

Génétique et Biologie moléculaire des adénocarcinomes pancréatiques

DIU chirurgie hépato bilio pancréatique
et transplantation hépatique

Dr Jean-Baptiste OUDART
Médecin biologiste
Laboratoire de Biochimie – Pharmacologie – Toxicologie

Généralités

Pancréas : 2^{ème} cause de mortalité par cancer en 2020-2030



Oncologie moléculaire

Somatique

Constitutionnelle

CaFaPa

Population à risque de cancer du pancréas

Susceptibilité génétique dans 5 à 10% des cancer pancréatiques

Histoire familiale

- AP chez au moins 2 apparentes au 1^{er} degré
- Au moins 3 cas de la même branche quels que soient le degré de parenté et l'âge de survenue (TNCD)

Syndrome génétique

Mutation germinale connue :

- BRCA2
- CDKN2A
- STK11
- PRSS1

Risque de cancer du pancréas > 5%

Established and Suggested Pancreatic Cancer Susceptibility Gene

	Gene(s)	Genetic syndrome	Risk of pancreatic cancer
High penetrance genes	BRCA2	Hereditary breast and ovarian cancer	OR = 3.5 (95% CI 1.87–6.58) [28]
	STK11/LKB1	Peutz-Jeghers	SIR = 132 (95% CI 44–261) [75]
	<i>PALB2</i>	Familial breast cancer	Increased [18]
	PRSS1	Hereditary pancreatitis	SIR = 53 (95% CI 23–105) [50]
	SPINK1		
	CDKN2A	Familial melanoma	SIR = 13–38 [76]
	Unknown	Familial pancreatic cancer	SIR = 6–32 [25,77]
Possible high to moderate penetrance genes	Mismatch repair genes	Hereditary non-polyposis colorectal cancer	No effect up to SIR 8.6 (95% CI, 4.7–15.7) [42–44]
	BRCA1	Hereditary breast and ovarian cancer	No effect up to OR = 2.26 (95% CI 1.26 to 4.06) [30,34,35]
Low penetrance genes	ABO		OR = 1.20 (95% CI 1.12–1.28, per allele) [19]
	CFTR		OR = 1.40; 95% CI, 1.04–1.89 [78]
Genomic regions with genome-wide significant evidence of association ($P < 5 \times 10^{-8}$)	1q32.1		OR = 0.77, 95% CI 0.71–0.84 [58]
	<i>13q22.1</i>		OR = 1.26, 95% CI 1.18–1.35 [58]

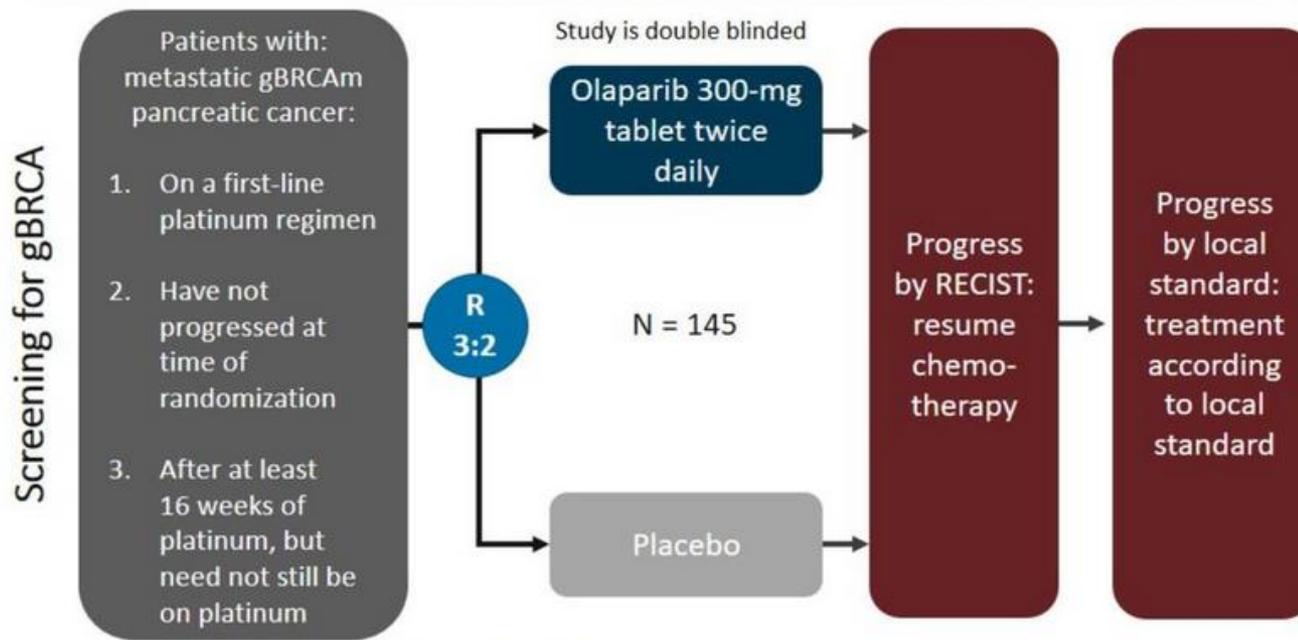
Etude POLO NCT02184195

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer

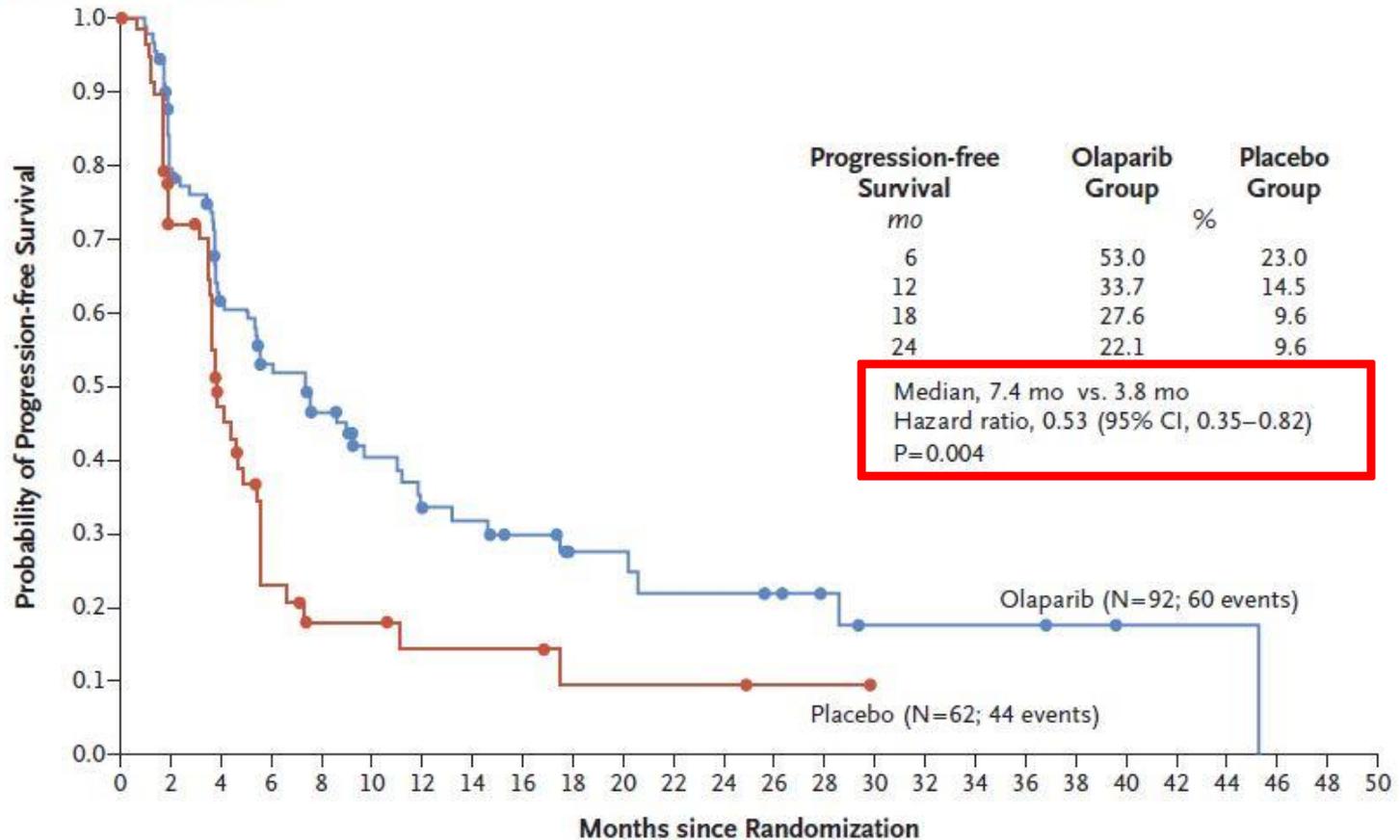
Talia Golan, M.D., Pascal Hammel, M.D., Ph.D., Michele Reni, M.D.,



- Primary endpoint is PFS (by central review)
- Secondary endpoints are OS, PFS2 by investigator assessment, ORR, DCR, safety, quality of life

Maintenance olaparib

A Progression-free Survival



No. at Risk

Olaparib	92	69	50	41	34	24	18	17	14	10	10	8	8	7	5	3	3	3	3	2	1	1	1	0
Placebo	62	39	23	10	6	6	4	4	4	2	2	2	2	1	1	0								

AP : une place pour la biologie moléculaire ?

Imagerie



**Biologie
(CA 19-9)**



**Diagnostic d'AP
Classification
Opérabilité
Pronostic**

Anapath



Biologie moléculaire



?

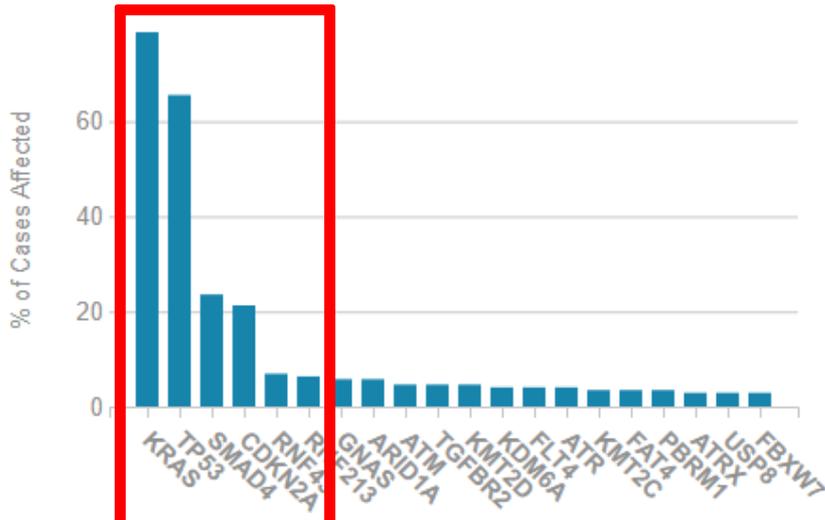
Profil mutationnel des AP

NIH NATIONAL CANCER INSTITUTE

The Cancer Genome Atlas

KRAS

Type	Consequences	Genes	Cases in Cohort	% of Cases
Substitution	Missense	KRAS G12D	59 / 171	34.50%
Substitution	Missense	KRAS G12V	41 / 171	23.98%
Substitution	Missense	KRAS G12R	28 / 171	16.37%
Substitution	Stop Gained	CDKN2A R80*	6 / 171	3.51%
Substitution	Missense	TP53 R248W	5 / 171	2.92%
Substitution	Missense	TP53 R175H	5 / 171	2.92%
Substitution	Missense	KRAS Q61H	4 / 171	2.34%
Substitution	Missense	GNAS R844C	4 / 171	2.34%
Substitution	Missense	SMAD4 R361C	4 / 171	2.34%
Substitution	Missense	TP53 R282W	4 / 171	2.34%

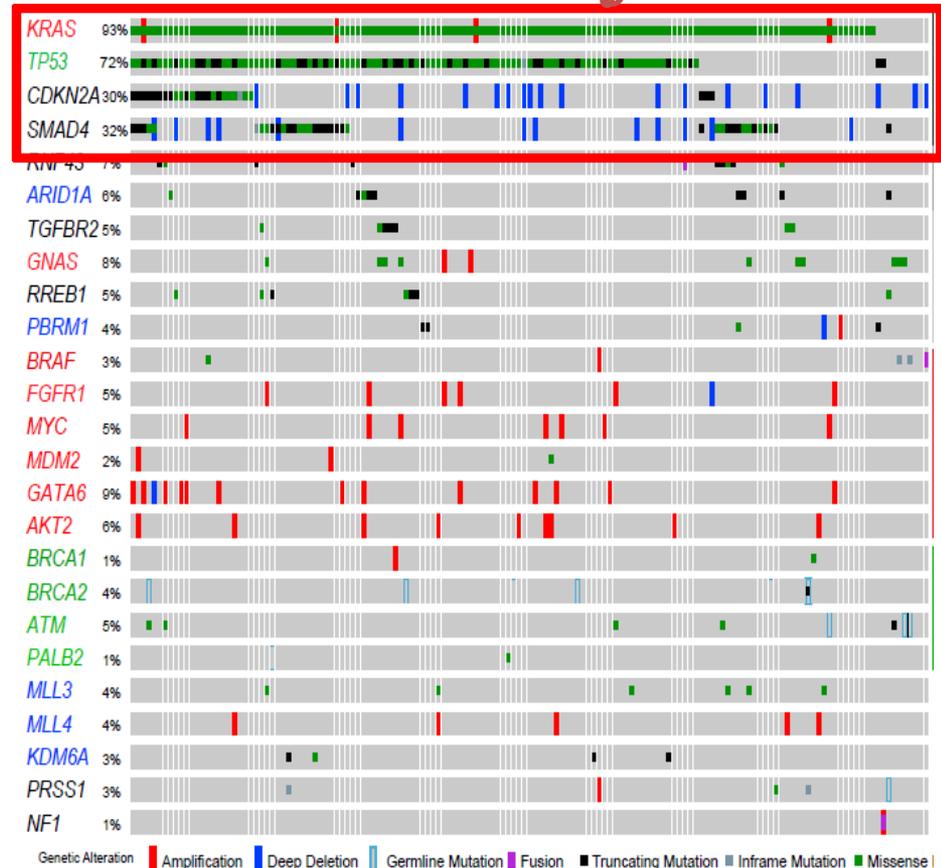


Cancer Cell

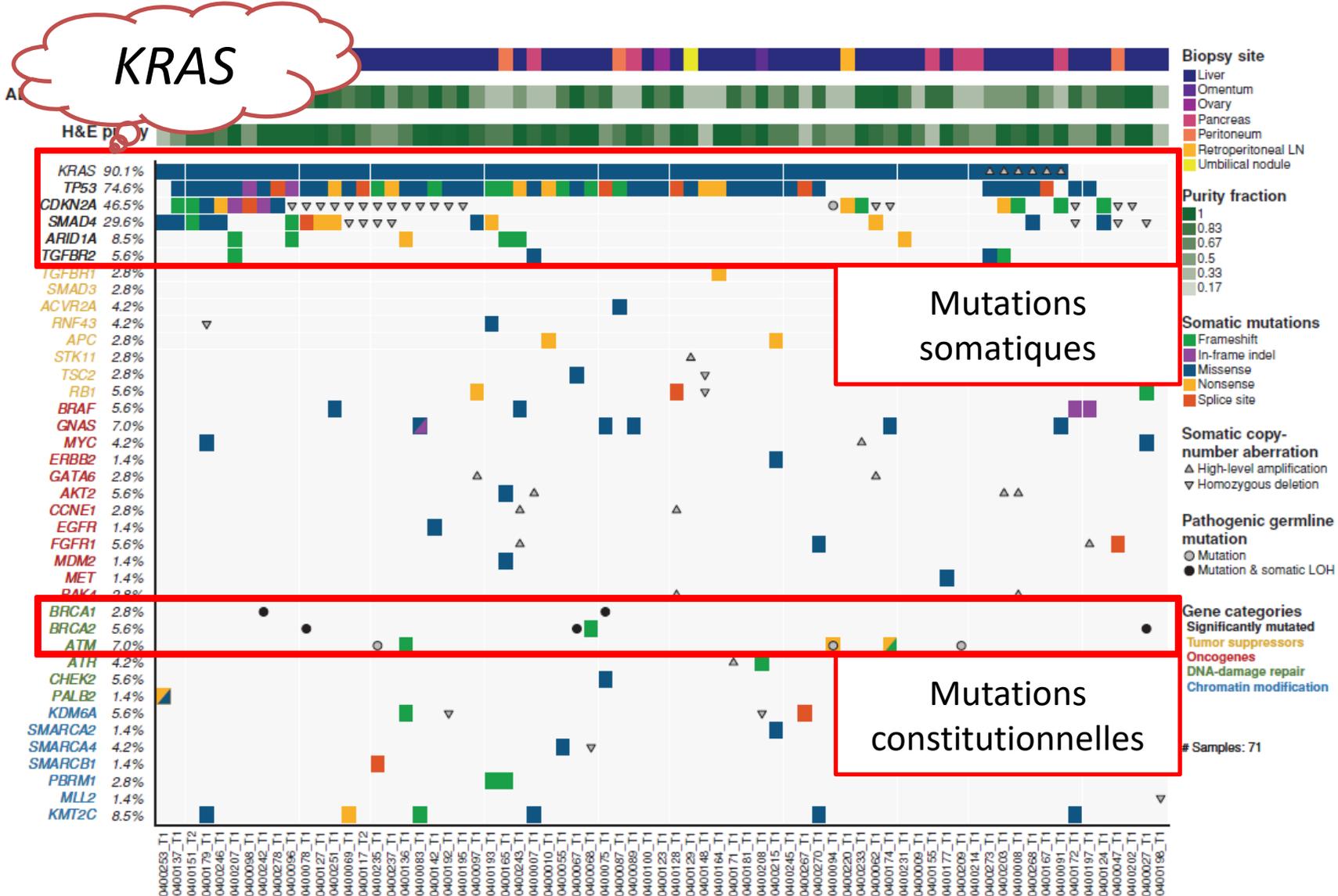
Article

Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

KRAS



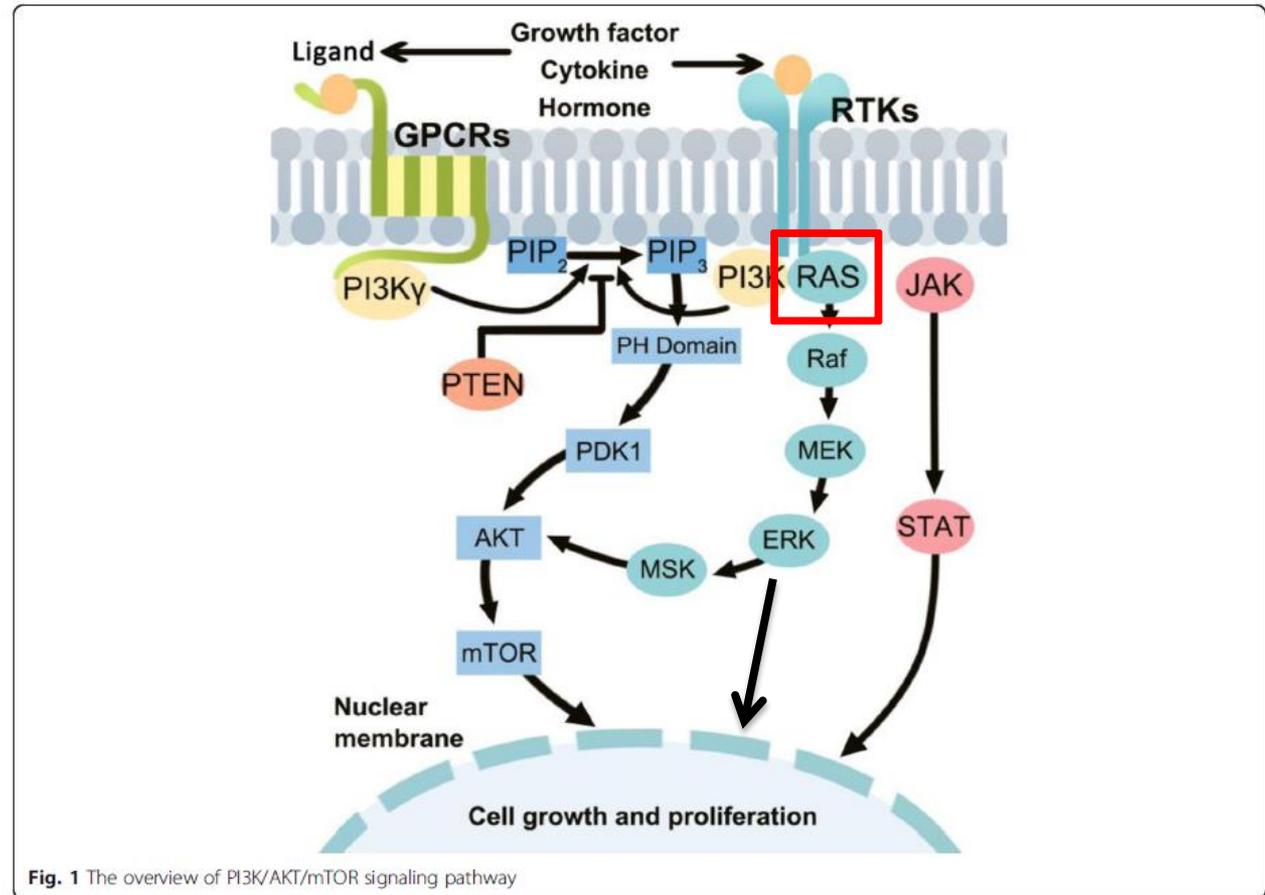
Mutations somatiques vs constitutionnelles



KRAS ?

80 à 90% des AP
sont mutés *KRAS*

KRAS active la voie
des MAP Kinases



-> *KRAS* est de loin le gène le plus étudié dans les tumeurs pancréatiques

Quels prélèvements et quelles techniques ?

Analyse de la tumeur Biopsie ou pièce opératoire

Copeaux
(inclus en paraffine)



Lames



ADN tumoral circulant

Sang



Autres liquides
-> Ascite ...

Analyse constitutionnelle

Sang

Frottis buccal ...

Techniques ciblées



Sanger

qPCR

ddPCR

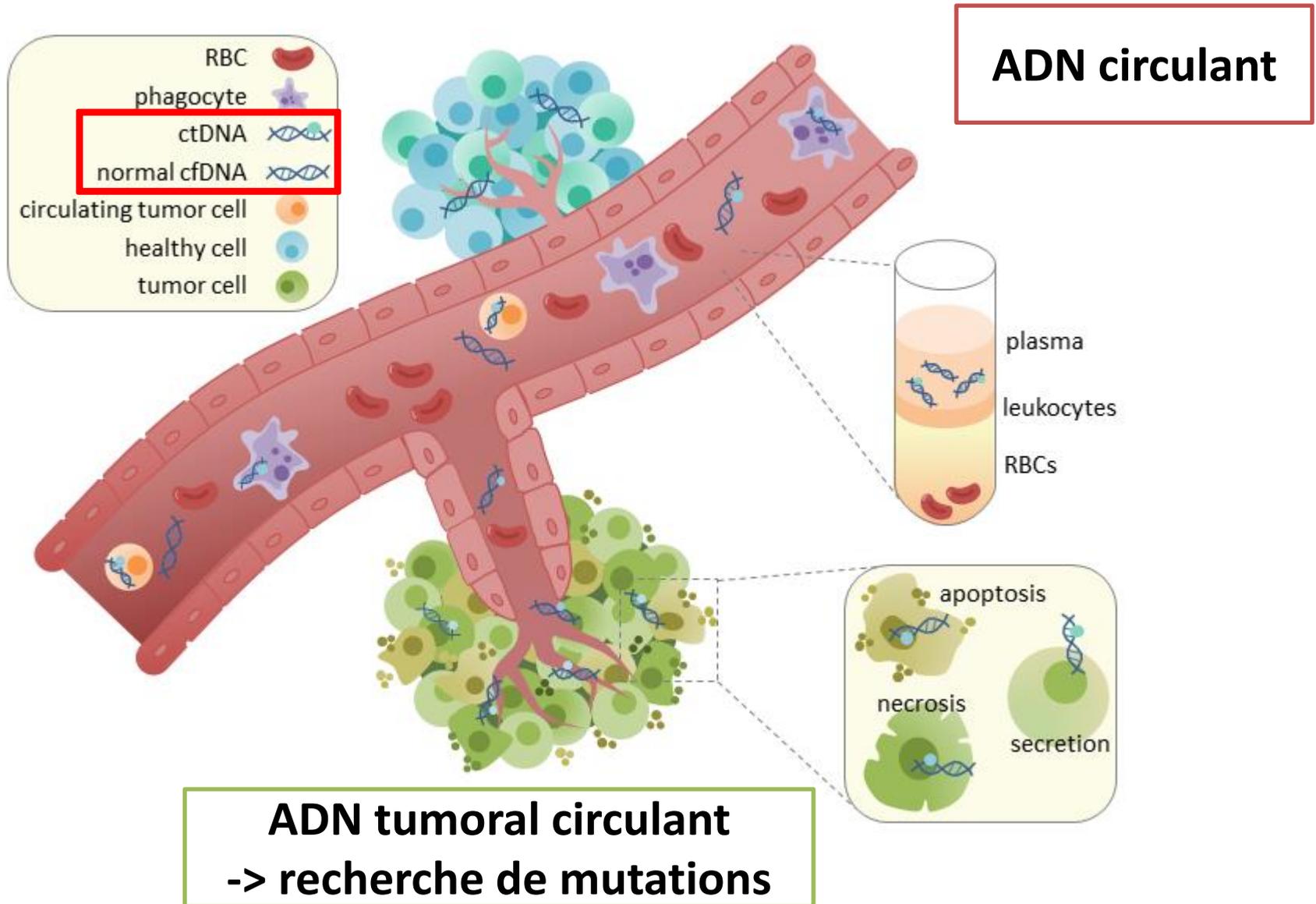
Panel de gènes



NGS

Exome

ADN circulant



Recherche d'ADN (tumoral) circulant



Tubes
spécifiques



Renseignements
cliniques obligatoires

- Diagnostic anapath
- Stade
- Contexte de la demande :
 - Diagnostic
 - Opérabilité
 - Pronostic
 - Suivi

Acheminement à
température ambiante au
laboratoire

Pas de délai
(stable 5 jours)

ADN circulant et/ou ADN tumoral circulant ...

Nous avons tous de l'ADN circulant
Cette concentration augmente dans de nombreuses circonstances

- Exercice physique
- Tabagisme
- Grossesse
- Maladies inflammatoires
- Sepsis
- Traumatisme
- Réanimation

Intérêt potentiel de ce nombre de copies dans le diagnostic et le pronostic ??

Il est donc préférable de rechercher d'ADN tumoral circulant ? -> mutation *KRAS* ?



ORIGINAL ARTICLE

High prevalence of mutant *KRAS* in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients

Annals of Oncology 28:741-747, 2017
doi:10.1093/annonc/mdx004
Published online 19 January 2017

Table 2. Liquid biopsy mutant *KRAS* call rates

Stage of disease	cf <i>KRAS</i> mutant call rate (%)
Discovery cohort	
Healthy	8/54 (14.8)
Localized	15/33 (45.5)
Localized postsurgical	0/20 (0)
Locally advanced	4/13 (30.8)
Metastatic	11/19 (57.9)
Validation cohort	
Healthy	-
Localized	-

Mutation *KRAS* détectable dans le sang des individus sains

Intérêt potentiel dans le diagnostic différentiel

Endoscopic Ultrasound-guided Fine-Needle Aspiration Biopsy Coupled With a *KRAS* Mutation Assay Using Allelic Discrimination Improves the Diagnosis of Pancreatic Cancer

Barbara Bournet, MD, PhD,*† Janick Selves, MD,†‡ David Grand, MSc,‡ Marie Danjoux, MD,‡
Naima Hanoun, MSc,† Pierre Cordelier, PhD,† and Louis Buscail, MD, PhD*†

TABLE 4. Performances of Cytopathology Alone, of *KRAS*-mutation Analysis, and Both Tests Together Using EUS-guided Fine-Needle Aspiration to Assess the Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Versus Other Malignant or Benign Solid Pancreatic Lesions (95% Confidence Intervals are Given in Parenthesis)

Adenocarcinoma vs. Other Pancreatic Lesions	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Cytopathology alone	72% (62-80)	100% (95-100)	100% (95-100)	74% (64-82)	84% (76-88)
<i>KRAS</i> analysis alone	71% (61-79)	99% (93-99)	99% (92-99)	73% (73-80)	83% (75-87)
Combination of cytopathology and <i>KRAS</i> analysis	90% (83-95)	99% (93-99)	99% (92-99)	89% (73-80)	94% (85-97)

TABLE 5. Performances of Cytopathology Alone, of *KRAS*-mutation Analysis, and Both Tests Using EUS-guided Fine-Needle Aspiration to Assess the Diagnosis of Pancreatic Malignancies Versus Benign Solid Pancreatic Lesions (95% Confidence Intervals are Given in Parenthesis)

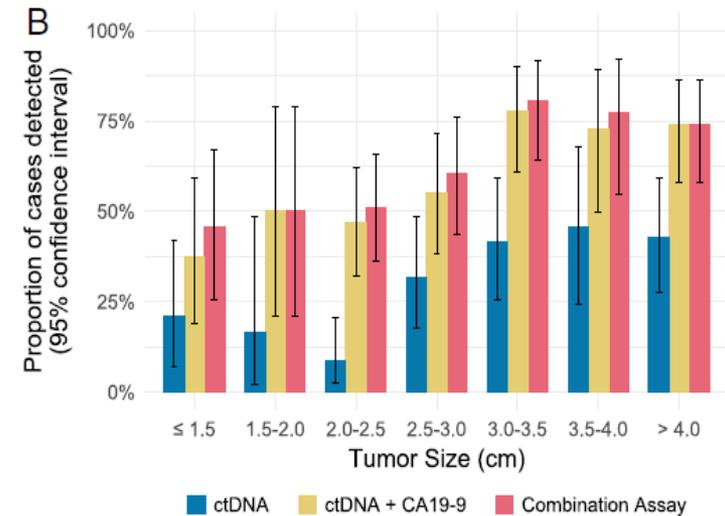
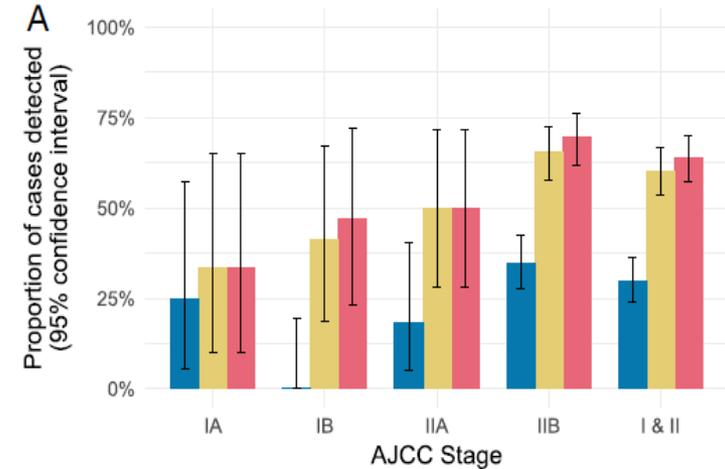
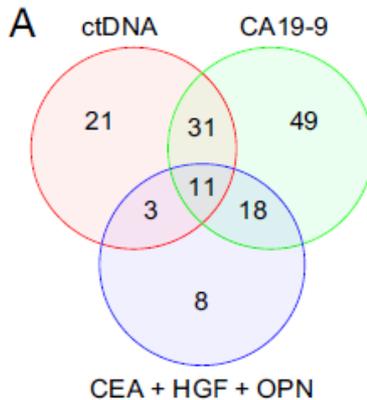
Malignant vs. Benign Lesions	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Cytopathology alone	77% (68-84)	100% (94-100)	100% (96-100)	67% (57-77)	84% (71-88)
<i>KRAS</i> analysis alone	59% (49-67)	99% (91-99)	99% (93-99)	53% (53-63)	71% (58-77)
Combination of cytopathology and <i>KRAS</i> analysis	91% (83-95)	99% (93-99)	99% (94-99)	88% (80-94)	94% (83-97)

Une recherche de mutation de *KRAS* dans les biopsies pourrait permettre d'aider au diagnostic différentiel entre AP et les autres lésions pancréatiques

Combinaisons avec des marqueurs sériques

Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers

Assay type	% samples detected (95% confidence interval)						
	≤ 1.5 cm, 24 cases	1.5–2.0 cm, 12 cases	2.0–2.5 cm, 47 cases	2.5–3.0 cm, 38 cases	3.0–3.5 cm, 36 cases	3.5–4.0 cm, 22 cases	>4.0 cm, 42 cases
ctDNA	21 (7–42)	17 (2–48)	9 (2–20)	32 (18–49)	42 (26–59)	45 (24–68)	43 (28–59)
CA19-9	25 (10–47)	33 (10–65)	43 (28–58)	45 (29–62)	58 (41–74)	59 (36–79)	67 (50–80)
CEA + HGF + OPN	25 (10–47)	8 (0–38)	17 (8–31)	21 (10–37)	8 (2–22)	18 (5–40)	24 (12–39)
ctDNA + CA19-9	38 (19–59)	50 (21–79)	47 (32–62)	55 (38–71)	78 (61–90)	73 (50–89)	74 (58–86)
ctDNA + CEA + HGF + OPN	38 (19–59)	25 (5–57)	26 (14–40)	47 (31–64)	47 (30–65)	55 (32–76)	50 (34–66)
CA19-9 + CEA + HGF + OPN	38 (19–59)	33 (10–65)	47 (32–62)	53 (36–69)	64 (46–79)	64 (41–83)	67 (50–80)
Combination assay	46 (26–67)	50 (21–79)	51 (36–66)	61 (43–76)	81 (64–92)	77 (55–92)	74 (58–86)



Intérêt de l'association entre ADNtc et dosage du CA19.9

Rôle pronostique de la recherche d'ADNtc

PDAC Patient Number (Control)	Type of Tumour: Resected, Locally Advanced, Metastatic, All	Site	Target for ctDNA	% of Mutations or Genetic Alterations in PDAC Patients	Diagnosis Performances	Positive Correlation with a Poor Prognosis (OS) (p) *	Reference
135 (No)	All	Plasma	KRAS mutation NGS/dPCR	41 (LA and Meta.)	-	LA + Met: Yes— $p < 0.001$ Resected: Yes—0.027; Yes—0.03 **	Pietrasz et al., 2017 [69]
60 (No)	LA + Meta.	Plasma	KRAS mutation BEAMing	65	-	Yes—0.001 Yes—0.0022 **	Van Laethem et al., 2017 [70]
95 (No)	All	Plasma	28 genes Methylation-specific PCR	27 (>10 hypermethylated genes)	-	Yes	Henriksen et al., 2017 [85]
26 (26: 14 CP and 12 HC)	All	Plasma	KRAS mutation dPCR NGS: KRAS, SMAD4, CDKN2A and TP53	NGS: 27 dPCR: 23	-	Yes—0.018 ****	Adamoet al., 2017 [66]
27 (43 HC)	LA + Meta.	Plasma	KRAS mutation dPCR	70.4	-	No—0.16—0.24 ***	Del Re et al., 2017 [72]
221 (182 HC)	R	Plasma	KRAS mutation PCR Safe-Sequencing System	30	Sensitivity: 30% Specificity: 99.5%	-	Cohen et al., 2017 [73]
34 (No)	All	Plasma	NGS: 25 genes (including KRAS)	25 genes: 74 KRAS only: 29	-	Yes—0.045	Pishvaian et al., 2017 [74]
106 (No)	All	Plasma	KRAS mutation dPCR	68(R), 72(LA), 87(M)	Sensitivity: 78% Specificity: 33%	Yes—0.008 Yes—0.003 ***	Kim et al., 2018 [75]
65 (20 HC)	All	Plasma	KRAS mutation dPCR	80	-	No—0.73	Lin et al., 2018 [77]
45 (No)	R	Serum	KRAS mutation teal-time quantitative PCR	55	-	Pre-operative samples: No—0.258—0.710 ** Post-operative samples: Yes—0.027 **	Nakano et al., 2018 [76]

La présence d'ADN tumoral circulant est un facteur de mauvais pronostic

Rôle pronostique de l'ADNtc

Patel et al. *Journal of Hematology & Oncology* (2019) 12:130
<https://doi.org/10.1186/s13045-019-0824-4>

Journal of
Hematology & Oncology

SHORT REPORT

Open Access

Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer



Hitendra Patel^{1†}, Ryosuke Okamura^{1†}, Paul Fanta¹, Charmi Patel², Richard B. Lanman³, Victoria M. Raymond³, Shumei Kato¹ and Razelle Kurzrock¹

Conclusions: Our findings showed that ctDNA often harbored unique alterations some of which may be targetable and that significantly greater numbers of ctDNA alterations occur in advanced versus resectable disease. Furthermore, higher ctDNA levels were a poor prognostic factor for survival.

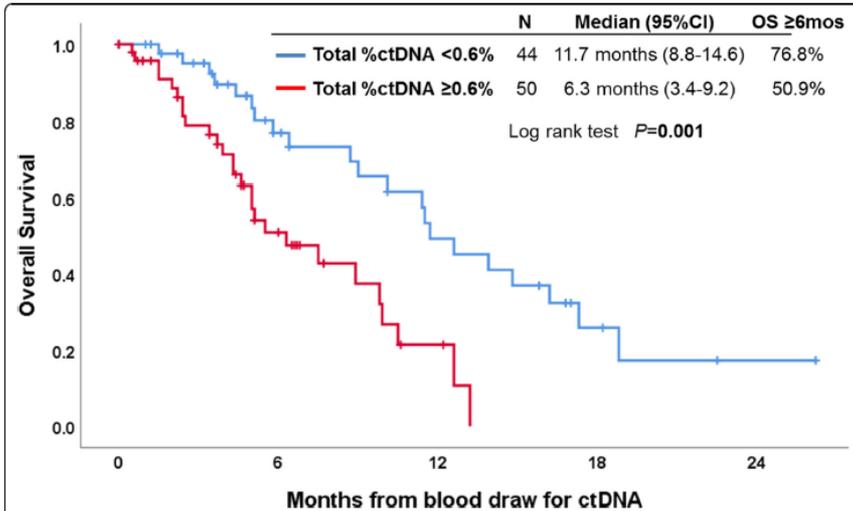
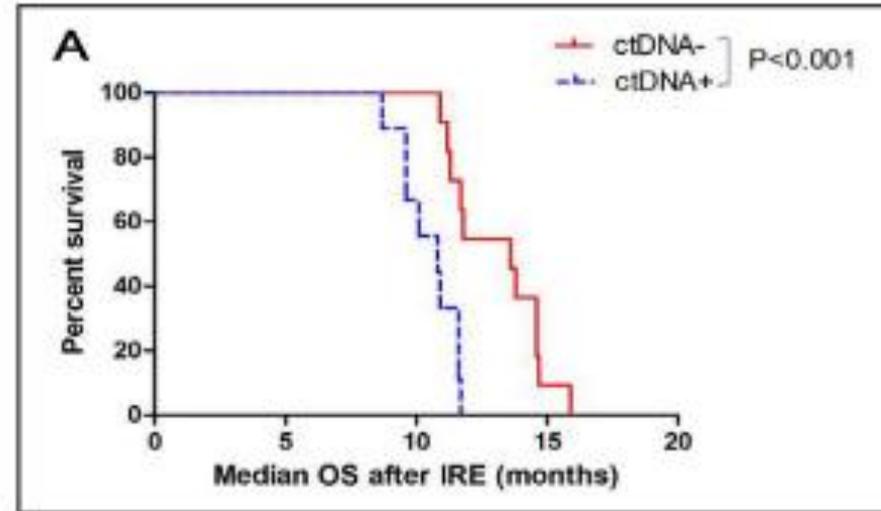


Fig. 2 Kaplan-Meier curve for overall survival from ctDNA analysis depending on total %ctDNA (characterized alterations only) dichotomized at the median among patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma (N = 94)

Circulating Tumor DNA as a Sensitive Marker in Patients Undergoing Irreversible Electroporation for Pancreatic Cancer

Détection d'ADNtc *KRAS+*
dans 29% des cas



OS

ADNtc + : 11,4 mois

ADNtc - : 14,3 mois

ADNtc ne se substitue pas à une analyse tissulaire

Patel et al. *Journal of Hematology & Oncology* (2019) 12:130
<https://doi.org/10.1186/s13045-019-0824-4>

Journal of
Hematology & Oncology

SHORT REPORT

Open Access



Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer

Hitendra Patel^{1†}, Ryosuke Okamura^{1†*}, Paul Fanta¹, Charmi Patel², Richard B. Lanman³, Victoria M. Raymond³, Shumei Kato¹ and Razelle Kurzrock¹

La corrélation entre mutations tissulaires et ADNtc n'est pas parfaite

Patients with pancreatic ductal adenocarcinoma who had both ctDNA and tissue DNA sequencing (N = 66)

	Tissue DNA (+)	Tissue DNA (-)	Overall concordance* (%)	Kappa (SE)
<i>KRAS</i> ctDNA (+)	28 (42%)	0 (0.0%)	52	0.14 (0.1)
<i>KRAS</i> ctDNA (-)	32 (48%)	6 (9.1%)		

Dans certains cas la mutation présente dans la tumeur n'est pas retrouvée dans le sang

Sensibilité de la recherche de mutations de *KRAS* dans le plasma :

- 70 – 80% pour les stades métastatiques ou localement avancés
- 30 – 68% pour les tumeurs résécables

- Faibles quantités d'ADN tumoral circulant ?
- ADN dégradé non amplifiable ?
- Manque de sensibilité de la technique utilisée ?

Conclusion

- Différentes techniques de BM peuvent être utilisées dans le cancer du pancréas, essentiellement la PCR digitale et le NGS
- *KRAS* : principal gène muté dans les AP
- Intérêt potentiel dans le diagnostic des AP en association avec les marqueurs sériques comme le CA19.9
- Intérêt dans le pronostic des AP : la présence d'ADNtc détectable est associée à une PFS/OS plus courte
- Néanmoins : attention à l'interprétation des résultats d'ADNtc
 - Certains patients n'ont pas d'ADNtc y compris lors des stades avancés
 - De l'ADNtc *KRAS*+ a été décrit chez des sujets « sains »