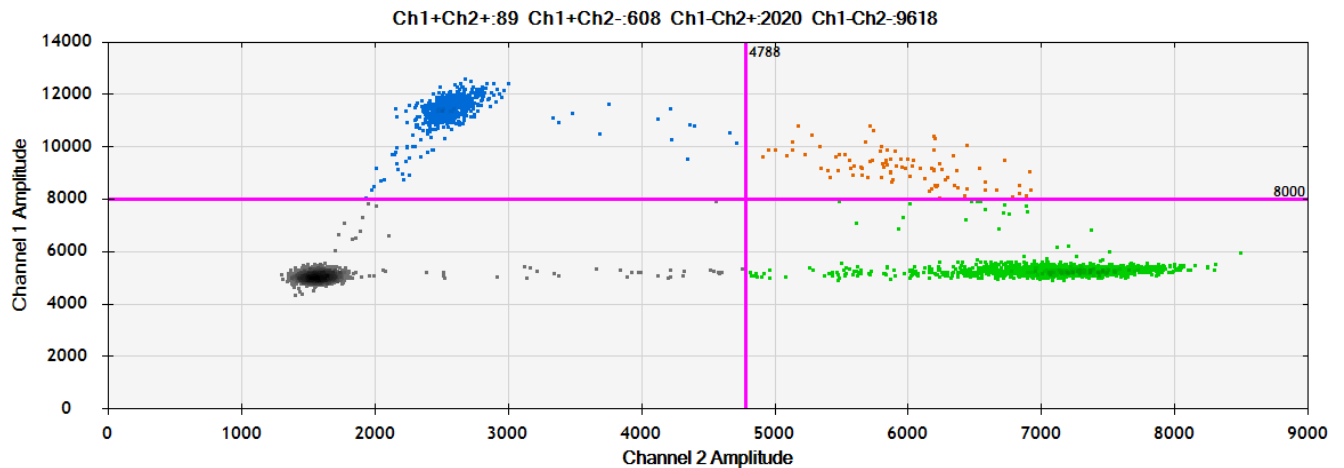
Figure 30 : Exemple de contrôle muté "*HCT 116*" en mode *2D amplitude*



Légende : Apparition d'un nuage de gouttelettes bleues, contenant de l'ADN muté *KRAS*, situé en haut à gauche du graphique.

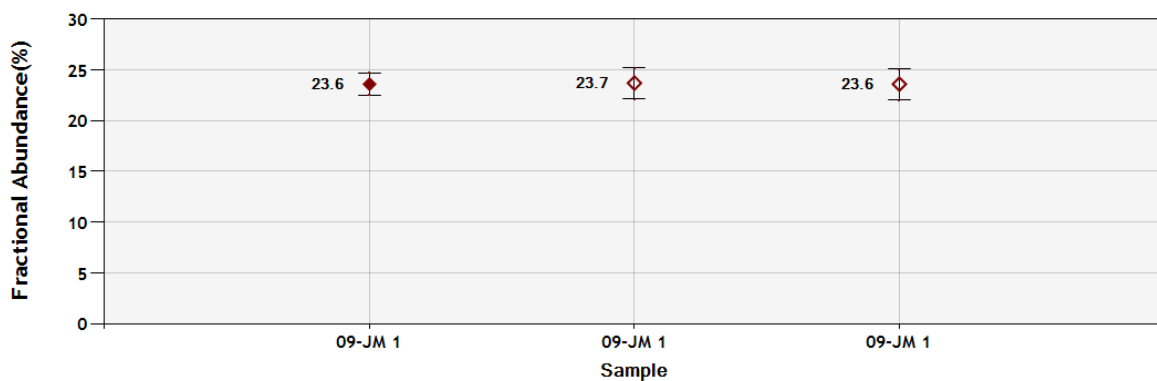
L'étude se fait puit par puit en mode *2D amplitude* pour observer le nombre de gouttelettes et leur répartition (Figure 31), l'analyse porte également sur le ratio de billes sauvages et mutées (Figure 32).

Figure 31 : Exemple d'un puit de patient muté *KRAS* en mode *2D amplitude*



Légende : les billes oranges en haut à droite du graphique représentent les gouttelettes contenant de l'ADN muté *KRAS* et de l'ADN sauvage.

Figure 32 : Exemple avec les deux puits du même patient que sur la figure 31, en mode Ratio (de gauche à droite : « *Both* » puis puits n° 1 et n°2)



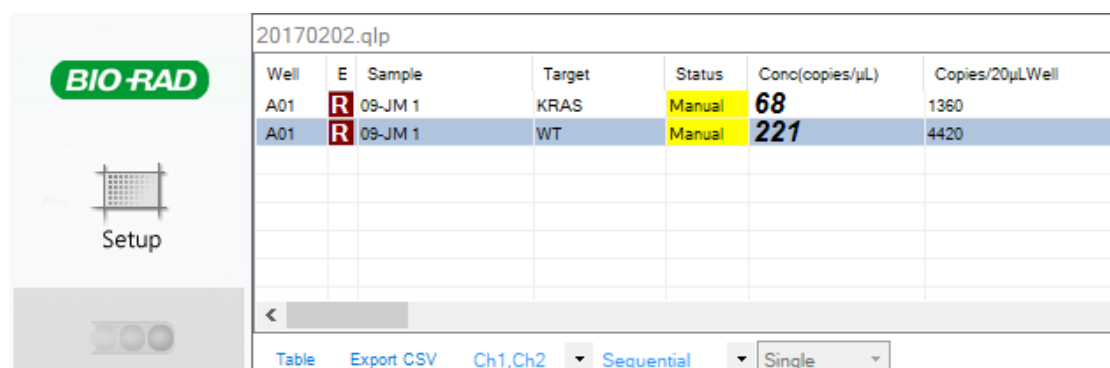
Légende : premier prélèvement du patient 09-JM, le ratio de gauche représente la fréquence allélique mutée des deux puits combinés ou *Both* (23.6%), les deux autres chiffres sont les valeurs puits par puits.

Grâce au logiciel Quanta Soft®, après la ddPCR, il est possible de calculer la quantité d'ADN total (ADNcf) analysée par puit (Figure 33), qui est superposable aux valeurs obtenues par le fluorimètre Quantus (Annexe 5), ainsi que le nombre de copies mutées *KRAS* également

par puit. Les résultats d'ADNcf sont donnés pour la suite de ce travail de façon hétérogène d'après la mesure obtenue par le dosage avec le Quantus.

Au final les valeurs sont exprimées pour l'ADNcf en ng/mL de plasma et pour l'ADNct muté *KRAS*, les données sont analysées en nombre de copies mutées *KRAS* /mL de plasma ou en fréquence allélique mutée donc en pourcentages par rapport à l'ADN total analysé. La sensibilité de la technique de PCR digitale utilisée est de 0.1% ce qui correspond à la détection de 1 cellule mutée *KRAS* parmi 1000 copies *wild-type*, ceci sous réserve d'avoir analysé au moins 10 ng d'ADN par prélèvement (donc en cumulant les 2 ou 3 puits réalisés). Il faut noter que 10 ng d'ADN équivaut à environ 3000 copies de génome, ainsi un résultat est donné positif si l'on détecte au moins 3 copies mutées.

Figure 33 : Exemple de résultat de la quantité analysée d'ADN total et muté *KRAS* pour un puit.



Well	E	Sample	Target	Status	Conc(copies/μL)	Copies/20μLWell
A01	R	09-JM 1	KRAS	Manual	68	1360
A01	R	09-JM 1	WT	Manual	221	4420

Légende : la ligne *KRAS* correspond au nombre de copies mutées *KRAS* observées dans les 20 uL du puit. Pour obtenir le nombre de copies d'ADN total analysées dans le puit, on additionne l'ADN *KRAS* et l'ADN sauvage (*WT*) (ici 1360 et 4420).

A noter que pour 4 patients pour lesquels l'ADNct muté *KRAS* était négatif tout au long des 6 mois de suivi, il a été réalisé une extraction de l'ADN directement sur le tissu tumoral puis une ddPCR, afin de comparer ADN circulant et ADN tumoral.

6) Analyse statistique

Une inclusion de 180 patients est nécessaire pour déterminer avec précision la valeur prédictive de la diminution de l'ADNct *KRAS* muté pour prédire le contrôle précoce de la maladie sous chimiothérapie.

La détermination de l'effectif repose sur l'estimateur de variance de Hanley [Hanley JA and McNeil BJ. *The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. Radiology* 1982 ; 143 : 29-36.]. Avec un contrôle de la maladie d'environ 60% à 3 mois, un niveau de confiance de 95%, un effectif de 140 patients est nécessaire pour assurer une précision de 4% au voisinage de 80% d'AUC (*area under the curve*).

En prenant en compte l'hétérogénéité des patients (schéma de chimiothérapie) et ceux sans ADNct *KRAS* muté détectable ($\approx 25\%$), l'effectif nécessaire pour calculer avec précision la performance de l'ADNct *KRAS* muté pour prédire le contrôle de la maladie est de 180 patients.

a. Méthodes statistiques employées

En l'absence de donnée dans la littérature concernant la valeur prédictive de l'ADNct pour prédire la réponse à la chimiothérapie dans les adénocarcinomes pancréatiques un calcul d'effectif n'est pas possible. Il s'agit donc d'une étude pilote où tous les patients consécutifs ont été inclus prospectivement sans limite de nombre.

L'analyse du critère de jugement principal repose sur les analyses de la survie sans progression selon la méthode de Kaplan Meier et le test du Logrank.

Toutes les caractéristiques de la population sont décrites sur la population globale. Les variables seront décrites en utilisant les statistiques habituelles :

- pour les variables quantitatives : moyenne, écart-type, médiane, interquartile et extrêmes.
- pour les variables qualitatives : fréquences et pourcentages.

Pour chaque comparaison, une valeur de P inférieure à 0,05 sera considérée comme significative. Tous les tests poseront une hypothèse bilatérale. Les courbes de survie (SG, SSP) seront estimées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. La description sera effectuée à l'aide de la médiane et des taux estimés à différents moments. La date des dernières nouvelles était

le 31 juillet 2017. La survie sans progression (SSP) était calculée pour chaque ligne chimiothérapie à partir de la date du premier jour de traitement. Les évènements pris en compte pour la SSP étaient le décès ou la progression selon les critères RECIST 1.1. Les patients vivants ou sans progression à la date des dernières nouvelles étaient censurés. La survie globale était définie par la survie des patients depuis la date de diagnostic. Le décès était pris en compte quelle que soit la cause. Les patients vivants à la date des dernières nouvelles étaient censurés.

Le temps de suivi sera estimé par la méthode de Kaplan-Meier inversée. La recherche de facteurs prédictifs de SG et SSP seront recherchés en analyse univariée par un test du Logrank. Toutes les variables avec un $P < 0,10$ seront analysées dans un modèle multivarié de Cox. Les analyses seront réalisées avec les logiciels Statview et SAS version 9.4 ou ultérieure.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

1. Caractéristiques des patients et des traitements

Cette étude prospective unicentrique a inclus 28 patients (Tableau 7) de mai 2016 à juillet 2017 au CHU de Poitiers (Pole Régional de Cancérologie), tous porteurs d'un adénocarcinome pancréatique, localement avancé ou métastatique, non opérable en première intention, relevant d'une première ligne de chimiothérapie. La population était composée de 15 femmes et 13 hommes, l'âge médian au diagnostic était de 65,1 ans avec un état général globalement bon, 24 patients sur 28 (85,7%) étaient OMS 0 ou 1.

Sur le plan tumoral, à l'inclusion, la population était composée de 11 tumeurs localement avancées (39,3%) et 17 tumeurs métastatiques (60,7%). Concernant les grades histologiques, il y avait 5 tumeurs bien différenciées (17,8%), 14 tumeurs moyennement différenciées (50,0%) et 9 peu différenciées (32,2%).

Parmi les 17 patients métastatiques, 14 patients étaient porteurs de métastases synchrones tandis que 3 ont développé des lésions secondaires métachrones après chirurgie et chimiothérapie adjuvante par GEMZAR avec un délai médian de 6,9 mois après la fin de la chimiothérapie adjuvante (respectivement 5,7, 6,9 et 17,8 mois. Le nombre de sites métastatiques médian était de 2. Les métastases hépatiques concernaient 14 patients sur les 17 soit 82,4% alors que les métastases pulmonaires n'étaient présentes que chez 5 patients (29,4%). La carcinose péritonéale concernait 7 patients soit 41,2%.

Sur le plan biologique, au diagnostic, le taux d'albumine médian était de 40 g/L avec pour la plupart des patients ($n = 21/28$) des valeurs supérieures à 35 g/L. La bilirubine totale était supérieure à 1,5N chez 7 patients (le CA 19-9 était alors ininterprétable du fait de la cholestase) et les LDH étaient initialement élevés (> 460 UI/L) chez seulement 3 patients. Les marqueurs tumoraux initiaux ont montré un ACE anormal chez seulement 3 patients sur les 28 (10,7%) avec une médiane de 3,9 ug/L (1,3-215). Au contraire le CA 19-9 était anormalement élevé pour 22 patients sur 28 (78,6%) mais seulement chez 15 patients (53,6%) après exclusion des 7 sujets porteurs d'une cholestase initiale avec une bilirubine supérieure à 1,5N (augmente faussement le taux de CA 19-9).

Les chimiothérapies de 1^{ère} ligne réalisées étaient principalement le protocole FOLFIRINOX ($n = 18$ soit 64,3%) puis GEMZAR-ABRAXANE ($n = 4$ soit 14,3%) puis GEMZAR seul et FOLFOX, pour 3 patients chacun (soit 10,7%).

Tableau 7 : Caractéristiques des patients et des tumeurs

Population, n=28	
Sexe	
Homme	13 (46,4%)
Femme	15 (53,6%)
Age médian (min max) en années	65,1 (37,4-82,1)
OMS	
0-1	24 (85,7%)
≥ 2	4 (14,3%)
Stade tumoral	
Localement avancé	11 (39,3%)
Métastatique	17 (60,7%)
Localisation	
Tête	12 (42,9%)
Corps	7 (25%)
Queue	3 (10,7%)
Multiple*	6 (21,4%)
Grade de différenciation	
Bien	5 (17,8%)
Moyennement	14 (50%)
Peu	9 (32,2%)
Biologie	
Albumine médiane (min max) en g/L	40 (22,1-47)
Albumine > 35 g/L	21 (75%)
Bilirubine totale > 1,5N (N=17 umol/L)	7 (25%)
LDH > N sup (N=460) en UI/L	3 (10,7%)
ACE	

Médian (min max) en ug/L	3,9 (1,3-215)
Supérieur à 3,8 ug/L (=N)	6 (21,4%)
CA 19-9 (n = 21)	
Médian (min max) en U/mL	1307 (4,5-474600)
Supérieur à 27 U/mL (=N)	22 (78,6%)
Chimiothérapies de 1^{ère} ligne métastatique	
Folfirinox	18 (64,3%)
Gemzar-Abraxane	4 (14,3%)
Gemzar seul	3 (10,7%)
Folfox	3 (10,7%)

Légende : * les tumeurs dites « multiples » sont celles situées sur deux parties du pancréas (corporéo-caudale par exemple).

Lors de la première évaluation de la réponse tumorale (faite à 2 mois pour 6 patients plus à risque de mauvaise tolérance du traitement et à 3 mois pour les autres patients), seulement 19 des 28 patients avaient des données disponibles en raison de 6 décès précoces (avant la première imagerie) et de 3 patients qui n'avaient pas encore atteint cette date. Il a été observé 4 réponses partielles (21%), 11 maladies stables (58%) et 4 progressions tumorales (21%).

Au moment de l'analyse des données (date des dernières nouvelles le 31/07/2017), 17 patients sur les 28 avaient progressés (60,7%) avec une SSP médiane de 5,4 mois. Par ailleurs, 46,4% des patients (13 sur 28) étaient décédés et la SG médiane était de 8,3 mois.

2. Taux d'ADN circulant au diagnostic

Concernant l'ADNcf (ou ADN total) au diagnostic (Annexe 5), avant tout traitements, le calcul via le logiciel de ddPCR retrouvait un taux médian ($\pm$ SD) d'ADNcf de 10.98 ($\pm$ 33,41) ng/mL de plasma (min = 2,44 ; max = 139,40) et le dosage par le Quantus : 14.40 ($\pm$ 32,57) ng/mL de plasma (min = 5,20 ; max = 119,10). On confirme donc bien que ces valeurs sont superposables, pour la suite du travail, les données seront exprimées uniquement selon le dosage au Quantus.

De l'ADNct muté *KRAS* (Annexe 5) était initialement détectable chez 18 des 28 patients (soit 64,3%), avec une médiane ($\pm$ SD) de 0,26% ($\pm$ 7,56) en fréquence allélique plasma (min = 0,00 ; max = 29,80), soit en nombre de copies : 7,68 ($\pm$ 2595,14) copies mutées *KRAS*/mL de plasma (min = 0,00 ; max = 12624,00).

Parmi les patients dont le suivi de 6 mois est terminé ($n=20$), pour 4 patients il n'a jamais été observé d'ADNct muté *KRAS* (au cours des 6 mois de monitoring), pour ceux-ci, la recherche de mutation *KRAS* a été également faite sur le tissu tumoral par ddPCR. Il a été retrouvé 3 patients positifs pour la mutation *KRAS* sur l'ADN extrait à partir du tissu tumoral alors que la mutation n'était pas vue sur l'ADN plasmatique.

3. Corrélations entre les caractéristiques tumorales et les taux d'ADN circulant

Les données concernant les liens entre l'ADN circulant et les caractéristiques tumorales sont résumées dans le Tableau 8.

Concernant le grade histologique de la tumeur, il n'a pas été observé de corrélation avec l'ADNcf initial ($P = 0,22$) mais il existe une tendance entre un ADNct muté *KRAS* initialement élevé et un grade histologique tumoral peu différencié ($P = 0,07$ en FA et en nombre de copies).

Le caractère localement avancé ou métastatique de la tumeur n'est pas corrélé avec l'ADNcf initial ($P = 0,49$). Cependant il existe un lien significatif entre l'ADNct muté *KRAS* élevé au moment de la première administration de chimiothérapie et le stade métastatique (plutôt que localement avancé) (respectivement $P = 0,007$ et $P = 0,02$ en fréquence allélique et en nombre de copies mutées *KRAS*).

Le nombre de sites métastatiques n'est relié ni au taux d'ADNcf ($P = 0,19$) ni au taux d'ADNct muté *KRAS* ($P = 0,12$ en FA). La présence de métastases hépatiques n'influence pas le taux d'ADNcf, mais il existe une tendance avec le taux d'ADNct muté *KRAS* (P à 0,07 en fréquence allélique et P à 0,05 en nombre de copies mutées *KRAS*). Un taux élevé d'ADNct muté *KRAS* est synonyme de présence de métastases hépatiques.

Enfin un taux de 19-9 élevé est fortement corrélé à un ADNcf initial élevé ($P = 0,0008$), il en est de même pour l'ADNct muté *KRAS* en fréquence allélique et en nombre de copies mutées (respectivement $P = 0,0009$ et $P = 0,001$).

Tableau 8 : Caractéristiques tumorales et ADNcf/ADNct initiaux

	Corrélation ADNcf		Corrélation ADNct en FA		Corrélation ADNct en NC	
	Oui/Non	<i>P value</i>	Oui/Non	<i>P value</i>	Oui/Non	<i>P value</i>
Grade histologique	Non	0,22	Tendance	0,07	Tendance	0,07
LA / Métastatique	Non	0,49	Oui	0,007	Oui	0,02
Nombre de sites M+	Non	0,19	Non	0,12	Non	/
M+ hépatiques	Non	0,54	Tendance	0,07	Tendance	0,05
Marqueur CA 19-9	Oui	0,0008	Oui	0,0009	Oui	0,001

LA : localement avancé ; M+ : métastase ; FA : fréquence allélique ; NC : nombre de copies mutées

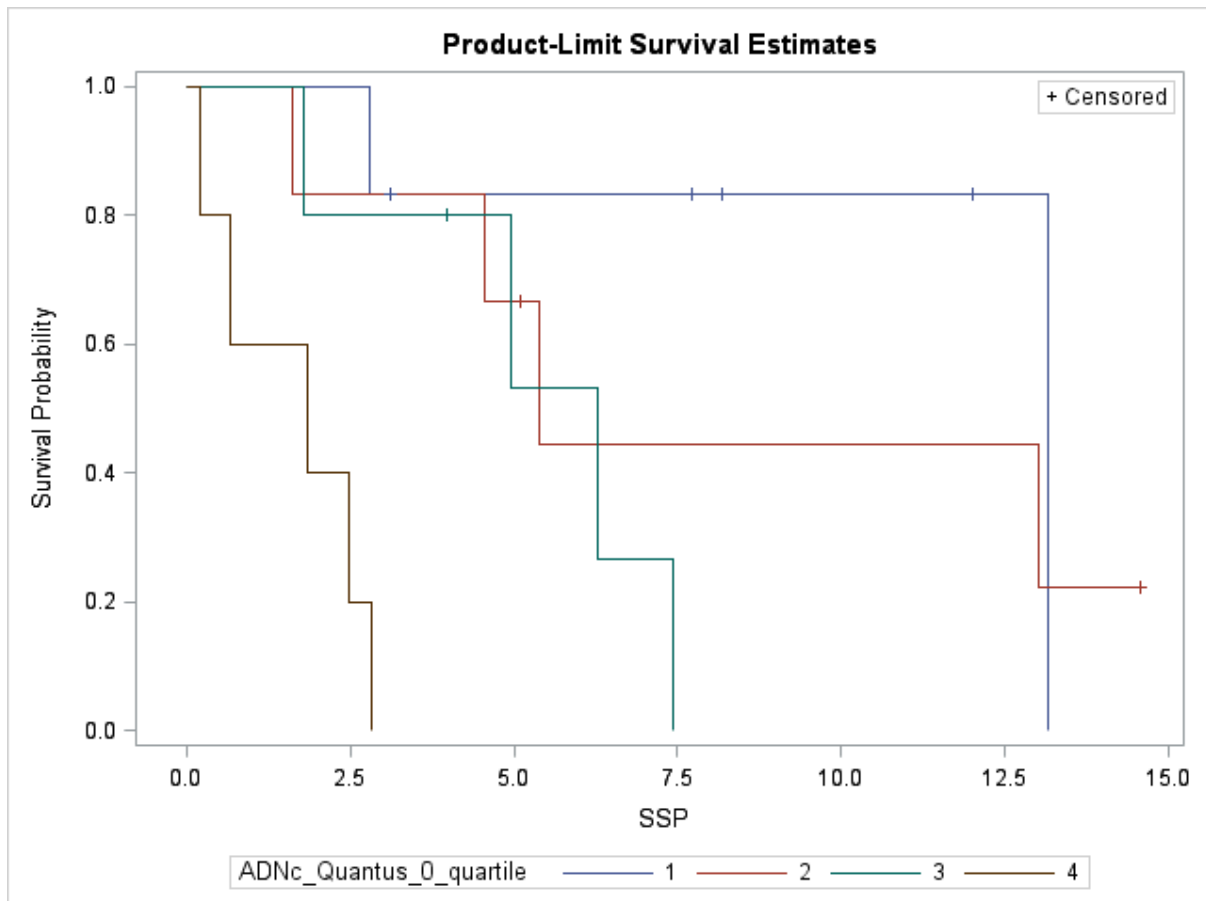
4. Impact prédictif de réponse à la chimiothérapie des taux initiaux d'ADN circulant.

Les patients étaient évalués de façon classique par un scanner thoraco-abdomino-pelvien à 3 mois, la réponse tumorale était donnée selon les critères RECIST 1.1 et classée en réponse partielle, stabilité ou progression. Les valeurs initiales d'ADNcf ne sont pas corrélées de façon significative à la réponse tumorale évaluée à trois mois au scanner ($P = 0,12$) (Tableau 9). L'ADNct muté *KRAS* n'est pas non plus corrélé à cette réponse tumorale : ni le caractère « détectable ou non » de la mutation *KRAS* sur l'ADN circulant ($P = 0,17$) ni le taux initial d'ADNct muté *KRAS* ($P = 0,84$).

En analyse univariée, concernant la SSP, on observe une tendance à la corrélation avec certains paramètres biologiques. Ainsi un taux d'albumine faible montre une tendance à une SSP plus courte ($P = 0,055$), à l'inverse un taux de bilirubine élevé au diagnostic est associé à une SSP courte ($P = 0,069$). Le stade de la maladie « localement avancé » ou « métastatique » n'est pas corrélé avec la SSP ($P = 0,085$). En revanche, le taux d'ADNcf initial est fortement corrélé à la SSP ($P = 0,0023$) : un taux élevé d'ADNcf est significativement lié à une SSP raccourcie. Lorsque l'on divise les taux d'ADNcf initiaux en quartiles, la corrélation avec la SSP

médiane persiste (P à 0,0005) et le groupe 4 qui possède le plus haut taux d'ADNcf au diagnostic se détache clairement des autres groupes avec une SSP médiane très courte (1,8 mois). Les autres groupes (1, 2, 3) ont une SSP médiane respectivement de 13,2, 5,4 et 6,3 mois (Figure 34).

Figure 34 : SSP médian selon le taux d'ADNcf au diagnostic (en quartiles)



Concernant l'ADNct muté *KRAS*, le caractère initialement détectable ou non de celui-ci n'est pas corrélé à la SSP ($P = 0,20$), les taux d'ADNct muté *KRAS* ne montrent qu'une simple tendance à l'association avec la SSP ($P = 0.088$).

En analyse multivariée seul l'ADNcf reste prédictif de la SSP (P à 0,016). Les autres variables ne sont plus associées à la SSP.

5. Impact pronostic des taux bruts d'ADN circulant et de leurs variations.

En analyse univariée (Tableau 9), une SG courte est corrélée fortement à un taux élevé de bilirubine ($P = 0,0078$) et il y avait une tendance similaire pour le taux de LDH ($P = 0,07$). Il n'a pas été observé de corrélation avec le stade localement avancé ou métastatique. Un fort taux d'ADNcf initial (avant la première chimiothérapie) est fortement associé à une réduction de la SG ($P = 0,0007$). En analyse multivariée l'ADNcf reste prédictif de la SG (P à 0,007).

Le caractère initialement détectable ou non de l'ADNct muté *KRAS* n'est pas associé de façon significative à la SG ($P = 0,097$). En revanche un taux élevé d'ADNct muté *KRAS* avant le début de la chimiothérapie, en fréquence allélique ($P = 0,023$) et en nombre de copies mutées ($P = 0,045$) est corrélé à une SG plus courte. Le taux brut d'ADNct muté *KRAS* au J15 est associé de façon significative à la SG ($P = 0,0057$) : un taux élevé est corrélé avec une SG plus courte.

A noter que les variations du taux d'ADNct muté *KRAS* au J15 ne sont pas corrélées à la SG, ni en prenant la valeur de la variation ($P = 0,77$) ni en répartissant les patients selon que leur taux augmente ou est stable/baisse ($P = 0,24$).

Tableau 9 : P value en analyse univariée

	SSP	SG	Réponse à 3M
Albumine	0,05*	0,55	/
Bilirubine totale	0,07*	0,008*	/
LDH	0,28	0,07*	/
Stade LA / M+	0,085*	/	/
ADNcf initial	0,0023*	0,0007*	0,12
ADNct : muté <i>KRAS</i> ou <i>WT</i>	0,20	0,09	0,17
Taux d'ADNct muté <i>KRAS</i> initial en FA	0,088	0,023	0,84
Taux d'ADNct muté <i>KRAS</i> au J15 en FA	< 0,0001	0,0057	/

LA : localement avancé ; M+ : métastase ; FA : fréquence allélique ;

* : variables prises en compte dans le modèle multivarié

6. Impact prédictif de réponse à la chimiothérapie des variations des taux d'ADN circulant total (ADNcf)

Le taux d'ADNcf initial (avant la première chimiothérapie) est corrélé à la SSP ($P = 0,0023$) (Tableau 10). Le dosage au deuxième prélèvement (avant C1J15, $n=23$) n'est pas significatif avec la SSP ($P = 0,57$), alors que le dosage effectué à 1 mois (avant C2J1, $n=22$) était significativement corrélé à la SSP ($P = 0,004$), un taux d'ADNcf faible à 1mois est associé à une SSP améliorée.

L'analyse dynamique du taux d'ADNcf entre le J1 et le J15 a pu être réalisé sur 23 des 28 patients (3 patients sont décédés précocement, 1 prélèvement n'a pas été fait au C1J15 et 1 patient n'a pas encore réalisé sa 2^{ème} cure de chimiothérapie). Sur les 23 patients analysés, on a observé 17 (73,9 %) patients avec une majoration du taux d'ADNcf et seulement 6 (26,1 %) avec une décroissance de ce taux d'ADNcf. La variation du taux d'ADNcf au J15 n'est pas statistiquement associée à la réponse tumorale à trois mois, on observe uniquement une tendance ($P = 0,081$). Cette même variation n'est pas non plus corrélée à la SSP ($P = 0,76$).

L'analyse de la variation du taux d'ADNcf entre le J1 et le J28 a pu être réalisée sur 22 des 28 patients avec seulement 4 patients (soit 18,2 %) ayant eu une diminution de ce taux d'ADNcf entre le J1 et le J28, et la majorité des patients ($n = 18$ soit 81,8 %) ayant présenté une majoration du taux. Il n'a pas été observé de relation significative entre l'évolution du taux d'ADNcf entre le J1 et le J28 et la réponse tumorale à trois mois ($P = 0,52$). En revanche, une majoration du taux d'ADNcf entre le J1 et le J28 tend à être associée à une SSP plus courte ($P = 0,067$).

Tableau 10 : Valeurs pronostique et prédictive du taux d'ADNcf

ADNcf (ADN total)	Corrélation avec la réponse et la survie	<i>P value</i>
Valeur brute initiale (C1J1)	SSP	0,0023
	SG	0,0007
	Réponse 3M	0,12
Valeur brute au C1J15	SSP	0,57
Valeur brute au C2J1	SSP	0,004
Variation J1 - J15	Réponse 3M	0,081
	SSP	0,76
Variation J1 - J28	Réponse 3M	0,52
	SSP	0,067

7. Impact prédictif de réponse à la chimiothérapie des variations des taux d'ADNct muté *KRAS*

Le taux initial d'ADNct muté *KRAS* (Tableau 11) n'a pas montré de corrélation significative avec la réponse tumorale à trois mois (P 0,84 et 0,78 pour le taux en fréquence allélique et en nombre de copies mutées *KRAS*).

Le taux d'ADNct muté *KRAS* initial (au C1J1) élevé tend à être associé de manière significative avec une SSP plus courte ($P = 0,088$), la valeur brute du dosage au deuxième prélèvement (C1J15) est significativement liée à la SSP ($P < 0,0001$), alors que le dosage effectué à 1 mois (C2J1) ne montre qu'une tendance non significative ($P = 0,075$).

L'étude des variations du taux d'ADNct muté *KRAS* n'a pu être réalisé que pour les patients avec un ADNct initialement détectable ($n = 18/28$). Ainsi au J15, seulement 13 patients (46,4%) ont pu avoir un calcul de variation du taux d'ADNct muté *KRAS* (3 patients étaient décédés précocement, 1 patient n'a pas eu de prélèvement au J15 et 1 patient n'a pas encore réalisé sa 2^{ème} cure de chimiothérapie). Il a été observé 9 décroissances (69,2%) du taux d'ADNct muté *KRAS* au J15 par rapport au J1 (taux au moins divisé par 2 et jusqu'à négativation pour certains patients) et 4 augmentations du taux (multiplication par 2 voire par 5 pour certains patients). Une décroissance de ce taux d'ADNct muté *KRAS* entre le J1 et le J15

montre une tendance à la corrélation avec une meilleure réponse tumorale à trois mois ($P = 0.08$) et également une association significative avec une SSP plus longue ($P = 0.048$). Cette corrélation est d'autant plus forte si l'on regroupe les patients selon que leur taux d'ADNct muté *KRAS* est en augmentation *versus* stable ou en décroissance : la SPP médiane en cas d'augmentation du taux entre J1 et J15 est de 1.8 mois *versus* 7.4 mois pour le groupe dont les taux sont stables ou en décroissance ($P = 0.018$). A J28, l'analyse de la variation du taux d'ADNct muté *KRAS* sur 13 des 28 patients ne permet pas de mettre en évidence de corrélation avec la réponse tumorale à 3 mois ($P = 0,17$ en fréquence allélique et $P = 0,20$ en nombre de copies mutées *KRAS*).

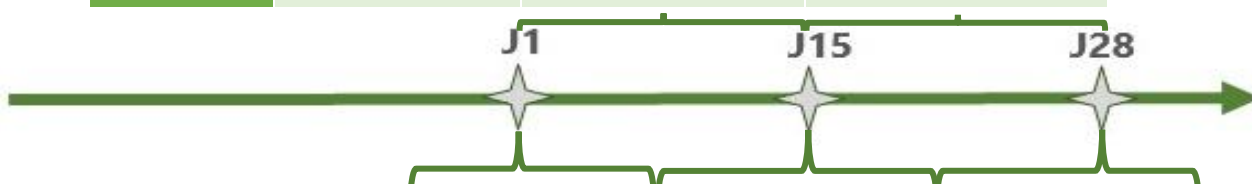
Tableau 11 : Valeurs pronostique et prédictive du taux d'ADNct muté *KRAS* en fréquence allélique)

ADNct muté <i>KRAS</i>	Corrélation avec la réponse et la survie	<i>P value</i>
Valeur brute initiale (C1J1)	SSP	0,088
	SG	0,023
	Réponse 3M	0,84
Valeur brute au J15	SSP	<0,0001
	SG	0.0057
Valeur brute au J28	SSP	0,075
Variation J1 à J15	Réponse 3M	0,08
	SSP	0,048
	SSP*	0,018
	SG	0,77
Augmentation vs stabilité/ décroissance taux à J15	SSP	0,018
	SG	0,24
Variation J1 à J28	Réponse 3M	0,17

Légende : * SSP évaluée après répartition des patients en deux groupes, selon que leur taux d'ADNct muté *KRAS* est en augmentation *versus* stable ou en décroissance

Figure 35 : Résumé des résultats de KRASCIPANC, corrélations et *P* value.

		Δ J1-J15	Δ J1- J28
SG	ADNcf	/	/
	ADN KRAS	Non ($P = 0,77$)	/
SSP	ADNcf	Non ($P = 0,76$)	+/- ($P = 0,067$)
	ADN KRAS	Oui ($P = 0,048$)	/
Réponse tumorale	ADNcf	+/- ($P = 0,081$)	Non ($P = 0,52$)
	ADN KRAS	+/- ($P = 0,080$)	Non ($P = 0,17$)



		Taux brut à J1	Taux brut à J15	Taux brut à J28
SG	ADNcf	Non ($P = 0,12$)	/	/
	ADN KRAS	Non ($P = 0,84$)	/	/
SSP	ADNcf	Oui ($P = 0,0023$)	Non ($P = 0,57$)	Oui ($P = 0,004$)
	ADN KRAS	+/- ($P = 0,088$)	Oui ($P < 0,0001$)	+/- ($P = 0,075$)
Réponse tumorale	ADNcf	Oui ($P = 0,0007$)	/	/
	ADN KRAS	Oui ($P = 0,023$)	Oui ($P = 0,0057$)	/

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

Ce travail prospectif retrouve 64,3% de patients porteurs d'une tumeur pancréatique non résécable avec un ADNct muté *KRAS* au diagnostic, par ailleurs, il a permis de mettre en évidence le caractère prédictif d'une SSP courte d'un taux élevé en baseline de l'ADNcf ($P = 0,0023$), ce qui n'est pas le cas de l'ADNct muté *KRAS* ($P = 0,088$) Le caractère pronostique est observé pour les deux paramètres : ADNcf et ADNct muté *KRAS* qui sont tous deux corrélés à la SG (respectivement $P = 0,007$ et $P = 0,023$). La variation du taux d'ADNcf à J28 montre une tendance à la corrélation avec la SSP : en cas de décroissance de l'ADNcf, la SSP est allongée. Les variations de l'ADNct muté *KRAS* au J15 sont corrélées avec la SSP ($P = 0,048$), ainsi en cas de bonne décroissance de ce taux entre J1 et J15, la SSP est améliorée ; cependant la SG n'est pas associée à cette cinétique de l'ADNct muté *KRAS* ($P = 0,77$).

Les patients inclus dans cette étude ont des caractéristiques superposables avec ceux des études retrouvées dans la littérature sur les adénocarcinomes du pancréas non résécables. Dans notre étude, l'âge médian était de 65.1 ans, comparable à celui retrouvé dans les études récentes : de 61 à 68 ans^{84,85,131,140}; l'état général conservé (OMS 0 – 1) pour plus de 85% était retrouvé un peu plus élevé dans les données de la littérature : > 90%^{84,85,131}. Le nombre de sites métastatiques et leur localisation étaient également en accord avec les données de la littérature concernant les cancers du pancréas non résécables. Dans cette étude, le nombre médian de sites métastatiques était de 2 par patient tout comme dans l'essai de T. Conroy⁸⁴. La localisation des lésions secondaires retrouvait 82.4% de métastases hépatiques concordant avec respectivement 87.6% dans l'étude de T. Conroy et 85% dans l'étude de DD. Von Hoff ; on a observé plus de carcinose péritonéale (41.2%) que dans les études de la littérature : de 4%⁸⁵ à 19.4%⁸⁴. Les données concernant l'atteinte secondaire pulmonaire sont cohérentes avec 29.4% pour notre travail et 19.4%⁸⁴ et 35%⁸⁵ pour respectivement les essais de T. Conroy et DD. Von Hoff. Le type de chimiothérapie effectuée en première ligne de traitement est assez hétérogène dans ce travail mais en accord avec les recommandations actuelles, à savoir FOLFIRINOX ou GEMZAR ABRAXANE si l'état général était conservé (OMS 0/1), GEMZAR seul le cas échéant.

La SSP (5.4 mois) est globalement identique aux résultats des essais thérapeutiques princeps (6.4 mois pour ACCORD 11-PRODIGE 4 et 5.5 mois pour MPACT) tandis que la SG (8.3 mois) est un peu plus courte (11.1 mois pour ACCORD 11-PRODIGE 4 et 8.5 mois pour MPACT).

Cette différence s'explique probablement par le caractère sélectionné des patients participants aux essais thérapeutiques.

La technique utilisée dans notre étude pour détecter l'ADN circulant est la même que celle de l'étude de M. Del Re et est en accord avec l'utilisation actuelle de la ddPCR, technique la plus courante pour analyser l'ADNct car très sensible. Le taux de patients avec de l'ADNct muté *KRAS* détecté (64,3%) est globalement en accord avec les données de la littérature avec des taux allant de 31¹³³ à 81%¹³⁶.

La détection ou non de l'ADNct n'est pas associée au pronostic dans notre étude ($P = 0.097$), tout comme l'essai de M. Del Re¹⁴⁰ mais ces données vont à l'encontre de l'étude de Pietrasz¹³¹, cependant la technique était différente (NGS) et les mutations recherchées étaient plus nombreuses et variées (*TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*...), ces résultats sont donc difficilement comparables. Il est difficile de savoir si la non détection de l'ADNct *KRAS* muté est liée à l'absence de mutation *KRAS* dans la tumeur primitive ou à l'absence d'ADNct. Pour quatre de nos cas (dont l'ADNct muté *KRAS* est resté négatif) nous avons analysé l'ADN de la tumeur, nous avons pu confirmer que le caractère pauci-cellulaire des prélèvements par cytoponction pancréatique rend cette analyse difficile (taux d'ADN extrait faible). Trois prélèvements ont retrouvé une tumeur mutée *KRAS* malgré un ADNct muté *KRAS* négatif. Dans la littérature, on retrouve peu de données à ce sujet, l'étude de O. Zill¹³⁸ a comparé les mutations retrouvées sur le tissu tumoral et l'ADN circulant mais avec la technique NGS, ce qui rend les résultats peu comparables. Cependant il était observé 7 patients sur les 26 inclus avec une discordance entre le tissu tumoral et l'ADNct dont un patient ayant une tumeur mutée *KRAS* sans ADNct détecté.

En l'absence d'ADNct *KRAS* il peut être intéressant d'utiliser une approche NGS afin de pouvoir détecter d'autres mutations fréquentes dans le cancer du pancréas non résécable comme *TP53*, *SMAD4*, *NRAS*, *PIK3CA*, et *STK11*. C'est ce qui a été fait dans l'étude de Pietrasz¹³¹ qui a ainsi retrouvé une concordance de 94% entre la ddPCR et le NGS sur la mutation du gène *KRAS*. Un seul patient était retrouvé négatif en NGS et muté en ddPCR avec une fréquence allélique de mutation de *KRAS* de 0.61% (seuil de détection théorique du NGS à 1% contre 0.1% pour la ddPCR). Le NGS permet d'effectuer la recherche de mutation sur un panel de plusieurs gènes en une seule manipulation, mais le pourcentage de détection d'ADNct ne semble pas plus élevé pour autant cette étude (48% d'ADNct détectable).

Une autre voie de recherche pour augmenter les taux de détection est la méthylation de l'ADN qui joue un rôle clé dans la régulation épigénétique de la transcription. L'étude de Guo¹⁴¹ rapporte ainsi 94% des 48 tumeurs analysées porteuses d'au moins un gène méthylé parmi *APC* (50%), *BRCA1* (46%), *p16INK4a* (35%), *p15INK4b* (35%), *RARβ* (35%), et *p73* (33%).

Les données concernant l'ADNcf dans le cancer du pancréas non résécable ne peuvent être comparées aux données de la littérature car très peu ont été rapportées, ainsi seule l'étude récente de D. Pietrasz rapporte des données d'ADN circulant total. Les valeurs d'ADNcf retrouvées dans notre travail sont plus faibles 14,40 *versus* 105,8 ng/mL de plasma sans qu'une explication claire ne soit retrouvée (Tableau 12). Une hypothèse serait que la technique employée dans l'essai de Pietrasz est moins sensible, car seulement 41% de patients sont retrouvés mutés *KRAS* (contre 64.3% dans notre étude), avec donc des taux d'ADNct muté *KRAS* plus élevés. Dans notre étude la valeur initiale (avant C1J1) de l'ADNcf est corrélée négativement à la SSP ($P = 0,0023$, $P = 0,0005$ si répartition en quartiles) mais également à la SG ($P = 0,0070$). Cette valeur prédictive de l'ADNcf est aussi observée avec les valeurs brutes d'ADNcf obtenues avant la chimiothérapie de J28 ($P = 0,004$) mais ce n'est pas le cas avec les valeurs brutes de J15. Il n'y a pas d'explication sur l'absence de valeur prédictive du taux à J15. L'analyse des variations des taux d'ADNcf est peu contributive, il existe seulement une tendance à la corrélation entre la décroissance du taux d'ADNcf entre J1 et J28 et la SSP ($P = 0,067$). Il faut rappeler que l'ADNcf varie en cas d'inflammation, de sepsis et de nécrose rendant difficile son interprétation dans notre travail sur les cancers du pancréas localement avancés ou métastatiques donc potentiellement responsable d'inflammation chronique, d'infection voire de nécrose tumorale. L'ADNcf est surtout le reflet de l'état général du patient, plus que de la tumeur en elle-même, car on rappelle que l'ADNct muté *KRAS* est une petite partie de l'ADNct total. De plus, le faible effectif de patients ($n = 22$) limite la puissance statistique de nos résultats.

Les données de l'ADNct muté *KRAS* peuvent être comparées aux données bibliographiques car plusieurs travaux ont porté sur ce thème. Concernant les taux d'ADNct muté *KRAS* dans notre étude avant traitement, ceux-ci sont plus faibles que ceux obtenus par M. Del Re : médiane de 7,68 *versus* 2100 copies mutées *KRAS* (Tableau 12). En excluant, les patients sans ADNct muté *KRAS* le taux médian dans notre étude est de 86.76 copies mutées

KRAS. Il n'y a pas d'explication évidente, d'autant que la même technique est utilisée. Compte tenu du faible effectif, un biais de sélection ne peut être exclu. La comparaison avec l'étude de Pietrasz n'est pas réalisable car le chiffre de fréquence allélique donné (6.1%) correspond à plusieurs mutations (*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* et *SMAD4*).

Ce taux pré-thérapeutique d'ADNct muté *KRAS* à une valeur pronostique négative car il est corrélé à la SG dans notre travail ($P = 0,023$), ce qui était également montré par D. Pietrasz *et al.* ($P < 0,001$). En revanche le caractère initialement détectable ou non de cet ADNct n'est corrélé ni à la SSP ($P = 0,20$) ni à la SG ($P = 0,097$), comme retrouvé dans le travail de Del Re (respectivement $P = 0,24$ et $P = 0,16$). Ce paramètre n'est pas comparable dans l'essai de Pietrasz car là encore la corrélation est valable pour l'ensemble des gènes analysés en NGS : SG plus courte en cas d'ADNct détectable ($P < 0.001$). Les valeurs brutes d'ADNct muté *KRAS* à J15 sont significativement corrélées à la SSP ($P < 0.001$), ainsi un faible taux d'ADNct muté *KRAS* au J15 sera associé à une SSP plus longue. Ceci n'est pas retrouvé significativement avec le taux d'ADNct au J28 ($P < 0.075$). Dans les données de la bibliographie, il n'y a pas d'analyse des taux bruts d'ADNct muté *KRAS* à J15 ou J28.

La décroissance (entre J1 et J15) du taux d'ADNct muté *KRAS* montre une tendance à la corrélation comme valeur prédictive négative de réponse à la chimiothérapie ($P = 0,08$), cette association n'est pas retrouvée significative entre le J1 et le J28 ($P = 0,17$). L'essai de M. Del Re a apporté des résultats quant à la variation du taux d'ADNct muté *KRAS* entre le J1 et le J15, les patients étaient pour cela répartis en deux groupes selon que le taux était en hausse ou stable/en baisse. Les résultats montraient une corrélation avec une SSP plus courte en cas de taux en hausse ($P = 0,03$), puis en excluant les patients stables, il était observé une association à une SG plus courte en cas de hausse de l'ADNct muté *KRAS* ($P = 0,009$). Notre étude rapport des résultats similaires en regroupant les patients de façon identique, concernant l'association de la variation du taux d'ADNct muté *KRAS* avec la SSP ($P = 0,018$) cependant la corrélation avec la SG n'est pas retrouvée ($P = 0,24$). L'étude de D. Pietrasz n'a pas porté sur la cinétique de l'ADNct muté *KRAS*, il a été effectué une analyse de la variation des taux sur seulement 8 patients, les données ne sont pas publiées.

Il est étonnant de voir que la valeur pronostique des taux d'ADNct muté *KRAS* semble moins robuste que l'ADNcf. La mutation *KRAS* est un événement précoce de la carcinogénèse pancréatique³⁰ donc à priori lorsqu'il existe une mutation, elle est présente dans toutes les cellules tumorales, la coexistence d'ADNct muté *KRAS* et d'ADN non muté ne semble pas possible. En revanche, il est possible que l'élévation de l'ADNcf avec des taux faibles d'ADNct muté *KRAS* soit due à la mort des cellules saines dans le microenvironnement tumoral, notamment au front d'invasion. C'est peut-être cette mort cellulaire qui explique les forts taux d'ADNcf et qui peut être une valeur pronostique. En effet, nous savons que le microenvironnement tumoral des tumeurs pancréatiques a un rôle majeur dans la chimiorésistance de ces tumeurs^{47,48}.

Tableau 12 : Comparaison des résultats de KRASCIPANC avec les données de la littérature.

	% détection de mutation <i>KRAS</i>	Médiane ADNcf en ng/mL (± SD)	Médiane ADNct muté <i>KRAS</i> en FA (%)	Médiane ADNct en NC mutées <i>KRAS</i> /mL
KRASCIPANC	64,3	14,40 (± 32,57)	0,26 (2,04*)	7,68 (86,76*)
Pietrasz et al., 2017 ¹³¹	41,3	105,8 (± 227,25)	6,1% mais technique NGS, plusieurs mutations ; répartition en tertiles non définis	ND
Del Re et al., 2017 ¹⁴⁰	70,4	ND	ND	2100

Légende : FA = fréquence allélique, NC = nombre de copies, * = valeur ne prenant pas en compte les patients négatifs, ND = données non disponibles

Les forces de notre étude reposent sur le fait que ce sujet présente peu de données dans la littérature actuelle, notamment concernant la dynamique de l'ADNct muté *KRAS* mais aussi l'intérêt de l'ADNcf très peu étudié jusqu'alors.

Les faiblesses de ce travail sont principalement son faible effectif ne permettant pas une puissance statistique satisfaisante mais aussi son hétérogénéité sur le plan de la population qui mélange des tumeurs localement avancées et des tumeurs métastatiques, ainsi que l'hétérogénéité des chimiothérapies prescrites.

Les inclusions vont être poursuivies afin d'améliorer la puissance statistique de nos résultats notamment pour évaluer l'impact pronostique/prédictif de réponse à la chimiothérapie de la variation des taux d'ADN.

De plus, un PHRC inter-régional a été déposé pour réaliser une étude prospective multicentrique. La population sera homogène (tumeurs métastatiques seulement et chimiothérapie par GEMCITABINE +/- ABRAXANE ou FOLFIRINOX) et l'effectif plus important (n = 180). Le but de l'étude est de démontrer que l'ADN circulant permet d'anticiper la progression radiologique de la maladie. L'objectif principal est d'établir la performance de la diminution du taux d'ADN circulant tumoral *KRAS* muté (entre le taux pré-thérapeutique et le taux à 1 mois) pour prédire le taux de contrôle précoce de la maladie sous chimiothérapie (à 2-3 mois) dans les adénocarcinomes pancréatiques métastatiques. Plusieurs prélèvements seront réalisés pour obtenir une cinétique du taux d'ADNct *KRAS* muté. Les prélèvements seront effectués avant les séances de chimiothérapie à J0, J14 et J28, puis à la progression (4 prélèvements par patients).

Le critère principal de jugement est l'indice C-index de performance prédictive issu de l'analyse par courbe ROC étudiant le contrôle de la maladie sous chimiothérapie (stabilité ou réponse) selon les critères radiologiques RECIST 1.1 à 2 mois en fonction de la diminution du taux d'ADN circulant tumoral *KRAS* muté entre le début de la chimiothérapie (J0) et à 1 mois de traitement (J30). Le pourcentage de diminution de l'ADNct sera analysé de manière continue avec recherche par analyse de la courbe ROC d'un seuil optimal de sensibilité et spécificité. Compte tenu du pronostic très sombre de ce cancer il est important de savoir rapidement si la chimiothérapie est efficace ou non. En effet, peu de patients peuvent recevoir une deuxième ligne de chimiothérapie (~40%) alors que maintenant plusieurs traitements ont démontré leur efficacité (IRINOTECAN, OXALIPLATINE, GEMCITABINE Nab-IRI et Nab-PACLITAXEL). Ainsi, modifier le protocole de chimiothérapie avant la progression radiologique et/ou clinique pourrait permettre d'améliorer la survie globale des patients.

Cette étude, si elle est positive, permettra de servir de base à un essai prospectif randomisé comparant une stratégie thérapeutique basée sur la progression radiologique/clinique à une stratégie thérapeutique basée sur la cinétique des taux d'ADNct *KRAS* muté (2^{ème} ligne de chimiothérapie en l'absence de diminution de l'ADNct à 1 mois en fonction du seuil défini par notre étude).

CONCLUSION

Au total, les taux d'ADNcf et d'ADNct muté *KRAS* pré-thérapeutiques sont pronostiques. La valeur pronostique de l'ADN est très puissante ($p < 0,001$) et persiste en analyse multivariée. En pratique clinique, cela peut aider au choix de la chimiothérapie pour évaluer l'agressivité de la maladie, si une monothérapie *versus* une bi-chimiothérapie est discutée.

Les variations des taux d'ADNcf entre J0 et J15 ou J28 ne semble pas significativement prédictifs de la réponse à la chimiothérapie ($P = 0,081$) ; les variations des taux d'ADNct muté *KRAS* sont eux associés à une SSP plus longue s'ils baissent au J15 ($P = 0,018$). On peut craindre un manque de puissance lié au faible effectif et une implication de l'hétérogénéité de notre population.

Ce travail confirme donc l'intérêt de l'ADN circulant dans les cancers pancréatiques non résécables, mais ouvre une voie de recherche encore peu explorée à travers l'ADNcf comme marqueur pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie.

BILBIOGRAPHIE

1. Lévy P, Ruszniewski P, Sauvanet A & al. *Traité de pancréatologie clinique*. (2005).
2. Lucidarme O. *Echographie abdominale 1st Edition*. (2017).
3. Pelletier G. Identification of four cell types in the human endocrine pancreas by immunoelectron microscopy. *Diabetes* 1977 Aug;26:749-56 (1977).
4. Globocan 2012 - Home.
5. INVS pancreas France 2012.
6. Becker A, Hernandez Y, Frucht H & al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol* 2014 Aug 28;20(32):11182–11198
7. Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C. & Grützmann, R. Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
8. Aleodor A, Sarkar F, Adsay V & al. Clinicopathological Correlates of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A Comparative Analysis of 82 Cases With and 152 Cases Without Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* **16**, 996–1006 (2003).
9. Dumlu E, Karakoc D & Ozdemir A. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Current Perspectives. *Int Surg* 2015 Jun;100(6):1060–1068
10. Al-Haddad M, Schmidt MC, Sandrasegaran K & al. Diagnosis and treatment of cystic pancreatic tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011 Aug;9(8):635-48 (2011).
11. Antwi S, Oberg A, Shivappa N & al. Pancreatic cancer: Associations of inflammatory potential of diet, cigarette smoking, and long-standing diabetes. *Carcinogenesis* (2016).
12. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A & al. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 2005 Jun 6;92(11):2076–2083 (2005).
13. Grote V, Becker S, Kaaks R & al. Diabetes Mellitus Type 2 – An Independent Risk Factor for Cancer? *Exp. Clin. Endocrinol. Amp Diabetes* **118**, 4–8 (2010).
14. Minoti V, Volker K, Jeremy S & al. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* **132**, 1557–1573 (2007).
15. Van Rees B, Tascilar M, Hruban R & al., A. C. Remote partial gastrectomy as a risk factor for pancreatic cancer: potential for preventive strategies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **10 Suppl 4**, 204–207 (1999).
16. Hedberg M, M. Ogren, Janzon L & al. Pancreatic carcinoma following gastric resection. A case-control study based on 21,660 consecutive clinical necropsies at Malmö University Hospital. *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* **21**, 219–224 (1997).
17. Borch K, Kullman E, Hallhagen S & Torbjörn Ledin. Increased incidence of pancreatic neoplasia in pernicious anemia. *World J. Surg.* **12**, 866–870 (1988).

18. Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC & al. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2010 May 15126102394-403
19. Tramacere I, Scotti L, Jenab M & al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int. J. Cancer* **126**, 1474–1486 (2010).
20. Aune D, Greenwood D, Chan D & al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose–response meta-analysis of prospective studies. *Ann. Oncol.* **23**, 843–852 (2012).
21. MacMahon B, Yen S, Trichopoulos D & al. Coffee and Cancer of the Pancreas. *N Engl J Med* 1981 304630-633 (1981).
22. Turati F, Galeone C, Edefonti V & al. A meta-analysis of coffee consumption and pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* **23**, 311–318 (2012).
23. Guertin K. A., Freedman N. D., E. Loftfield & al. A prospective study of coffee intake and pancreatic cancer: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Br. J. Cancer* **113**, 1081–1085 (2015).
24. Bassil K.L, Vakil C, Sanborn M & D.C. Cole. Cancer health effects of pesticides. *Can. Fam. Physician* **53**, 1704–1711 (2007).
25. Antwi S, Eckert, Sabaque C & Emma R. Leof. Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. *Cancer Causes Control CCC* **26**, 1583 (2015).
26. Hidalgo M, Cascinu S, Kleef J & al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. (2014).
27. Kumari A, Srinivasan R, Vasishta R & al. Positive Regulation of Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Expression and Telomerase Activity by DNA Methylation in Pancreatic Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 1051–1059 (2009).
28. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A & al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. (2003).
29. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA & al. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. (1997).
30. Huguet F, Fernet M, Monnier L & al. New perspectives for radiosensitization in pancreatic carcinoma: a review of mechanisms involved in pancreatic tumorigenesis. *Cancer Radiother* (2011).
31. Plagge A., Kelsey G., Germain-Lee EL. & al. Physiological functions of the imprinted Gnas locus and its protein variants Galpha(s) and XLalpha(s) in human and mouse. *J Endocrinol* 2008 Feb1962193-214 (2008).
32. Macgregor-Das AM., Iacobuzio-Donahue C. & al. Molecular Pathways in Pancreatic Carcinogenesis. *J. Surg. Oncol.* **107**, 8 (2013).

33. Jones S., Zhang X., Parsons W. & al. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* **321**, 1801 (2008).
34. Borad M., Saadati H., Lakshmipathy A. & al. Skeletal Metastases in Pancreatic Cancer: A Retrospective Study and Review of the Literature. *Yale J Biol Med* 2009 Mar 821 1–6 (2009).
35. Tempero M., Uchida E., Takasaki H. & al. Relationship of carbohydrate antigen 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer. *Am. Assoc. Cancer Res.* (1987).
36. Wakabayashi T., et al, Sawabu N., Takemori Y. & al. Diagnostic significance of cancer-associated carbohydrate antigen (CA19-9) concentrations in pancreatic juice. *Pancreas* 1993 Mar82151-9
37. Deugnier YM., Rabot AF., Guyader D. & al. Serum increase and liver overexpression of carbohydrate 19.9 antigen in patients with genetic haemochromatosis. *Gut* 1994 Aug3581107-11 (1994).
38. Chang CY., Huang SP., Chiu HM. & al. Low efficacy of serum levels of CA 19-9 in prediction of malignant diseases in asymptomatic population in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 2006 Jan-Feb53671-4 (2006).
39. Gold P., Shuster J., Freedman S. & al. Carcinoembryonic antigen (CEA) in clinical medicine. Historical perspectives, pitfalls and projections. *Cancer* **42**, 1399–1405 (1978).
40. Sefrioui D., Blanchard F., Toure E. & al. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br J Cancer* 2017 Aug 3 (2017).
41. Maire F., Sauvanet A., Trivin F. & al. Staging of pancreatic head adenocarcinoma with spiral CT and endoscopic ultrasonography: An indirect evaluation of the usefulness of laparoscopy. *Pancreatol.* 2004445436-40 (2004).
42. Fusaroli P., Spada A., Mancino MG. & al. Contrast harmonic echo-endoscopic ultrasound improves accuracy in diagnosis of solid pancreatic masses. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010 Jul87629-34e1-2 (2010).
43. Francioni E., Reimão S., Bories E. & al. Solid pancreatic lesions: The choice of fine-needle aspiration-needle to optimize the diagnosis. *Endosc Ultrasound* 2014 Apr3Suppl 1S12-3 (2014).
44. Suzuki A., Kawano T., Takahashi N. & al. Value of 18F-FDG PET in the detection of peritoneal carcinomatosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2004).
45. Chang DK., Johns AL., Merrett ND. & al. Margin Clearance and Outcome in Resected Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* 2009 Jun 1027172855-62 (2009).
46. Lüttges J. & al. What's new? The 2010 WHO classification for tumours of the pancreas. *Pathol.* 2011 Nov32 Suppl 2332-6 (2011).
47. Korc M. & al. Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg* 2007 Oct1944 SupplS84-6 (2007).

48. Mei L., Du W., Wee W. & al. Targeting stromal microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: controversies and promises. *J. Gastrointest. Oncol.* (2015).
49. Nichols LS., Ashfaq R., Iacobuzio-Donahue CA. & al. Claudin 4 Protein Expression in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer. *Am. Soc. Clin. Pathol.* (2004).
50. Wilentz RE., Goggins M., Redston M. & al. Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol* 2000 May15651641-51 (2000).
51. Reid MD., Balci S., Saka B. & al. Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocr Pathol* 2014 Mar25165-79 (2014).
52. Fuhrman G., Charnsangavej C., Abbruzzese J. & al. Thin-section contrast-enhanced computed tomography accurately predicts the resectability of malignant pancreatic neoplasms. *Am. J. Surg.* **167**, 104–113 (1994).
53. Wanebo H., Glicksman A., Vezeridis M. & al. Preoperative Chemotherapy, Radiotherapy, and Surgical Resection of Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Arch. Surg.* **135**, 81–87 (2000).
54. Nakagohri T., Kinoshita T., Masaru Konishi & al. Survival benefits of portal vein resection for pancreatic cancer. *Am. J. Surg.* **186**, 149–153 (2003).
55. Moutardier V., Giovannini M., Magnin V. & al. How to improve treatment of resectable pancreatic adenocarcinomas? Surgical resection, histopathological examination, adjuvant therapies. *Gastroenterol Clin Biol* 2004 Nov28111083-91 (2004).
56. Sohn TA., Yeo CJ., Cameron JL. & al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 2000 Nov-Dec46567-79 (2000).
57. Baulieux J., Delperio JR. & al. Surgical treatment of pancreatic cancer: curative resections. *Ann Chir* 2000 Sep1257609-17 (2000).
58. Whipple AO. & al. The rational of radical surgery for cancer of the pancreas and ampullary region. *Ann Surg* 1941 Oct1144612-5 (1941).
59. Whipple AO., Parsons WB., Mullins CR. & al. Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater. *Ann Surg* 1935 Oct1024763-79 (1935).
60. Charles G. & al. Pancreaticojejunostomy and Other Problems Associated With the Surgical Management of Carcinoma Involving the Head of the Pancreas: Report of Five Additional Cases of Radical Pancreaticoduodenectomy. *Ann. Surg.* **119**, 845 (1944).
61. Yeo C. J., Abrams R. A., Grochow L. B. & al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. *Ann. Surg.* **225**, (1997).
62. Lillemoe K., Kaushal S., Cameron J. & al. Distal Pancreatectomy: Indications and Outcomes in 235 Patients. *Ann. Surg.* **229**, 693 (1999).

63. Shepherd HA., Royle G., Ross AP. & al. Endoscopic biliary endoprosthesis in the palliation of malignant obstruction of the distal common bile duct: a randomized trial. *Br J Surg* 1988 Dec75121166-8 (1988).
64. Lacaine F. & al. *Chirurgie palliative et de dérivation. Chirurgie du pancréas et de la rate.* (2009).
65. Frédérique Maire, Hammel P., Ponsot P. & al. Long-term Outcome of Biliary and Duodenal Stents in Palliative Treatment of Patients with Unresectable Adenocarcinoma of the Head of Pancreas. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 735–742 (2006).
66. Lillemoe K., Cameron J., Hardacre J. & al. Is Prophylactic Gastrojejunostomy Indicated for Unresectable Periapillary Cancer?: A Prospective Randomized Trial. *Ann. Surg.* **230**, 322 (1999).
67. Lesurtel M., Paye F., Parc R. & al. *Résultats du traitement palliatif chirurgical des cancers de la tête du pancréas par double dérivation bilio-digestive et gastro-jejunaie.* (© Elsevier Masson, 2008).
68. André T. & al. TNCD, cancer du pancreas. (2011). Available at: <http://www.tncd.org/>.
69. Gillen S., Schuster T., Meyer Zum Büschenfelde C. & al. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med* 2010 Apr 2074e1000267 (2010).
70. Oettle H., Post S., Neuhaus P. & al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer. *JAMA* 2007 Jan 172973267-77 (2007).
71. Neoptolemos JP., Palmer DH., Ghaneh P. & al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4). *Lancet* 2017 Jan 24 Pii S0140-67361632409-6 (2017).
72. Neoptolemos JP, Stocken DD., Friess H. & al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004 Mar 18350121200-10 2004 Mar
73. Huguet F., Girard N., Clotilde Séblain-El Guerche & al. Chemoradiotherapy in the Management of Locally Advanced Pancreatic Carcinoma: A Qualitative Systematic Review. *J. Clin. Oncol.* (2016).
74. Florence Huguet, André T., Hammel P. & al. Impact of Chemoradiotherapy After Disease Control With Chemotherapy in Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma in GERCOR Phase II and III Studies. *J. Clin. Oncol.* (2016).
75. Hammel P., Huguet F., Van Laethem JL. & al. Comparison of chemoradiotherapy (CRT) and chemotherapy (CT) in patients with locally advanced pancreatic cancer (LAPC) controlled after 4 months of gemcitabine with or without erlotinib: Final results of the international phase III LAP 07 study. *Pancreatol. Suppl Phila.* (2013).

76. B. Chauffert, Mornex F., Bonnetain F. & al. Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* **19**, 1592–1599 (2008).
77. Mukherjee S., Hurt CN., Bridgewater J. & al. Gemcitabine-based or capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer (SCALOP): a multicentre, randomised, phase 2 trial. *2013 Mar 6*
78. Moore M. J., Green M. R., Rothenberg M. L. & al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* (2016).
79. Moore M. J., Green M. R., Rothenberg M. L. & al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997 Jun1562403-13 (2016).
80. Tempero M., Capadano M., Tarassoff P. & al. Dose escalation of gemcitabine in previously untreated patients with pancreatic adenocarcinoma. (1994).
81. Zagouri F., Sergentanis TN., Chrysikos D. & al. Molecularly targeted therapies in metastatic pancreatic cancer: a systematic review. *Pancreas* 2013 Jul425760-73 (2013).
82. Rougier P., Riess H., Manges R. & al. Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2013 Aug49122633-42 (2013).
83. Hammel P, Huguet F., Van Laethem JL. & al. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016 May 3315171844-53 (2016).
84. Conroy T., Desseigne F., Ychou M. & al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2011 May 12364191817-25 (2011).
85. Von Hoff DD., Ervin T., Arena F. & al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med* 2013 Oct 31369181691-703 (2013).
86. Trouilloud I., Dupont-Gossard AC, Malka D. & al. Fixed-dose rate gemcitabine alone or alternating with FOLFIRI.3 in the first-line treatment of patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: an AGEO randomised phase II study (FIRGEM). *Eur J Cancer* 2014 Dec50183116-24 (2014).
87. Reni M., Cereda S., Milella M. & al. Maintenance sunitinib or observation in metastatic pancreatic adenocarcinoma: a phase II randomised trial. *Eur J Cancer* 2013 Nov49173609-15 (2013).

88. Oettle H., Riess H., Stieler J. & al. Second-Line Oxaliplatin, Folinic Acid, and Fluorouracil Versus Folinic Acid and Fluorouracil Alone for Gemcitabine-Refractory Pancreatic Cancer: Outcomes From the CONKO-003 Trial. *J. Clin. Oncol.* (2016).
89. Wang-Gillam A., Li CP., Bodoky G. & al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1). *Lancet* 2016 Feb 638710018545-57 (2016).
90. Gebbia V., Maiello E., Giuliani F. & al. Second-line chemotherapy in advanced pancreatic carcinoma: a multicenter survey of the Gruppo Oncologico Italia Meridionale on the activity and safety of the FOLFOX4 regimen in clinical practice. *Ann Oncol* 2007 Jun18 Suppl 6vi124-7 (2007).
91. Dahan L., Bonnetain F., Ychou M. & al. Combination 5-fluorouracil, folinic acid and cisplatin (LV5FU2-CDDP) followed by gemcitabine or the reverse sequence in metastatic pancreatic cancer: final results of a randomised strategic phase III trial (FFCD 0301). *Gut* 2010 Nov59111527-34 (2010).
92. Sonnenblick A., Kadouri L., Appelbaum L. & al. Complete remission, in BRCA2 mutation carrier with metastatic pancreatic adenocarcinoma, treated with cisplatin based therapy. *Cancer Biol Ther* 2011 Aug 1123165-8 (2011).
93. Neoptolemos P., Greenhalf W., Ghaneh P. & al. HENT1 tumor levels to predict survival of pancreatic ductal adenocarcinoma patients who received adjuvant gemcitabine and adjuvant 5FU on the ESPAC trials. *J. Clin. Oncol.* (2017).
94. Maréchal R., Bachet JB., Mackey J. R. & al. Prediction of gemcitabine benefit after curative-intent resection of pancreatic adenocarcinoma using HENT1 and dCK protein expression. *J. Clin. Oncol.* (2016).
95. Sinn M., Sinn B., Striefler JK. & al. SPARC in pancreatic cancer: Results from the CONKO-001 study. *J. Clin. Oncol.* (2017).
96. Hidalgo M., Plaza C., Musteanu M. & al. SPARC Expression Did Not Predict Efficacy of nab-Paclitaxel plus Gemcitabine or Gemcitabine Alone for Metastatic Pancreatic Cancer in an Exploratory Analysis of the Phase III MPACT Trial. (2015).
97. Cox AD., Der CJ. & al. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2 (2010).
98. Jancik S., Drabek J., Radzioch D. & al. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *BioMed Res. Int.* **2010**, **2010**, e150960 (2010).
99. Bryant KL., Mancias JD., Kimmelman AC. & al. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 91–100 (2014).
100. Mansi L., Viel E., Curtit E. & al. Targeting the RAS signalling pathway in cancer. *Bull Cancer* 2011 Oct9891019-28 (2011).
101. Diaz L., Bardelli A. & al. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* (2014).

102. Bettgowda C., Sausen M., Leary R. & al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
103. Leon SA, Shapiro B., Sklaroff DM. & al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977 Mar373646-50 (1977).
104. Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J., Struniawski R. & al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br. J. Cancer* **113**, 476 (2015).
105. Saukkonen K., Lakkisto P., Varpula M. & al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive Care Med* 2007 Sep3391624-7 (2007).
106. Han X., Wang J, Sun Y. & al. Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics* (2016).
107. Pietrasz D., Pécuchet N., Fabre E. & al. What future for circulating tumor DNA? Current data and prospects in colorectal, non-small cell lung and pancreatic cancers. *Bull Cancer* 2016 Jan103155-65 (2016).
108. Song LL., Li YM. & al. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: An overview of colorectal cancer screening tests. *World J Gastrointest Oncol* 2016 Nov 15811793-800 (2016).
109. Taly V., Pekin D., Benhaim L. & al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013 Dec59121722-31 (2013).
110. Nadal C., Winder T., Gerger A. & al. Future perspectives of circulating tumor DNA in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2017 May3951010428317705749
111. Bazan V., Bruno L., Augello C. & al. Molecular detection of TP53, Ki-Ras and p16INK4A promoter methylation in plasma of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol* 2006 Jun17 Suppl 7vii84-90
112. Fan G., Zhang K., Ding J. & al. Prognostic value of EGFR and KRAS in circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017 May 1682033922-33932 (2017).
113. Almoguera C., Shibata D., Forrester K. & al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988 May 20534549-54 (1988).
114. Raphael BJ., Hruban RH., Aguirre AJ. & al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2017 Aug 14322185-203e13 (2017).
115. Ryan D., Hong T., Bardeesy N. & al. Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2014 3711039-1049 (2014).

116. Haas M., Ormanns S., Baechmann S. & al. Extended RAS analysis and correlation with overall survival in advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **116**, 1462–1469 (2017).
117. Weyandt JD., Lampson BL., Tang S. & al. Wild-Type Hras Suppresses the Earliest Stages of Tumorigenesis in a Genetically Engineered Mouse Model of Pancreatic Cancer. *PLoS One* 2015 Oct 91010e0140253 (2015).
118. Theodor L., Melzer E., Sologov M. & al. Detection of pancreatic carcinoma: diagnostic value of K-ras mutations in circulating DNA from serum. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 2014–2019 (1999).
119. Maire F., Micard S., Hammel P. & al. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *Br. J. Cancer* **87**, 551–554 (2002).
120. De-Qing M., You-Shu P., Qiao-Jian X. & al. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J. Gastroenterol.* **10**, 471 (2004).
121. Vietsch E., Van Eijck C., Wellstein A. & al. Circulating DNA and Micro-RNA in Patients with Pancreatic Cancer. *Pancreat. Disord. Ther.* **5**, (2015).
122. Takai E., Totoki Y., Nakamura H. & al. Clinical Utility of Circulating Tumor DNA for Molecular Assessment and Precision Medicine in Pancreatic Cancer. *Adv Exp Med Biol* 201692413-17 (2016).
123. Earl J., Garcia-Nieto S., Martinez-Avila JC. & al. Circulating tumor cells (Ctc) and kras mutant circulating free Dna (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with. *BMC Cancer* 2015 Oct 2415797 (2015).
124. Lewis A., Valle J., McNamara M. & al. Pancreatic cancer: Are ‘liquid biopsies’ ready for prime-time? *World J. Gastroenterol.* **22**, 7175 (2016).
125. Nomoto S., Nakao A., Kasai Y. & al. Detection of ras gene mutations in perioperative peripheral blood with pancreatic adenocarcinoma. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* **87**, 793–797 (1996).
126. Terumasa Y., Nakamori S., Ohzato H. & al. Detection of kras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma : correlation with clinicopathological features. *Clin. Cancer Res.* (1998).
127. Marchese R., Muleti A., Pasqualetti P. & al. Low correspondence between K-ras mutations in pancreatic cancer tissue and detection of K-ras mutations in circulating DNA. *Pancreas* **32**, (2006).
128. Singh N., Gupta S., Pandey R. M. & al. High Levels of Cell-Free Circulating Nucleic Acids in Pancreatic Cancer are Associated With Vascular Encasement, Metastasis and Poor Survival. *Cancer Invest.* **33**, 78–85 (2015).
129. Wang JS., Sausen M., Parpart S. & al. Circulating tumor DNA (ctDNA) as a prognostic marker for recurrence in resected pancreas cancer. *2015 ASCO Annu. Meet.* (2015).
130. Sausen M., Phallen J., Adleff V. & al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients : Nature Communications : Nature Publishing Group. *Nat. Commun.* 6 Artic. Number 7686 2015 (2015).

131. Pietrasz D., Pécuchet N., Garlan F. & al. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin. Cancer Res.* **23**, 116–123 (2017).
132. Tada M., Omata M., Kawai S. & al. Detection of ras Gene Mutations in Pancreatic Juice and Peripheral Blood of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **53**, 2472–2474 (1993).
133. Mulcahy H. E., Lyautey J., Lederrey C. & al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **4**, 271–275 (1998).
134. Chen H., Tu H., Meng Z. Q. & al. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **36**, 657–662 (2010).
135. Däbritz J., Preston R., Hanfler J. & al. K-ras mutations in the plasma correspond to computed tomographic findings in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 2012 Mar412323-5 (2012).
136. Däbritz J., Preston R., Hanfler J. & al. Follow-up study of K-ras mutations in the plasma of patients with pancreatic cancer: correlation with clinical features and carbohydrate antigen 19-9. *Pancreas* 2009 Jul385534-41 (2009).
137. Johansen JS, Vibat C., Hancock S. & al. Prognostic value of plasma circulating tumor (ct) DNA KRAS mutations and serum CA19-9 in unresectable pancreatic cancer (PC) patients. *J. Clin. Oncol.* (2015).
138. Zill O., Greene C., Sebisanoovic D. & al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov.* CD–15–0274 (2015).
139. Kinugasa H., Nouse K., Miyahara K. & al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer* **121**, 2271–2280 (2015).
140. Del Re M., Vivaldi C, Rofi E. & al. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
141. Guo M., Jia Y., Yu Z. & al. Epigenetic changes associated with neoplasms of the exocrine and endocrine pancreas. *Discov. Med.* **17**, 67–73 (2014).
142. Edge SB., Byrd DR., Compton CC. & al. Exocrine and endocrine pancreas. in (2010).

ANNEXES

Annexe 1 : Classification pTNM du cancer du pancréas, AJCC, 7ème édition, 2009 et stades.

Tumeur (T) :	
Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
pTis	Carcinome in situ
pT1	Tumeur limitée au pancréas inférieure ou égale à 2 cm dans son plus grand diamètre
pT2	Tumeur limitée au pancréas supérieure à 2 cm dans son plus grand diamètre
pT3	Tumeur s'étendant au-delà du pancréas mais sans envahir le tronc coeliaque ni l'artère mésentérique supérieure
pT4	Tumeur étendue au tronc coeliaque ou à l'artère mésentérique supérieure (tumeur primitive non résécable).
Adénopathies (N) : L'examen d'au moins 10 ganglions est souhaitable	
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
pN0	Pas de métastase ganglionnaire régionale (≥ 10 ganglions analysé)
pN1	Envahissement des ganglions lymphatiques régionaux
Métastases viscérales (M) :	
pM0	Pas de métastase,
pM1	Présence de métastase(s) à distance*

Stade 0	Tis N0M0		
Stade IA	T1, N0, M0	Stade IB	T2, N0, M0
Stade IIA	T3, N0, M0	Stade IIB	T1-3, N1, M0
Stade 3	T4, tout N, M0		
Stade 4	M1 quel que soit T et N		

D'après Edge SB. et al, 2009 ¹⁴²

*Une carcinose péritonéale ou la présence de cellules tumorales dans le liquide d'ascite classe la maladie en M1, de même qu'une adénopathie tumorale à distance, notamment inter aortico-cave.



**Formulaire d'information et de consentement du patient
(Prélèvement de sang utilisé à des fins de recherche)**

Madame, Monsieur,

Dans le cadre du projet de recherche KRASCIPANC (*KRAS mutant Circulating tumor DNA for monitoring response to first line chemotherapy in locally advanced and metastatic PANcreatic Cancer*) nous allons prélever avec votre accord trois tubes de sang supplémentaires. Aucune prise de sang additionnelle ne sera nécessaire pour prélever ces échantillons, car les prises de sang seront réalisées lors des bilans sanguins nécessaires à votre prise en charge ou au moment du branchement pour la perfusion de chimiothérapie.

Le cancer du pancréas est très souvent porteur dans son ADN d'une mutation appelée *KRAS* (70 à 90% des cas), que l'on trouve également dans le sang, sous forme « circulante » libérée par la tumeur. Cela permet de quantifier le taux d'ADN tumoral circulant dans le sang. L'intérêt de l'évaluation de ce taux est encore mal défini mais mérite que l'on s'y intéresse, notamment pour prédire la réponse de la tumeur à la chimiothérapie.

Ainsi, l'objectif de cette étude est de quantifier l'ADN tumoral circulant relargué par la tumeur sur une simple prise de sang lors de vos séances de chimiothérapie. Cela permettra d'évaluer les variations du taux d'ADN tumoral circulant pendant le traitement et de rechercher un lien avec l'efficacité de celui-ci. Les prélèvements seront réalisés avant le début du traitement puis tous les mois et au maximum pendant 6 mois. La durée de participation à l'étude est donc de 6 mois au maximum.

Vous pouvez à tout moment revenir sur votre décision et demander que les échantillons prélevés ainsi que les données cliniques associées ne soient pas utilisés, en nous le faisant connaître par tout moyen (oralement, par écrit, par courrier électronique, par téléphone, ...).

Médecin responsable : Pr David TOUGERON - Service d'oncologie médical, CHU de Poitiers - 2 rue de la Milétrie - 86021 Poitiers cedex, Tél : 05.49.44.37.51, E-mail : david.tougeron@chu-poitiers.fr

Patient :

Je soussigné(e) (vos nom et prénom)né(e) le
.....

- ☐ accepte
☐ refuse

La réalisation des prélèvements décrits ci-dessus et leur utilisation dans le cadre du programme de recherche KRASCIPANC

- ☐ accepte
☐ refuse

La conservation des échantillons non utilisés et leur utilisation ultérieure à des fins de recherche dans le cadre de ma pathologie

Date :

Signature :

Médecin responsable :

Nom :

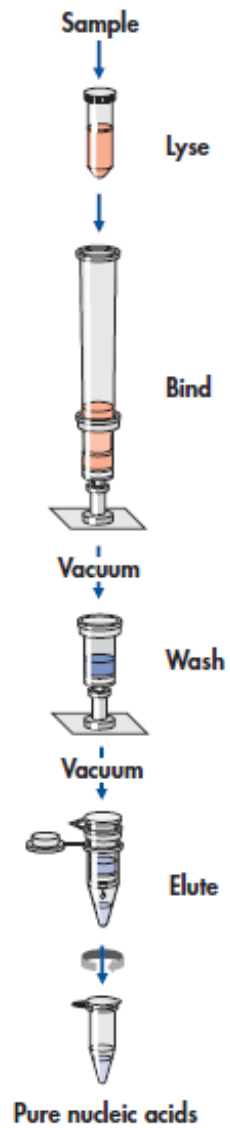
Prénom :

Date :

Signature :

- Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du code civil), ce prélèvement ne pourra être cédé à titre commercial, ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice.
- Les données médicales associées au prélèvement seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition conformément à la loi. (Loi relative à l'informatique et aux libertés du 6 janvier 1978 modifiée le 6 août 2004).
- Les informations portées sur ce document sont confidentielles et couvertes par le secret médical. A aucun moment, les données personnelles qui y figurent n'apparaîtront lors de la publication des résultats des travaux de recherche.

The QIAamp Circulating Nucleic Acid Procedure



Annexe 4 : Exemple de plaque de ddPCR enregistrée dans le logiciel QuantaSoft® pour analyse par le lecteur de gouttelettes.

*	01	02	03	04	05
A	09-JM 1 R RED U 68 U 221	09-JM 5 R RED U 2 U 336	10-JD 3 R RED U 0 U 77.2	13-NB 1 R RED U 2.1 U 56.9	13-NB 4 R RED U 0 U 138
B	09-JM 1 R RED U 69 U 224	09-JM 5 R RED U 1.7 U 335	10-JD 3 R RED U 0 U 80	13-NB 1 R RED U 1.3 U 56.6	13-NB 4 R RED U 0.18 U 140
C	09-JM 2 R RED U 4.1 U 263		10-JD 3 R RED U 0 U 81	13-NB 1 R RED U 1.1 U 55.6	
D	09-JM 2 R RED U 3.1 U 276	10-JD 1 R RED U 0.09 U 49.4	10-JD 4 R RED U 0.08 U 223	13-NB 2 R RED U 0.32 U 111	
E	09-JM 3 R RED U 20.6 U 239	10-JD 1 R RED U 0.09 U 54.6	10-JD 4 R RED U 0 U 219	13-NB 2 R RED U 0 U 106	WT R RED U 0.16 U 102
F	09-JM 3 R RED U 22.5 U 246	10-JD 1 R RED U 0 U 48.4	10-JD 5 R RED U 0.09 U 47	13-NB 2 R RED U 0.23 U 117	WT R RED U 0.08 U 110
G	09-JM 4 R RED U 1.5 U 216	10-JD 2 R RED U 0 U 126	10-JD 5 R RED U 0 U 44.3	13-NB 3 R RED U 0.08 U 202	HCT 116 R RED U 4.4 U 81
H	09-JM 4 R RED U 1.4 U 204	10-JD 2 R RED U 0 U 112	10-JD 5 R RED U 0 U 41.3	13-NB 3 R RED U 0.16 U 199	Blanc R RED U 0 U 0

Annexe 5 : ADNcf et ADNct muté KRAS : résultats des premiers prélèvements (au C1J1) pour
les 28 patients de la cohorte.

Code patient	ADNcf Q.S (ng/mL plasma)	ADNcf Q (ng/mL plasma)	ADNct détectable?	ADNct en FA (%)	ADNct en NC KRAS /mL
01-VD	8,79	9,20	oui	0,26	7,25
02-MD	6,37	5,20	oui	0,13	7,68
03-NI	34,85	32,60	oui	0,22	24,32
04-LB	52,10	55,70	oui	1,68	265,00
05-MP	12,00	15,00	non	0,06	2,42
06-FQ	2,88	8,83	non	0,00	0,00
07-JF	90,80	105,60	oui	11,90	3291,00
08-FD	11,90	17,10	non	0,00	0,00
09-JM	61,40	53,40	oui	23,60	4384,00
10-JD	7,20	11,10	non	0,00	0,00
11-AB	7,51	11,50	oui	0,87	19,77
12-MJ	73,70	70,80	oui	11,50	2757,00
13-NB	8,10	9,00	oui	2,40	58,23
14-JM	3,10	8,80	oui	0,26	2,56
15-MC	65,28	93,89	oui	0,39	76,80
16-LB	5,10	6,00	non	0,00	0,00
17-VM	26,80	29,40	oui	5,80	467,00
18-JM	139,40	119,10	oui	29,80	12624,00
19-CS	7,68	14,40	non	0,00	0,00
20-JQ	5,69	11,14	oui	0,33	5,97
21-FG	30,90	52,40	non	0,00	0,00
22-DT	2,44	5,38	non	0,00	0,00
23-MT	5,21	8,64	non	0,00	0,00
24-FC	10,98	14,21	oui	3,00	98,10
25-CA	41,11	43,78	oui	10,30	1277,00
26-MR	10,07	12,60	oui	0,30	9,10
27-ML	14,22	22,82	non	0,00	0,00
28-AA	12,99	19,12	oui	2,50	96,71

Légende : Q.S : Quanta Soft, logiciel de ddPCR ; Q : Quantus ; FA : fréquence allélique ; NC : nombre de copies
mutées KRAS

Impact pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie de l'ADN circulant dans les adénocarcinomes pancréatiques non résécables.

Introduction : L'incidence du cancer du pancréas est en constante augmentation et son pronostic reste sombre malgré les progrès récents. Le plus souvent diagnostiqué à un stade non résécable, il n'existe aujourd'hui pas de marqueur prédictif ou pronostique robuste pour cette pathologie. Nous avons analysé les taux d'ADN circulant total (ADNcf) et d'ADN circulant tumoral muté *KRAS* (ADNct) ainsi que leur cinétique, comme facteur pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie.

Matériels et méthodes : 28 patients porteurs d'un cancer du pancréas non résécable ont été inclus en amont de leur première chimiothérapie. L'ADN circulant total a été dosé à différents temps du traitement et la recherche de mutation *KRAS* a été faite par ddPCR pour définir la quantité d'ADN circulant tumoral.

Résultats : La valeur initiale brute d'ADNcf est un facteur pronostique fort ($P < 0.001$), l'ADNct muté *KRAS* est également significatif ($P = 0.023$). La SSP est statistiquement corrélée à l'ADNcf ($P = 0.0023$). Le taux d'ADNct au J15 possède une valeur prédictive très puissante ($P < 0.0001$), tandis que le taux d'ADNcf est prédictif au J28 ($P = 0.004$). Les variations des taux d'ADNcf au J15 ou au J28 ne sont ni prédictives ni pronostiques. La cinétique de l'ADNct muté *KRAS* entre J1 et J15 est corrélée à la SSP ($P = 0.018$) mais sans valeur pronostique ($P = 0.77$).

Discussion : Il existe peu de littérature pour comparer les données de notre travail, cependant nous avons retrouvé des taux initiaux d'ADNcf et d'ADNct plus faibles sans explication évidente. Nous avons pu confirmer le caractère pronostique de l'ADNcf et de l'ADNct ainsi que l'intérêt de la cinétique du taux d'ADNct comme valeur prédictive. Le caractère pronostique de la variation d'ADNct observé dans la littérature n'a pas été retrouvé ici.

Conclusion : Ce travail confirme l'intérêt porté ces dernières années à l'ADN circulant et dévoile une voie de recherche peu explorée : l'ADN circulant total comme marqueur prédictif et pronostique dans les adénocarcinomes pancréatiques non résécables.

Mots clés : Adénocarcinome pancréatique non résécable, ADN circulant, mutation *KRAS*, Digital droplet PCR.

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 !



Impact pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie de l'ADN circulant dans les adénocarcinomes pancréatiques non résécables.

Introduction : L'incidence du cancer du pancréas est en constante augmentation et son pronostic reste sombre malgré les progrès récents. Le plus souvent diagnostiqué à un stade non résécable, il n'existe aujourd'hui pas de marqueur prédictif ou pronostique robuste pour cette pathologie. Nous avons analysé les taux d'ADN circulant total (ADNcf) et d'ADN circulant tumoral muté *KRAS* (ADNct) ainsi que leur cinétique, comme facteur pronostique et prédictif de réponse à la chimiothérapie.

Matériels et méthodes : 28 patients porteurs d'un cancer du pancréas non résécable ont été inclus en amont de leur première chimiothérapie. L'ADN circulant total a été dosé à différents temps du traitement et la recherche de mutation *KRAS* a été faite par ddPCR pour définir la quantité d'ADN circulant tumoral.

Résultats : La valeur initiale brute d'ADNcf est un facteur pronostique fort ($P < 0.001$), l'ADNct muté *KRAS* est également significatif ($P = 0.023$). La SSP est statistiquement corrélée à l'ADNcf ($P = 0.0023$). Le taux d'ADNct au J15 possède une valeur prédictive très puissante ($P < 0.0001$), tandis que le taux d'ADNcf est prédictif au J28 ($P = 0.004$). Les variations des taux d'ADNcf au J15 ou au J28 ne sont ni prédictives ni pronostiques. La cinétique de l'ADNct muté *KRAS* entre J1 et J15 est corrélée à la SSP ($P = 0.018$) mais sans valeur pronostique ($P = 0.77$).

Discussion : Il existe peu de littérature pour comparer les données de notre travail, cependant nous avons retrouvé des taux initiaux d'ADNcf et d'ADNct plus faibles sans explication évidente. Nous avons pu confirmer le caractère pronostique de l'ADNcf et de l'ADNct ainsi que l'intérêt de la cinétique du taux d'ADNct comme valeur prédictive. Le caractère pronostique de la variation d'ADNct observé dans la littérature n'a pas été retrouvé ici.

Conclusion : Ce travail confirme l'intérêt porté ces dernières années à l'ADN circulant et dévoile une voie de recherche peu explorée : l'ADN circulant total comme marqueur prédictif et pronostique dans les adénocarcinomes pancréatiques non résécables.

Mots clés : Adénocarcinome pancréatique non résécable, ADN circulant, mutation *KRAS*, Digital droplet PCR.