

# Adénocarcinome du pancréas : à quand un traitement personnalisé ?

## Adenocarcinoma of the Pancreas: When a Personalized Treatment?

Juan Iovanna

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) - INSERM U1068 - CNRS UMR 7258 - Aix-Marseille Université et Institut Paoli-Calmettes - Parc Scientifique et Technologique de Luminy - Marseille - France.

### Mots clés

- ◆ Cancer du pancréas
- ◆ Médecine individualisée
- ◆ Chimiogramme
- ◆ Expression génique

### Résumé

Un des obstacles majeurs au traitement des patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique (ADCP) est la forte hétérogénéité moléculaire de cette maladie, qui se traduit par une évolution et une réponse extrêmement variables aux thérapies. Nous avons développé une stratégie dans laquelle les tumeurs de 17 patients consécutifs ont été recueillies par cytoponction endoscopique écho-guidée (EUS-FNA) ou par chirurgie. Nous les avons conservées en xénotransgreffe chez la souris (tumeurs respirantes) et par l'établissement des cultures primaires des cellules épithéliales. L'analyse pan-transcriptomique (50 000 transcrits analysés) a été réalisée sur les tumeurs. Comme attendu, nous avons observé une forte hétérogénéité dans le profil d'expression des ARNs entre les tumeurs. De plus, l'analyse bioinformatique de ces données a permis de distinguer les patients présentant une survie plus ou moins longue. Ces patients étaient respectivement porteurs de tumeurs modérément ou peu différenciées. La culture primaire de cellules nous a permis d'analyser leur sensibilité relative aux médicaments anticancéreux *in vitro* par un chimiogramme, un concept similaire à l'antibiogramme réalisé sur les micro-organismes, permettant l'établissement d'un profil individuel de sensibilité aux médicaments. Comme prévu, la réponse était variable et dépendante du patient. Un fait marquant et prometteur est à signaler : l'analyse transcriptomique était également capable de prédire la sensibilité des cellules aux cinq médicaments anticancéreux que nous avons utilisés et les marqueurs identifiés par cette méthode étaient spécifiques pour chaque drogue. En conclusion, en utilisant cette approche, nous avons constaté que l'analyse transcriptomique peut prévoir la sensibilité aux médicaments anticancéreux et l'évolution clinique des patients atteints d'un ADCP.

### Keywords

- ◆ Pancreatic cancer
- ◆ Personalized medicine
- ◆ Chemogram
- ◆ Gene expression

### Abstract

A major obstacle to the treatment of patients with a pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the important molecular heterogeneity of this disease, which results in a variable clinical evolution and inconstant response to therapies. We have developed a strategy in which the tumor 17 consecutive patients were collected by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) or surgery. We have kept in xenograft mice and established the primary cultures of epithelial cells. The pan-transcriptome analysis (50,000 transcripts) was performed on these xenografts. As expected, we observed a strong heterogeneity in the RNAs expression profile between tumors. In addition, bioinformatics analysis of these data allowed us to distinguish short or long survivors. These patients were respectively carriers of moderately or poorly differentiated tumors. The primary culture of the xenografts-derived cells enabled us to analyze their relative sensitivity to anticancer drugs *in vitro* by a chemogram, a concept similar to testing the susceptibility of microorganisms to antibiotics, allowing the establishment of a profile of drug sensitivity corresponding for each patient. Unsurprisingly, the response was variable and dependent on the patient. We also found that transcriptomic analysis predicts the sensitivity of cells to the five anticancer drugs most frequently used to treat patients with PDAC. In conclusion, using this approach, we found that the transcriptomic analysis can predict the sensitivity to anticancer drugs and the clinical course of patients with PDAC.

## Introduction et but du travail

L'adénocarcinome pancréatique (ADCP) est responsable d'environ 230.000 décès par an dans le monde entier. Malgré les efforts considérables engagés dans la recherche au cours des dernières décennies, les approches conventionnelles de traitement, y compris la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, ou leur combinaison, ont eu un impact très limité dans

l'évolution et le pronostic de cette maladie. En fait, un obstacle majeur dans le traitement de l'ADCP est son hétérogénéité moléculaire, qui se reflète clairement dans la diversité de leur évolution et dans les réponses aux traitements. Ainsi, le point de départ de ce travail est basé, d'une part, sur le constat d'une évolution extrêmement hétérogène des patients atteints d'un ADCP, avec une survie qui peut aller de deux à trois mois jusqu'à plus de cinq ans pour certains cas et d'autre part, l'observation d'une forte différence de suscepti-

### Correspondance :

Juan Iovanna, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) - INSERM U1068 - CNRS UMR 7258 - Aix-Marseille Université et Institut Paoli-Calmettes - Parc Scientifique et Technologique de Luminy - Marseille - France.  
Tel : 04 91 82 88 03 - E-mail : [juan.iovanna@inserm.fr](mailto:juan.iovanna@inserm.fr)

bilité de ces patients aux médicaments classiques ou nouveaux. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par le fait que chaque ADCP résulte de la combinaison de plusieurs modifications dans les voies de signalisation intracellulaires ce qui entraînerait une susceptibilité variable aux médicaments, à la progression tumorale et au développement de métastases et, *in fine*, à la survie des patients. Les approches thérapeutiques actuellement proposées aux patients ne prennent malheureusement pas en compte cette hétérogénéité. En effet, les médicaments reçus par les patients atteints d'un ADCP sont choisis en fonction de leur état général et du stade de leur maladie. Aucune étude des tumeurs ne peut prédire actuellement sa réponse aux traitements ni donner une approximation en ce qui concerne la progression de la maladie pour chaque individu. Par exemple, le taux de réponse objective est de 31,6 % chez les patients traités avec du Folfirinox et de seulement 9,4 % pour ceux traités avec la gemcitabine démontrant que respectivement près de 70 % et 90 % des patients ne sont pas répondeurs. Distinguer ces différentes populations de patients a été le défi que nous avons voulu relever dans ce travail.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la variabilité dans l'évolution et la réponse aux traitements observées chez les patients atteints d'un ADCP sont principalement dues à des caractéristiques moléculaires intrinsèques des cellules pancréatiques cancéreuses. Afin de caractériser cette hétérogénéité, nous avons obtenu 17 xénogreffes humaines dérivées d'ADCP et établi la culture primaire de leurs cellules correspondantes. Ensuite, nous avons caractérisé les 17 xénogreffes au niveau transcriptomique sur plus de 50.000 ARN et l'analyse de ces données a montré une hétérogénéité extrêmement importante. L'étude bio-informatique des données du transcriptome nous a permis de discriminer les patients avec une survie longue ou courte, ce qui correspondait à des formes respectivement moyennement ou mal différenciées. Ensuite, nous avons traité les cellules dérivées des ADCP avec différentes concentrations (de 0 à 1000  $\mu\text{M}$ ) des cinq médicaments anticancéreux utilisés dans le traitement de cette pathologie et trouvé, comme prévu, que les réponses étaient dépendantes des patients. Un fait remarquable et d'un intérêt clinique majeur est que l'utilisation de cette approche transcriptomique a permis de prédire la sensibilité des cellules cancéreuses aux cinq médicaments anticancéreux utilisés pour le traitement des patients souffrant d'un ADCP.

## Méthodes

### Développement des xénogreffes d'ADCP

Trois centres experts à Marseille (Institut Paoli Calmette, Hôpital Nord et Hôpital La Timone) dans le traitement et le suivi des patients avec un ADCP ont collaboré dans ce projet. Deux types d'échantillons ont été obtenus :

- les biopsies par cytoponction endoscopique guidée par échographie (EUS-FNA) sur des patients atteints de tumeurs non opérables ;
- les tissus tumoraux de patients subissant une chirurgie. L'examen histopathologique a été réalisé après coloration à l'H&E sous un microscope optique.

Chaque échantillon obtenu à partir de pièce opératoire ou par biopsie EUS-FNA a été mélangé avec 100  $\mu\text{l}$  de Matrigel et implanté avec un trocart (10 Gauge) dans le flanc supérieur droit d'une souris nude anesthésiée et désinfectée. Lorsque les tumeurs ont atteint environ 1  $\text{cm}^3$ , les souris ont été sacrifiées et les tumeurs retirées.

### Traitement de la xénogreffe et culture cellulaire

Les xénogreffes ont été coupées en plusieurs petits morceaux utilisés soit pour préparer des cellules, soit réimplantés dans des nouvelles souris soit congelés. Les fragments désignés pour la culture cellulaire ont été traités avec la collagénase de type V et un mélange de trypsine/EDTA et resuspendus dans du milieu DMEM en présence d'un mélange d'antibiotiques et 10 % de sérum de vœu fœtal. Après centrifugation, les cellules ont été remises en suspension dans du milieu SFDM à 37°C dans un incubateur à une concentration de 5 %  $\text{CO}_2$  et sevrées d'antibiotiques pendant au moins 48h avant d'effectuer les chimiogrammes.

### Analyse de l'expression génique par puces à ADN

Les ARNs des xénogreffes ont été préparés en présence d'une solution de thiocyanate de guanidinium froid. L'ARN a été transformé en ADNc et hybridé à une puce d'ADN de type « Human Gene 2.0 » (Affymetrix). Les puces ont été traitées sur une station fluïdique Affymetrix GeneChip 450 (protocole EukGE-WS2v5\_450) et analysées en utilisant un GeneChip Scanner 3000 G7 (Affymetrix). L'analyse PCA (Principal Component Analysis) a été effectuée en utilisant le logiciel génomique Suite (Partek). Toutes les données obtenues ont été déposées au National Center of Biological Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) GSE55513.

### Chimiogrammes

La chimiosensitivité des cellules a systématiquement mesurée pour les cinq médicaments utilisés actuellement chez les patients atteints d'un ADCP : gemcitabine (Lilly), le 5-fluorouracile (5-FU) (Teva Pharma), l'oxaliplatine (Hospira), le docétaxel (Sanofi-Aventis), le métabolite actif de l'irinotécan (7-éthyl-10 hydroxycamptothécine ou SN-38)(Sigma Aldrich). Les cellules ont été traitées pendant 72h avec des concentrations de drogues allant de 0 à 1000  $\mu\text{M}$  et de 0 à 100  $\mu\text{M}$  pour le SN-38. Cinq mille cellules ont été étalées par puits dans des plaques à 96 puits en présence de milieu SFDM. Vingt-quatre heures plus tard, des concentrations croissantes de drogues sont placées dans chaque puits et les cellules incubées pendant une période de 72h supplémentaires. Chaque expérience a été effectuée en triplicata et répétées au moins trois fois. La viabilité cellulaire a été estimée après ajout du réactif PrestoBlue (Life Technologies) pendant 3h. La viabilité cellulaire a été mesurée aux jours 0 et 3 pour calculer le taux de réplication cellulaire.

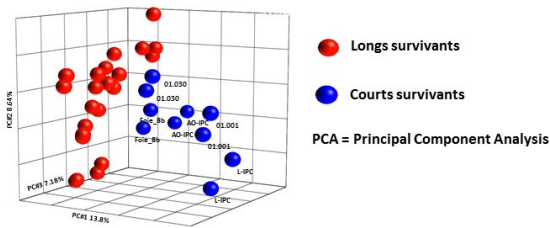
### Les observations cliniques

Les observations cliniques des 17 patients ont été enregistrées dans une base de données prospective, et les données telles que l'âge, le sexe, les antécédents médicaux, le grade histopathologique de différenciation, les traitements reçus (type et la durée de la chimiothérapie), la réponse à la chimiothérapie, développement des métastases et leur localisation et éventuellement la date de décès ont été analysés. La survie sans progression et la survie globale ont ensuite été calculées. La survie courte a été arbitrairement définie comme un temps de survie de moins de huit mois, et la survie longue supérieure à huit mois.

### Résultats et Discussion

Nous avons développé une stratégie efficace dans laquelle les ADCP de 17 patients consécutifs ont été récoltées à partir de prélèvements chirurgicaux ou des biopsies obtenues par voie

(analyse PCA)



(analyse Heatmap)

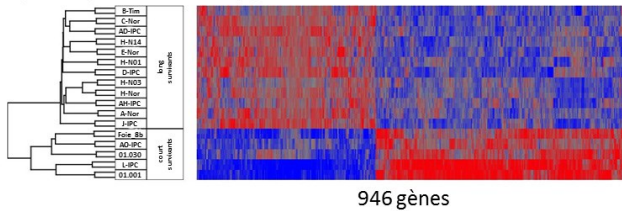


Figure 1. Chimiogrammes réalisés sur les 17 cultures primaires. Des concentrations de drogues de 0 à 1000 µM sont utilisées et la viabilité cellulaire est mesurée après 72 h d'exposition.

écho-endoscopique (EUS-FNA), maintenues en tant que xéno-greffes chez des souris immunodéprimées et leurs cellules maintenues en culture primaire. Ainsi nous avons créé une biobanque de tumeurs « respirantes » et leurs cellules en culture primaire. La culture primaire des cellules nous a permis d'analyser leur sensibilité relative à plusieurs médicaments anticancéreux in vitro avec l'obtention d'un chimiogramme pour chaque individu. Le chimiogramme correspond au même concept que l'antibiogramme pour les microorganismes, dont le but est de déterminer le profil de sensibilité de chaque patient à chacune des drogues. Nous avons étudié simultanément et de manière exhaustive le profil d'expression des ARNs des tumeurs par une approche de microcubes à ADN. L'ensemble de ces données a été utilisé pour rechercher une possible corrélation entre l'évolution clinique de chaque patient et sa sensibilité aux médicaments antitumoraux.

Méthodologiquement, il faut noter que nous avons pu développer des xéno-greffes à partir d'échantillons obtenus par une approche EUS-FNA ainsi qu'à partir de tumeurs par résection chirurgicale. L'obtention de ces xéno-greffes à partir de pièces opératoires a été déjà reportée dans la littérature, en revanche il n'a jamais été reporté une production de xéno-greffes obtenues directement à partir de biopsies. Il est à remarquer que nous avons été capables de reconstituer une tumeur chez la souris avec une morphologie très proche des tumeurs originales à partir des biopsies obtenues par ponctions sous écho-endoscopie, alors même que ces biopsies ne contenaient que quelques centaines de cellules tumorales. Cette méthodologie très originale offre de nouvelles possibilités d'études avec un vrai potentiel clinique. Nous pouvons maintenant envisager l'étude d'une signature transcriptomique de chaque patient souffrant d'un ADCP afin de personnaliser leur traitement. En effet, cette approche permet l'étude du profil transcriptomique, non seulement sur les 15-20 % des patients opérés, mais pratiquement sur tous les patients avec un ADCP, car ils sont systématiquement biopsiés avant de démarrer leurs traitements. Cette analyse permettrait d'adapter le meilleur traitement à chaque patient dans une approche de médecine individualisée.

Un des résultats les plus pertinents de notre étude est la mise en évidence de la capacité prédictive des profils d'ARN sur l'évolution des ADCP (Fig.1). En effet les profils d'expression permettent de séparer au moins deux groupes de patients : les courts survivants (moins de 8 mois) et les longs survivants (plus de 8 mois). L'analyse des données cliniques des courts

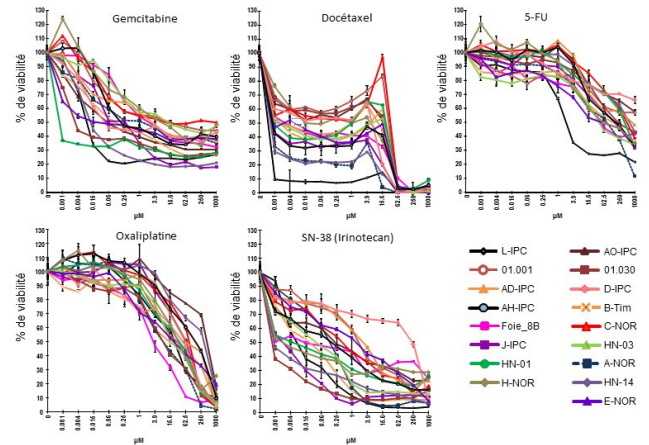


Figure 2. Analyse Heatmap du transcriptome. Cette analyse a mis en avant 946 gènes permettant de discriminer les patients avec une survie longue (plus de 8 mois) ou courte (moins de 8 mois). En rouge les gènes surexprimés et en bleu les gènes sous-exprimés.

et des longs survivants a montré que le premier groupe avait des tumeurs peu différenciées alors que les longs survivants présentaient des tumeurs moyennement ou bien différenciées. Par conséquent, et dans ce sens, nos résultats ne sont pas très surprenants puisque les tumeurs de faible grade de différenciation devraient être associés à un pronostic plus sombre alors que ceux bien ou moyennement différenciés devraient s'accompagner d'une survie plus longue. En fait, le degré de différenciation de la tumeur est le critère le plus utilisé en tant que facteur de pronostic indépendant pour déterminer l'évolution des patients atteints d'un ADCP. Il joue un rôle aussi important que la taille des tumeurs ou la présence d'invasion métastatique des ganglions lymphatiques. Bien que ce degré de différenciation puisse être estimé par le pathologiste après une pancréatectomie, cela n'est possible que sur les 15-20 % des patients opérés. La biopsie obtenue par EUS-FNA permet une analyse cytologique mais dans aucun cas une estimation sur le degré de différenciation histologique des ADCP. Cependant, l'utilisation d'un ensemble des marqueurs moléculaires identifiés dans ce travail (par l'analyse d'expression d'un nombre limité de gènes), permettrait d'estimer le degré de différenciation d'un ADCP le petit nombre de cellules cancéreuses obtenues par EUS-FNA. Ceci est le

score de résistance par lignée cellulaire

Score	Gemcitabine	Docétaxel	5-FU	Oxaliplatine	SN-38
1	L-IPC	L-IPC	L-IPC	Foie-8b	J-IPC
2	HN-14	AO-IPC	E-NOR	L-IPC	01.030
3	HN-01	HN-01	H-NOR	A-NOR	L-IPC
4	01.030	Foie-8b	Foie-8b	01.030	HN-14
5	D-IPC	01.030	HN-03	H-NOR	B-TIM
6	E-NOR	H-NOR	A-NOR	HN-03	H-NOR
7	AO-IPC	B-TIM	B-TIM	E-NOR	HN-01
8	J-IPC	E-NOR	D-IPC	HN-01	HN-03
9	B-TIM	HN-14	J-IPC	01.001	A-NOR
10	A-NOR	J-IPC	HN-01	B-TIM	Foie-8b
11	AH-IPC	A-NOR	01.001	D-IPC	AH-IPC
12	AD-IPC	HN-03	01.030	AD-IPC	AO-IPC
13	C-NOR	AD-IPC	HN-14	J-IPC	C-NOR
14	01.001	C-NOR	AH-IPC	C-NOR	E-NOR
15	H-NOR	01.001	C-NOR	AH-IPC	AD-IPC
16	HN-03	AH-IPC	AO-IPC	HN-14	01.001
17	Foie-8b	D-IPC	AD-IPC	AO-IPC	D-IPC

Figure 3. Analyse Heatmap du transcriptome associé à la sensibilité et à la résistance aux 5 drogues testées. En rouge les gènes surexprimés et en bleu les gènes sous-exprimés. Le diagramme de Venn représente le nombre de gènes communs pour les 5 drogues. Le profil d'expression semble spécifique pour chaque drogue de l'Oxaliplatine et le 5-FU.

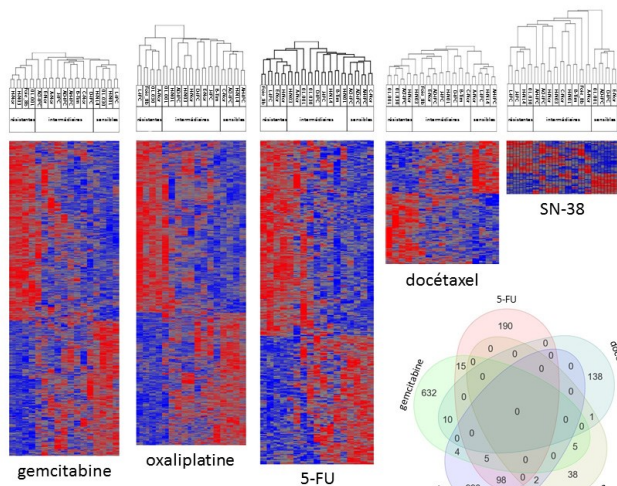


Figure 4. Score de résistance des lignées cellulaires. Le score 1 correspond à la lignée cellulaire la plus sensible à la drogue et la position 17 à celle qui est la plus résistante.

premier message de notre travail. On peut envisager alors que les critères d'opérabilité évolueront si l'on commence à considérer l'état de différenciation des ADCP. La prise en compte de cette variable deviendrait possible avec l'application des outils moléculaires sur les biopsies obtenues par EUS-FNA comme nous venons de le présenter.

Une deuxième observation extrêmement intéressante et prometteuse au niveau clinique concerne le profil d'expression associé à la résistance à certains médicaments anticancéreux (Fig.2 et Fig.3). En effet, nous avons observé qu'un ensemble de 671 gènes pour gemcitabine, 1107 pour l'oxaliplatine, 308 pour le 5FU, 149 pour le docétaxel et 46 pour SN-38 permettent de distinguer les tumeurs sensibles et résistantes à chaque médicament (Fig.4). Le chimiogramme que nous avons développé concerne pour l'instant les médicaments utilisés dans le traitement des patients avec un ADCP. Le profil d'expression génique associé à la sensibilité à la gemcitabine, l'oxaliplatine et le 5-FU comprend de nombreux gènes alors que le nombre de gènes associés avec le docétaxel et le SN-38 sont relativement faibles, ce qui suggère que, dans le premier cas, le phénotype transcriptomique pourrait être déterminant alors que dans le second cas ce phénotype pourrait être moins performant. Un fait remarquable est qu'un nombre négligeable de gènes sont communs entre les différents médicaments, à l'exception de l'oxaliplatine et le 5-FU (Fig.4), ce fait n'est pas très surprenant puisque les deux médicaments tuent la cellule par un mécanisme très proche. A notre grande surprise, la sensibilité aux différents traitements était spécifique à chaque patient, et sans aucune liaison avec le degré de différenciation de la tumeur ou avec le temps de doublement des cellules. Une autre observation cliniquement notable est le fait qu'un ADCP plus sensible à une drogue pouvait être la plus résistante à une autre. Par exemple, la tumeur Foie-8b est la plus résistante à la gemcitabine dans notre série mais la plus sensible à l'oxaliplatine, et moyennement sensible au SN-38. En d'autres termes, une résistance observée pour une drogue ne préjuge en rien le comportement face à un autre médicament anticancéreux. Le défi consiste à déterminer quelle est la drogue à laquelle la tumeur est la plus sensible. Une autre conclusion importante est que, dans certains cas, les médicaments ont été incapables de tuer toutes les cellules, même à une très haute concentration telle que 1.000  $\mu$ M. Cette observation s'explique par le fait que les cultures primaires sont représentatives des différentes sous-populations cellulaires présentes dans la tumeur, dont une partie peut être sensible mais une autre peut être résistante et demeurer simultanément dans la même tumeur. Cela pour-

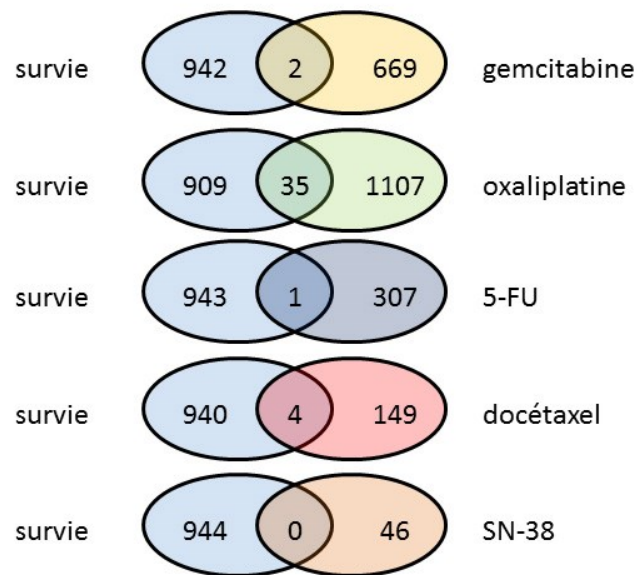


Figure 5. Diagramme de Venn montrant le nombre de gènes impliqués dans la survie (cercle bleu clair) et ceux impliqués dans la résistance aux drogues (à droite). Un nombre très restreint de gènes sont impliqués dans les 2 mécanismes.

rait être cliniquement intéressant car le chimiogramme peut détecter le pourcentage de cellules sensibles et résistantes pour un médicament et donc devenir l'outil pour sélectionner la deuxième ligne de traitement pour un patient donné.

Il est enfin aussi à noter que l'ensemble des gènes sélectionnés comme marqueurs pour distinguer les courts des longs survivants étaient différentes de gènes sélectionnés pour définir la sensibilité aux médicaments (Fig.5). Cette observation suggère, comme prévu, que les mécanismes de résistance aux médicaments sont indépendants des mécanismes définissant l'évolution de la maladie. Dans ce travail, nous avons présenté des données obtenues à partir d'un nombre relativement restreint d'échantillons, mais, à notre grande surprise, les différences étaient souvent très significatives ce qui suggère que cette approche est extrêmement robuste. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que l'augmentation du nombre de patients accroisse la sensibilité et la spécificité de données avec, en corollaire, une réduction du nombre de gènes à retenir pour constituer la signature qui sera en mesure de déterminer la sensibilité aux médicaments et l'évolution des patients.

## Conclusions

En conclusion, nous avons montré dans ce travail que l'analyse du transcriptome réalisé sur les xénotreffes des ADCP est capable de discriminer les courts des longs survivants ainsi que de prévoir la sensibilité à un ensemble de médicaments anticancéreux.

## Discussion en séance

### Question d'A Sauvanet

Avez-vous la certitude qu'avec quelques cellules vous pouvez obtenir l'expression génomique complète ?

### Réponse

L'obtention d'un échantillon de la tumeur par une ponction écho-endoscopique ne pourra probablement pas représenter la totalité des cellules qui forment l'adénocarcinome car il y a certainement de différences régionales importantes. En revanche, elle devrait être représentative des populations majoritaires par simple probabilité. A terme, et si l'approche est

aussi efficace que nous l'observons, une analyse à multiples ponctions pourrait être envisagée afin de se procurer l'ensemble des types cellulaires composant la tumeur et leur étude. Une thérapie combinant les drogues nécessaires pour détruire toutes les populations cellulaires tumorales sera probablement plus efficace qu'une thérapie basée sur le choix aléatoire d'une seule drogue.

## Bibliographie

1. Duconseil P, Gilabert M, Gayet O, Loncle C, Moutardier V et al. Transcriptomic analysis predicts survival and sensitivity to anti-cancer drugs of patients with a pancreatic adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2015;185:1022-32.
2. Molejon MI, Tellechea JI, Loncle C, Gayet O, Gilabert M et al. Deciphering the cellular source of tumor relapse identifies CD44 as a major therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2015;6:7408-23.
3. Gayet O, Loncle C, Duconseil P, Gilabert M, Lopez MB et al. A subgroup of pancreatic adenocarcinoma is sensitive to the 5-aza-dC DNA methyltransferase inhibitor. *Oncotarget.* 2015;6:746-54.