



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *PHYSIOPATHOLOGIE*

Présentée et soutenue par
Barbara BOURNET

Le 04 JUILLET 2013

Titre : *CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MARQUEURS MOLECULAIRES DE L'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE ET DE LA PANCREATITE CHRONIQUE CALCIFIANTE*

JURY

<i>Dr. Isabelle VAN SEUNINGEN, Directeur de recherche CNRS, Lille</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. Benoit TERRIS, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Paris</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Dr. Laurent BARTHOLIN, Directeur de recherche INSERM, Lyon</i>	<i>Examineur</i>
<i>Pr. Janick SELVES, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Toulouse</i>	<i>Examineur</i>
<i>Dr. Pierre CORDELIER, Directeur de recherche INSERM, Toulouse</i>	<i>Examineur</i>
<i>Pr Louis BUSCAIL, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Toulouse</i>	<i>Examineur</i>

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologie*
Unité de recherche : *INSERM U1037 équipe 10*
Directeur(s) de Thèse : *Pr Louis BUSCAIL*
Rapporteurs :

Je dédie ce travail à Fabrice, Chiara, Antoine ainsi qu'à toute ma famille

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail,

Merci au professeur Louis Buscail pour son soutien au quotidien,

Merci au docteur Pierre Cordelier pour son aide ainsi que sa patience, sa rigueur et sa gentillesse,

Merci à Michelle Bouisson et Anny Souque pour leur aide tout le long de ce travail,

Merci à tous les membres de l'équipe 10 : Jérôme Torrisani, Marlène Dufresnes, Naima Hanoun, Hubert Lulka, Aline, Yannick Delpu, Marion Gayral, Pr Janick Selves, Pr Rosine Guimbaud,

Merci à tous les membres du service de Gastro-entérologie et nutrition du CHU de Rangueil et au docteur Isabelle Miguères pour m'avoir permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions possibles.

LISTE DES ABREVIATIONS

CP : cancer du pancréas

PANIN : PANcreatic Intra épithélial Neoplasia

TIPMP: Tumeur Intra canalaire Papillaire et Mucineuse du Pancréas

FAMMM : Familial Atypical Multiple Mole Melanoma

HNPCC : Héreditary Non Polyposis Colorectal Cancer

PRSS1: trypsinogène cationique

SPINK1: Serine Protease Inhibitor Kazal Type 1

CTRC: Chymotrypsine C, dégradation de la trypsine

EUS: échoendoscopie

EUS FNA : échoendoscopie avec cytoponction

PC: Pancréatite Chronique

PCC: Pancréatite Chronique Calcifiante

CDKN2A: Cyclin Dependant Kinase inhibitors 2A

CDKN1A: Cyclin Dependant Kinase inhibitors 1A

CDK: Cyclin Dependant Kinase

SMAD4: Sma and MAD-related protein 4

DPC4: Deleted in Pancreatic Cancer locus 4

TGF beta: Transforming Growth Factor beta

LAP: Latency Associated Protein

LTBP: Latent TGF β Binding Protein

Shh : Sonic hedgehog homolog

SST: somatostatine

SSTR: récepteur de la somatostatine

NF-1 : nuclear factor 1

PTCH: patched récepteur

ARNm : ARN messenger

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reactive

SAGE: Serial Analysis Gene Expression

PLAT: PLasminogen Activator Tissue

KRT7: Keratin 7

MMP7 : Matrix MetalloProtein 7

LCN2 : LipoCalin 2

PLAU: Plasmine activator urokinase

S100P: calcium binding protein P

RAGE: Receptor Advanced Glycation Endproduct

NF- kappaB : Nuclear Factor- kappaB

MSLN: MeSotheLiN

CRISP 3: Cysteine Rich Secretory Protein 3

TFF : TreFoil Factor

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
I. LE PANCREAS NORMAL « RAPPELS SUR ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE ».....	9
II. LE CANCER DU PANCREAS	11
1. Epidémiologie	11
2. Histologie.....	12
3. Lésions pré-néoplasiques et facteurs de risque	12
A. Les néoplasies pancréatiques intra épithéliales.....	12
B. Les TIPMP	13
C. Le cystadénome mucineux	17
D. Les facteurs de risques exogènes et les syndromes d'origine génétique prédisposant au cancer du pancreas.....	18
4. Diagnostic et traitement du cancer du pancréas.	19
A. Clinique.....	19
B. Examens complémentaires	19
C. Prise en charge thérapeutique	21
III. LA PANCREATITE CHRONIQUE.....	23
1. Epidémiologie et étiologie.....	23
2. Histologie.....	24
3. Clinique.....	24
4. Examens complémentaires	25
5. Une entité particulière : la pancréatite chronique pseudo tumorale	26
IV. ROLE DE L'ECHOENDOSCOPIE AVEC CYTOPONCTION DANS LE DIAGNOSTIC D'UN SYNDROME DE MASSE PANCREATIQUE.....	28
V. LES ALTERATIONS DE L'EXPRESSION GENIQUE AU COURS DU CANCER DU PANCREAS ET DE LA PANCREATITE CHRONIQUE	33
1. Les altérations géniques dans le cancer du pancréas	34

A.	Exemple de gènes dont l'expression ou l'activité est induite lors de la carcinogenèse pancréatique.	36
a.	L'oncogène <i>KRAS</i>	36
b.	L'oncogène <i>BRAF</i>	38
c.	L'oncogène <i>GNAS</i>	39
d.	Le récepteur de l'EGF et son ligand	39
e.	La télomérase	40
B.	Exemple de gènes dont l'expression ou l'activité est réprimée lors de la carcinogenèse pancréatique.	41
a.	Les gènes suppresseurs de tumeur <i>CDKN2</i> , <i>SMAD4</i> et <i>P53</i>	41
b.	Le récepteur de la somatostatine 2 ou <i>SST2</i>	42
C.	La voie Hedgehog	43
2.	Etude du profil transcriptomique des cellules cancéreuses pancréatiques.....	44
A.	Intérêt clinique	44
3.	Les microARNs.....	46
A.	Généralités et biogenèse des microARNs	46
B.	Intérêt clinique	47
4.	Les altérations géniques dans la pancréatite chronique.....	49
A.	Généralités	49
B.	Les altérations géniques et cellulaires au cours de la PCC.....	50
a.	Exemple de gènes dont l'expression est modulée lors de la PCC	50
b.	Rôles des cellules étoilées et du TGF β dans la PCC.....	51
	OBJECTIF DU TRAVAIL	52
	RESULTATS.....	54
I.	OBJECTIF DE L'ARTICLE n° 1.....	55
II.	OBJECTIF DE L'ARTICLE n° 2.....	71
	CONCLUSIONS	84
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87

ANNEXE	103
I. ANNEXE ARTICLE 1	104
II. ANNEXE ARTICLE 2	118

INTRODUCTION

I. LE PANCREAS NORMAL « RAPPELS SUR ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE »

Sur le plan anatomique, le pancréas est divisé en quatre parties « tête, isthme, corps et queue »: la tête du pancréas est incluse entre les quatre portions formant la jante duodénale. Sa forme est grossièrement un quadrilatère, de 6 à 7 cm de hauteur, 4 cm de largeur et 2 à 3 cm d'épaisseur. L'isthme pancréatique est la portion rétrécie du pancréas, rétrécissement dû à l'échancrure duodénale en haut et à l'échancrure des vaisseaux mésentériques supérieurs en bas ; il mesure 2 à 3 cm de haut, 2 cm de large et 1 cm d'épaisseur. Le corps du pancréas mesure 8 à 10 cm de long, 4 cm de hauteur et 2 cm d'épaisseur. La queue est l'extrémité gauche du pancréas ayant des rapports étroits avec le hile de la rate. Le canal de Wirsung s'étend de la queue du pancréas vers le duodénum où il s'abouche avec la voie biliaire principale par l'intermédiaire du sphincter d'Oddi. Le canal de Santorini est localisé au niveau de la tête du pancréas et aboutit dans le duodénum par l'intermédiaire de la papille accessoire. Il s'agit d'un organe entièrement rétro péritonéal, situé en avant du rachis. Il est important de connaître les rapports anatomiques du pancréas avec les organes de voisinage car cela conditionne les symptômes et les possibilités de prise en charge thérapeutique et notamment chirurgicale (1) (Figure 1).

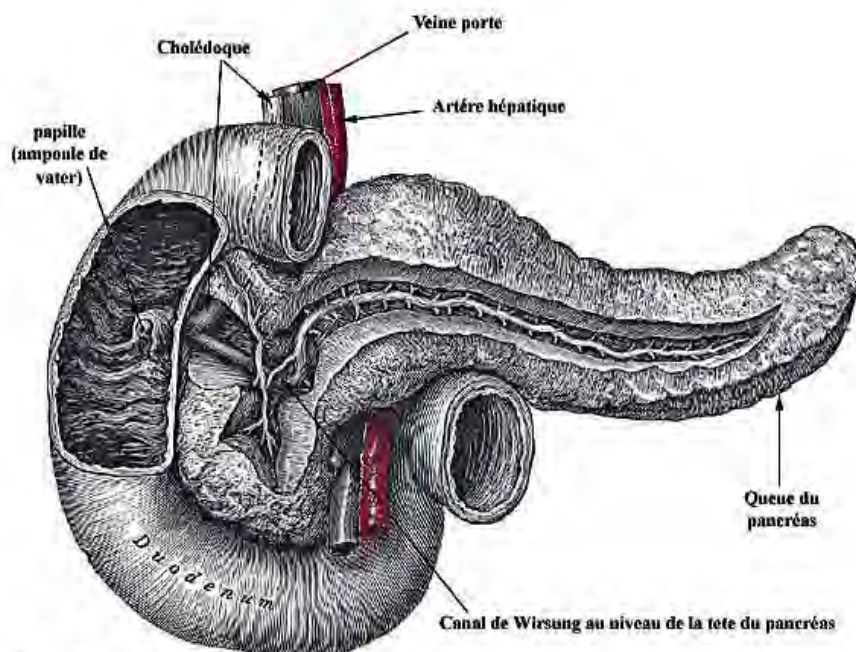
Le pancréas est un organe qui est constitué de deux entités anatomiques et histologiques différentes dont la fonctionnalité est également différente. Le pancréas normal est donc formé d'une partie exocrine et d'une partie endocrine (1). Le pancréas exocrine est composé d'un ensemble de lobules qui correspondent à des amas d'acini. Chaque acinus est formé de cellules pyramidales glandulaires acineuses ou zymogène et de cellules centro acineuses. L'ensemble des acini produit des enzymes et sécrète des électrolytes qui, par l'intermédiaire des canaux intra et inter lobulaires, vont rejoindre le canal de Wirsung et le canal de Santorini. Le suc pancréatique a un rôle primordial dans la digestion du bol alimentaire. Ce suc est composé de deux phases (1):

- D'une phase hydroélectrolytique riche en bicarbonate et en solution isotonique de NaCl. Elle est produite en quantité importante par les cellules acineuses et canaliculaires sous dépendance de la sécrétine. Le but de cette sécrétion hydrobicarbonatée est de faciliter l'excrétion des enzymes et du mucus pour éviter leur précipitation dans le

canal pancréatique, mais aussi de permettre le tamponnement du pH acide gastrique pour activer les enzymes pancréatiques (pH 8 à 8.5),

- d'une phase enzymatique qui est synthétisée, excrétée et secrétée sous forme de pro enzymes par les cellules acineuses sous dépendance de la CCK avec un relai cholinergique. Les pro enzymes sont au moins une vingtaine et permettent de dégrader notamment les protéines, les lipides ou les glucides. On retrouve comme principales enzymes : la lipase, l'amylase et la trypsine.

Le pancréas endocrine ne correspond qu'à 1 à 2% de la masse pancréatique. Anatomiquement il est constitué de cellules qui se regroupent en îlots dit « îlots de Langerhans ». Dans ces îlots, les cellules alpha ou A sont responsables de la sécrétion de glucagon alors que les cellules bêta ou B sont responsables de la sécrétion d'insuline (la somatostatine est sécrétée par les cellules D). Ces hormones jouent un rôle prépondérant dans la glycorégulation et dans l'homéostasie énergétique (2).



D'après Henry Gray (1821-1865). Anatomy of the Human Body. 1918.

FIGURE 1

II. LE CANCER DU PANCREAS

Le cancer du pancréas est un terme générique qui regroupe plusieurs types histologiques. Par abus de langage, le cancer du pancréas correspond sur le plan anatomopathologique à l'adénocarcinome pancréatique qui représente 90% des tumeurs solides malignes du pancréas. Les autres types anatomo pathologiques sont moins fréquent ; ainsi on retrouve les tumeurs endocrines, le carcinome à cellules acineuses du pancréas, le lymphome primitif du pancréas, les tumeurs mésenchymateuses et des métastases provenant de tumeurs primitives issues du sein, du rein ou du colon (3).

1. Epidémiologie

En 2010, le cancer du pancréas représente la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. En France, son incidence est en augmentation de l'ordre de 8 à 10 cas / 100 000 par an. Aux Etats Unis, on note 43 140 nouveaux cas par an contre 37 000 en 2008. Entre 2000 et 2007, la majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie (50% au stade métastatique et 25,9% au stade localement avancé) selon le registre américain « Surveillance, Epidemiology and End Results » (SEER). Le taux de survie à 5 ans est de 3,5% et reste malheureusement stable depuis une décennie (4). Ce mauvais résultat est tout d'abord dû à l'absence de facteurs de risque spécifiques interdisant une prévention efficace, mais aussi à un diagnostic tardif en raison de signes cliniques de début absents ou non spécifiques, à une invasion tumorale rapide par voie lymphatique et nerveuse et enfin par l'absence de marqueurs biologiques précoces disponibles en pratique clinique quotidienne (5). Le cancer du pancréas constitue un problème de santé publique compte tenu de l'augmentation du nombre de nouveaux cas et de l'absence d'amélioration de son taux de survie malgré l'avènement des nouvelles stratégies de chimiothérapie et des thérapies ciblées comme les composés anti-angiogéniques ou les inhibiteurs de l'EGFR. Ainsi en 2011 le nombre de morts par cancer du pancréas est superposable au nombre de morts par accident de voiture. Le cancer du pancréas est plus fréquent chez l'homme avec un sex ratio de 1,5 à 2 qui cependant s'estompe avec l'âge.

2. Histologie

Au vu de la diversité cellulaire composant le pancréas, il existe plusieurs types anatomopathologiques de cancer pancréatique. Dans notre travail de thèse, nous avons pris comme modèle l'adénocarcinome pancréatique qui est de loin celui qui présente le plus mauvais pronostic et se développe à partir des cellules épithéliales canalaire pancréatiques. Ces cellules ne représentent que 10% des cellules pancréatiques.

Il a été défini plusieurs degrés de différenciation à partir de matériel obtenu sur des pièces opératoires ; ainsi l'adénocarcinome pancréatique (CP) peut être « bien, moyennement ou peu différencié ». Il est possible de réaliser une étude par immunohistochimie sur le matériel prélevé pour le diagnostic. Elle permet de rechercher l'expression de mucine et notamment MUC1, MUC3, MUC 4, MUC5/6 mais aussi l'expression des cytokératines 7, 8, 18 et 19 qui jouent un rôle dans le diagnostic positif mais aussi dans le pronostic de cette maladie (6).

3. Lésions pré-néoplasiques et facteurs de risque

Le cancer du pancréas se développe à partir de lésions dites pré-néoplasiques qui constituent des facteurs de risques endogènes. Trois types ont été mis en évidence (7) :

- Les néoplasies pancréatiques intra épithéliales (PanIN),
- Les tumeurs intra canalaire papillaires et mucineuses du pancréas : TIPMP (IPMN),
- Les cystadénomes mucineux.

A. Les néoplasies pancréatiques intra épithéliales

Sur le plan anatomopathologique, il existe 3 sous types de PanIN. Il s'agit de lésions qui touchent le canal pancréatique. Les PanIN de type 1 sont subdivisées en type A et B. Le type 1 est formé de cellules canalaire avec une grande quantité de mucine intra cytoplasmique ; le noyau est petit et maintenu au niveau de la membrane basale. Le type A est plan alors que le type B est papillaire. Le type 2 présente une perte de la polarité du noyau et une élévation du rapport nucléocytoplasmique. Les lésions forment un aspect papillaire complexe. Enfin le

type 3 présente de forte atypie avec un noyau proéminent et des mitoses anormales. La lésion de PanIN de type 3 est considérée comme un carcinome *in situ* (8).

Ces lésions n'ont pas de traduction sur le plan des manifestations cliniques ou radiologiques. Elles sont de découverte fortuite et ont été décrites à partir de l'analyse des pièces opératoires de pancréas. Leur ablation permet une prévention de l'adénocarcinome pancréatique mais contrairement aux deux autres types de lésions pré cancéreuses (TIPMP et le cystadénome mucineux), il est impossible de les détecter en pratique clinique.

B. Les TIPMP

Ces lésions correspondent à une prolifération papillaire avec une mucine sécrétion de l'épithélium canalaire. Les TIPMP peuvent se développer au dépend du canal principal ou d'un canal secondaire, voire des deux. Le risque de dégénérescence est variable selon le type d'atteinte canalaire : il est de l'ordre de 60% pour les formes touchant le canal principal ou mixte alors que ce risque est estimé à 15% pour l'atteinte des canaux secondaires isolée (9) (10). Ce risque de dégénérescence peut être pris en considération au plan clinique et dans le suivi morphologique d'un patient atteint d'une TIPMP. Il est caractérisé par un canal de Wirsung supérieur à 10mm, une dilatation d'un canal secondaire supérieur à 30 mm, l'existence d'un nodule mural sur la paroi du kyste ou du canal, des adénomégalies ou d'un syndrome de masse tissulaire (11). Si les atteintes de type PanIN n'ont pas de traduction sur le plan clinique ou radiologique, les TIPMP se manifestent cliniquement le plus souvent par une pancréatite aiguë secondaire à l'obstruction canalaire par la sécrétion de mucus. L'analyse anatomopathologique d'une TIPMP permet de mettre en évidence 4 sous types, gastrique, intestinal, oncocytaire et pancréato biliaire. Le profil d'expression des mucines est différent selon le sous type histologique ; l'expression de MUC 5AC est mis en évidence plutôt dans le sous type gastrique alors que l'expression de MUC 2 est retrouvée dans le type intestinal et celle de MUC1 dans le sous type pancréato biliaire (12) (Figure 2, 3, 4). Les TIPMP dégénèrent vers deux types histologiques différents à savoir colloïde ou tubulaire qui à terme n'ont pas le même pronostic ; la forme colloïde ayant plutôt une différenciation de type intestinal est de meilleur pronostic que le type tubulaire (13) (Tableau 1). La classification internationale WHO classe les TIPMP en adénome, borderline et enfin carcinome. En cas de carcinome, la survie à 5 ans après la chirurgie est de l'ordre 37%, ce

taux est supérieur aux données de survie de l'adénocarcinome dite « classique » qui sont de l'ordre de 5% (Figure 5)

Type histopathologique		MUC 1	MUC 2	MUC 5AC	MUC 6	CDX 2
TIPMP	intestinal	-	++	++	-	++
	pancréatobiliaire	++	-	++	+	-
	gastrique	-	-	++	-	-
	oncocytaire	+	-	+	++	-

Tableau 1 : Immunomarquage différentiel des sous-types histologiques de TIPMP.

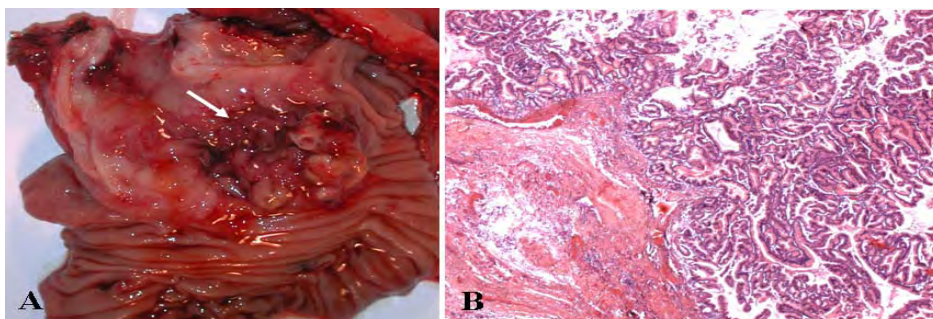


FIGURE 2 : TIPMP développée au dépend du canal principal

A: aspect macroscopique avec présence d'une masse avec un aspect papillaire développée au dépend du canal de Wirsung qui est dilaté

B: aspect microscopique HE X 100 prolifération papillaire de l'épithélium du canal principal

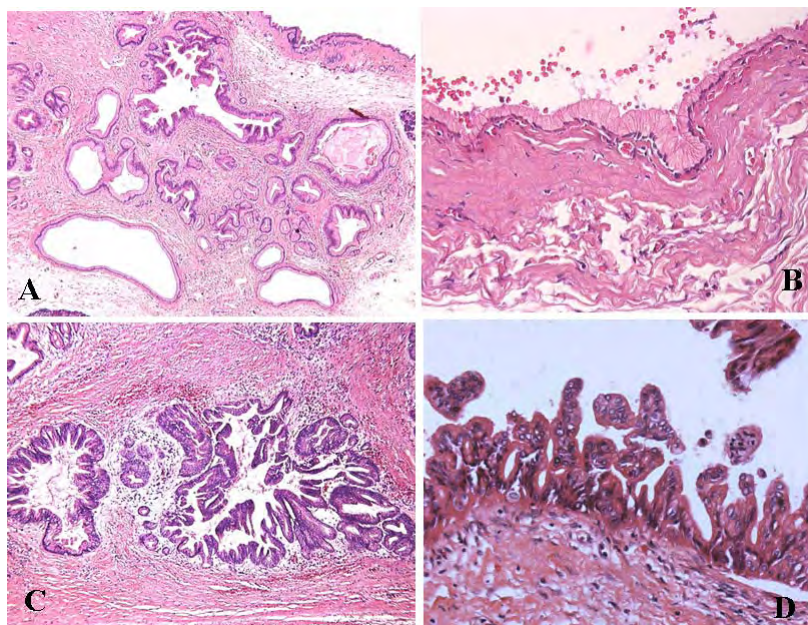


FIGURE 3: TIPMP développée au dépend d'un canal secondaire

A: dilatation kystique de plusieurs canaux secondaires bordés par un épithélium papillaire ou non avec présence de mucus

B: à fort grossissement présence d'un adénome bénin avec un épithélium sans lésion de dysplasie

C: TIPMP dite borderline avec présence de lésions de dysplasies de bas grade

D: carcinome non invasif développé au dépend d'une TIPMP. On retrouve au niveau de l'épithélium des lésions en dysplasie sévère avec la présence de micro papilles

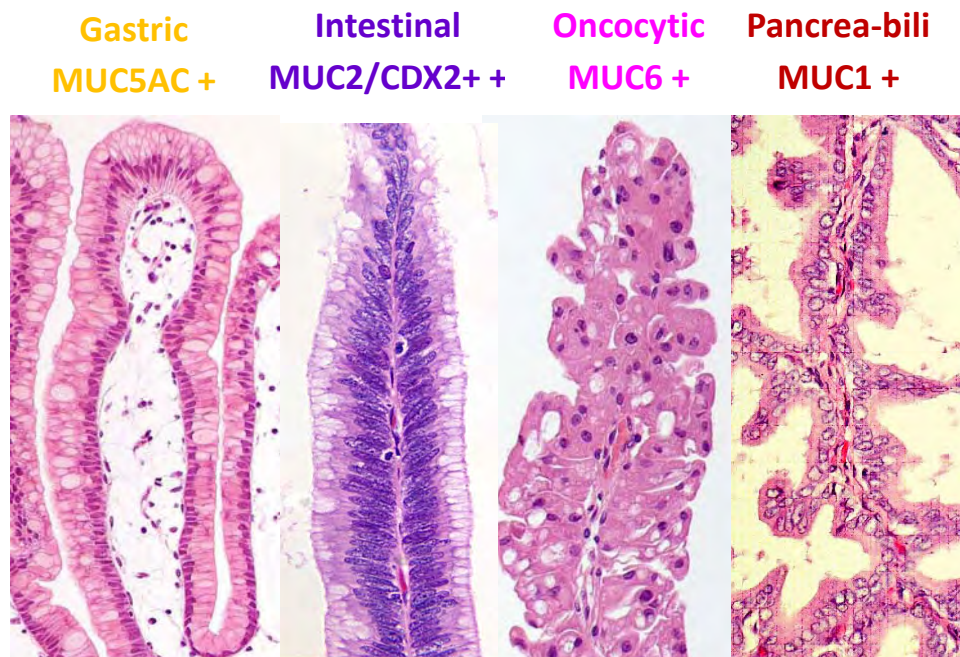


FIGURE 4 : Sous types histologiques des TIPMP et détermination des MUC en fonction du type histologique des TIPMP

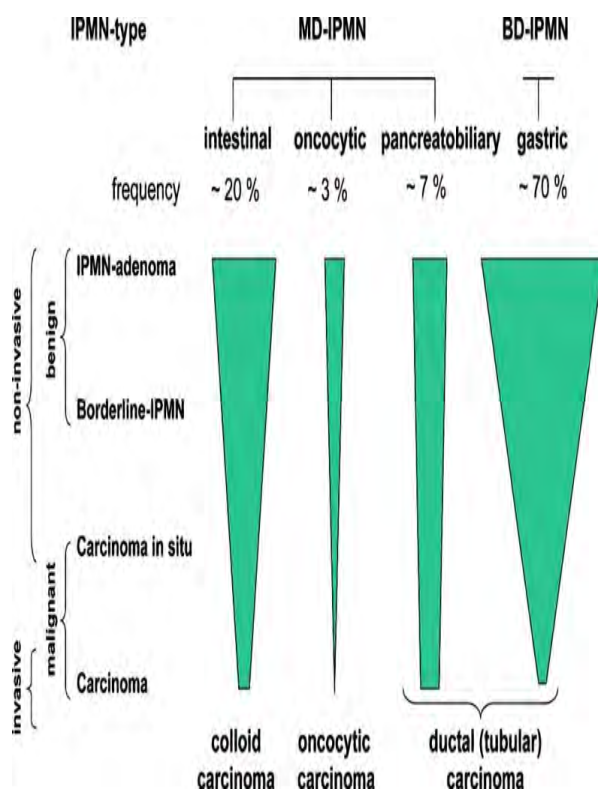


Figure 5 : sous types de TIPMP et risques de dégénérescence
Grützmann R et al. The oncologist 2010;15:1294-1309

C. Le cystadénome mucineux

Il s'agit d'une lésion kystique dont la paroi est constituée d'un épithélium cubique avec une muco-sécrétion et la présence d'un stroma de type ovarien. Sur le plan anatomo pathologique, il s'agit de lésions de type adénome bénin, de lésions borderline et enfin de carcinomes *in situ*. La forme dégénérée exprime au niveau des cellules carcinomateuses calciformes MUC2 et MUC 5AC. Le cystadénome mucineux se développe préférentiellement chez la femme de 40 à 50 ans (14). Il s'agit d'une lésion de type macro kystique, unique principalement localisée au niveau du corps et de la queue du pancréas (15). Le risque de dégénérescence est dépendant de la taille du kyste et de la présence de nodules muraux au niveau de sa paroi. Le risque de développer un cystadénocarcinome mucineux est compris

entre 15 et 20% si la taille est inférieure à 4 cm et en l'absence de nodule mural. Le taux de survie à 5 ans des cystadénocarcinomes traités chirurgicalement est de l'ordre de 60% (11).

D. Les facteurs de risques exogènes et les syndromes d'origine génétique prédisposant au cancer du pancréas

Le syndrome de FAMMM (Familial Atypical Multiple Mole Melanoma) lié à la mutation de *p16* fait partie des syndromes héréditaires qui augmentent le risque de cancer du pancréas. Ainsi, les patients présentent un risque relatif de cancer du pancréas de 13 (16). Plus généralement, on estime à 5 à 10% les cancers du pancréas avec une histoire familiale. Le cancer du pancréas familial se définit par la présence d'un cancer pancréatique chez au moins deux parents de premier degré du patient. Il s'agit de familles qui présentent un risque accru de cancer du pancréas de l'ordre de 70 à 100 ; en général l'âge de survenue est plus jeune que dans les cas sporadiques. Le gène responsable n'est pas encore connu mais il existe chez un tiers des cas l'imputabilité de la mutation au niveau des cellules germinales de *BRCA2*. Il existe aussi les cancers du sein héréditaires lié à la mutation de *BRCA2* avec un risque relatif de cancer du pancréas de 10. D'autre part, le syndrome de Peutz Joughers est associé à des mutations du gène codant pour une kinase *LKB1/STK11*. Le risque relatif de développer un cancer du pancréas est de 132 chez les gens porteurs de ces mutations par rapport à la population générale. En revanche le risque relatif est de 9 pour le syndrome de Lynch ou HNPCC (Héréditaire Non Polyposis Colorectal Cancer). Dans le cadre de ces syndromes héréditaires, en plus du risque de développer un cancer du pancréas, on augmente également le risque relatif de développer des cancers extra pancréatiques.

Les facteurs de risques exogènes restent encore discutés selon les différentes études publiées. L'implication d'agents tel que l'apport calorique associé ou pas à l'obésité, le café, l'alcool, l'antécédent de diabète personnel ou familial ou les solvants industriels reste débattue. Seul le tabac constitue un facteur de risque significatif du cancer du pancréas avec un risque relatif de 2,5 (1,7 - 3,8). Plus récemment, les personnes porteuses des groupes sanguins A, B et AB présenteraient un risque accru de cancer du pancréas comparativement aux personnes de groupe sanguin O. Toutefois l'ensemble de ces facteurs de risques exogènes sont associés à un risque relatif faible ce qui limite considérablement la mise en place de véritables campagnes de dépistage.

4. Diagnostic et traitement du cancer du pancréas.

A. Clinique

Mise à part la découverte fortuite, le cancer du pancréas est impossible à diagnostiquer à un stade précoce. En effet il existe peu de signes cliniques pathognomoniques orientant vers la pathologie pancréatique de par la localisation profonde de l'organe. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 65 ans.

Le diagnostic est évoqué devant des douleurs abdominales épigastriques avec une irradiation postérieure de type solaire évocatrice d'un envahissement du plexus coélique. La douleur constitue le mode de révélation le plus fréquent (entre 40 et 60% des cas). Malheureusement elle peut être mal définie par le patient ou mal systématisée faisant évoquer en premier lieu un syndrome dyspeptique ou rhumatologique engendrant un retard de diagnostic (18). Les autres signes cliniques sont :

- L'ictère, soit par compression ou envahissement de la voie biliaire principale, soit par atteinte métastatique hépatique.
- L'altération de l'état général avec notamment l'amaigrissement
- Une pancréatite aiguë
- L'apparition d'un diabète ou le déséquilibre d'un diabète préexistant
- La découverte de métastases hépatiques, pulmonaires ou ganglionnaires.
- Les vomissements par sténose duodénale

L'examen clinique met en évidence un syndrome de masse épigastrique, une hépatomégalie ou une ascite carcinomateuse.

B. Examens complémentaires

Les examens d'imagerie ont pour but de mettre en évidence un syndrome de masse au niveau du pancréas et d'en préciser l'aspect, la localisation, la taille. Ils permettent d'évaluer le bilan d'extension avec notamment la présence de lésions d'allure métastatiques mais aussi de préciser les rapports avec les vaisseaux et les organes de voisinage. Par ailleurs certains examens comme la cholangiopancreatographie rétrograde endoscopique (CPRE)

sont réalisés à visée thérapeutique pour la prise en charge de l'ictère ou des vomissements secondaire à une sténose duodénale, notamment en cas de tumeur diagnostiquée au stade métastatique ou localement avancé (19).

L'échographie abdominale constitue l'examen de première intention pour l'exploration d'un ictère, de douleur abdominale ou d'un syndrome de masse palpée. Cette approche présente une bonne valeur discriminante en cas de lésion de plus de 2 cm. Le scanner abdominal sans et avec injection de produit de contraste constitue l'examen de référence pour la mise en évidence d'un syndrome de masse au niveau du pancréas. Les lésions néoplasiques se présentent en général sous la forme d'une masse hypodense irrégulière mal limitée (Figure 6). Un bilan d'extension est réalisé au même moment. L'échoendoscopie (EUS) se pratique sous anesthésie générale et profite d'une meilleure valeur discriminative que le scanner pour les lésions d'une taille inférieure à 2 cm, ou pour les lésions ampullaires. L'EUS permet de caractériser un syndrome de masse hypo-échogène hétérogène mal limité. L'échoendoscopie avec cytoponction à l'aiguille fine est performante et permet une aspiration du tissu tumoral avec obtention des prélèvements pour l'analyse histologique (véritables microbiopsies), cytologique mais aussi pour des analyses de biologie moléculaire notamment la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* (19). Elle permet de même la réalisation de gestes thérapeutiques comme l'alcoolisation du plexus coélique à visée antalgique.

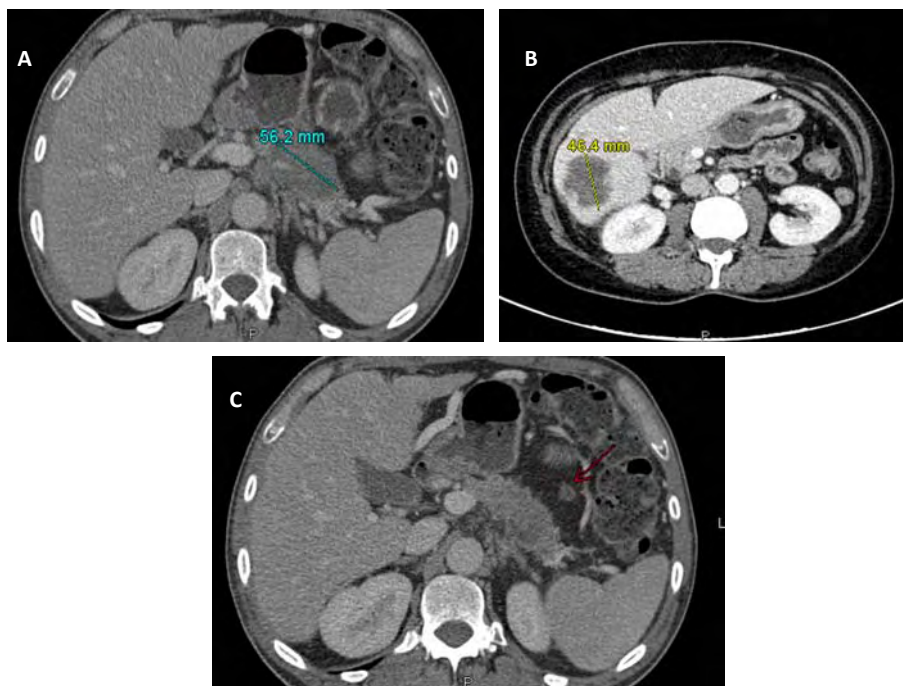


FIGURE 6:

A: coupe scanographique avec injection de produit de contraste d'un adénocarcinome pancréatique

B: coupe scanographique d'une lésion secondaire hépatique d'un adénocarcinome pancréatique

C: coupe scanographique d'une lésion de carcinose péritonéale (flèche rouge)

C. Prise en charge thérapeutique

Au terme des différentes explorations, le patient est qualifié de « résécable, localement avancée ou métastatique ». Dans les deux derniers cas, la mise en route d'un traitement par chimiothérapie nécessite l'obtention d'une preuve de l'origine néoplasique du syndrome de masse pancréatique par la réalisation d'une cytoponction soit sous échographie soit sous contrôle scanographique (20).

La prise en charge thérapeutique du cancer du pancréas dépend des possibilités de chirurgie, ce qui va conditionner par la même occasion la survie des patients. Malheureusement la prise en charge chirurgicale à visée curative (résection de la tumeur) ne sera possible que chez 15 % des patients. Les 85% des patients restant sont traités par chimiothérapie ou par

soins de support. Le type de chirurgie est fonction de la localisation de la tumeur ; ainsi le patient peut bénéficier soit d'une duodéno pancréatectomie céphalique, soit d'une pancréatectomie gauche avec ou sans conservation de la rate. Les complications et la mortalité post opératoire sont fonctions du type de chirurgie. En cas de tumeur localement avancée ou métastatique, la prise en charge du patient est effectuée après une réunion de concertation multi disciplinaire d'oncologie. Au décours de ces réunions, le type de prise en charge du patient est décidé avec la possibilité d'une chimiothérapie soit par Gemcitabine soit FOLFIRINOX ou d'une radiothérapie en cas de tumeur localement avancée (20) (Figure 7).

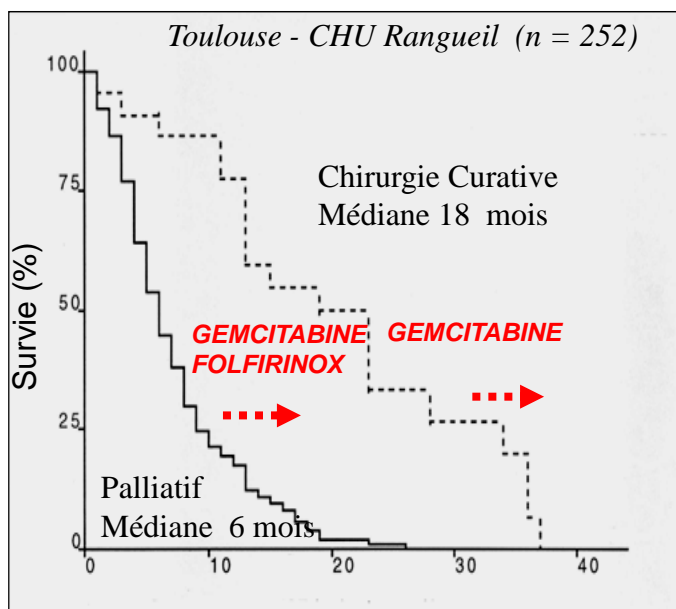


Figure 7 : courbes de survie des patients en fonction de la prise en charge thérapeutique (Buscail et al. *Gastrointest Endosc* 1999 Hidalgo *NEJM* 2010; ESPAC-1; CONKO-1; PRODIGE)

III. LA PANCREATITE CHRONIQUE

1. Epidémiologie et étiologie

La prévalence de la pancréatite chronique reste faible en Europe et aux Etats-Unis ; en France, elle est de l'ordre de 26 pour 100 000 personnes. Cependant, son incidence est en augmentation constante dans le monde.

Son origine est alcoolique dans plus de 80% des cas. Une consommation excessive d'alcool sur une durée moyenne de 10 à 20 ans serait responsable de l'apparition des lésions au sein du parenchyme pancréatique. Le problème rencontré est la définition de la consommation excessive d'alcool. Par ailleurs, la durée de l'alcoolisme nécessaire au développement du même type de lésion est plus courte chez la femme que chez l'homme. En moyenne, l'âge de début de manifestations liées à la pancréatite chronique est de l'ordre de 40 ans dans les différentes séries de la littérature (22).

Plus récemment, le rôle du tabac comme cofacteur de risque dans le développement des lésions fibrosantes a été mis en évidence avec un risque relatif d'apparition de la fibrose de 3 observé à partir d'une consommation d'un paquet et demi par jour. Toutefois, on ne retrouve pas pour l'instant de notion de durée de consommation à partir de laquelle les lésions apparaîtraient.

Les autres étiologies sont beaucoup plus rares et sont représentées par les troubles métaboliques (hypercalcémie, hypertriglycéridémie de type I, IV et V), les formes héréditaires (mutations des gènes PRSS1, SPINK-1 ou CTSC), les formes auto-immunes de type 1 (avec élévation de IgG4) ou de type 2 (souvent associée à une maladie inflammatoire chronique de l'intestin), la malnutrition, la radiothérapie abdominale et enfin les formes dites idiopathiques (18, 22).

La pancréatite chronique est un facteur de risque indépendant du cancer pancréatique (risque relatif de 1.8 à 2 à dix ans). Le risque cumulé de développer un adénocarcinome sur pancréatite chronique, quelle que soit l'étiologie, est de 4% après 25 ans d'évolution de la maladie. La mortalité constatée chez les malades ayant une pancréatite chronique est de l'ordre de 35% après 20 ans d'évolution. Cette mortalité est surtout due aux complications

non pancréatiques de l'alcoolisme tabagisme (néoplasies ORL, pulmonaires, urologiques, digestives, maladies cardiovasculaires), la pancréatite chronique n'étant directement responsable que de 9% des décès.

2. Histologie

L'analyse histologique d'un pancréas suspect de pancréatite chronique est rarement obtenue, en raison de matériel obtenu souvent exigu en cas de cytoponction sous échographie. L'aspect histologique le plus fréquemment observé est celui des pancréatites chroniques d'origine exogène. Cependant, la caractérisation de la pancréatite chronique est plus simple à partir de pièces opératoires. Ainsi sur le plan macroscopique, le pancréas est dur, parfois hypertrophique, donnant un aspect pseudo tumoral. De manière générale, il s'agit d'une atteinte inflammatoire et fibrosante du pancréas, caractérisée par des altérations morphologiques, progressives et irréversibles du tissu exocrine et endocrine (23). Sur le plan microscopique, ces lésions peuvent être focales, segmentaires ou diffuses, associées à des sténoses et à des dilatations du réseau canalaire touchant le canal principal et son arborisation. On peut trouver au sein des canaux des amas protéiques qui vont progressivement se calcifier constituant de véritables calculs pancréatiques et définissant aussi le terme de pancréatite chronique calcifiante (PCC). Sur le plan physiopathologique, ces amas sont le fait d'une hypersécrétion protéique induite par l'alcool avec sursaturation du suc en calcium favorisant l'apparition des calculs. Les vaisseaux intra parenchymateux sont remaniés. En plus de ces lésions de pancréatite chronique peuvent se surajouter des lésions inflammatoires aiguës avec notamment une infiltration par des polynucléaires neutrophiles ou des lympho plasmocytes et un œdème.

3. Clinique

Le diagnostic de pancréatite chronique repose sur un cortège d'éléments anamnestiques, cliniques, iconographiques et parfois histologiques.

La manifestation clinique principale est la douleur ; celle-ci peut être aiguë en rapport avec une poussée de pancréatite aiguë ou permanente et exacerbée par la prise alimentaire. La douleur est de siège épigastrique avec une irradiation postérieure de type solaire. Elle peut

être en rapport avec le pancréas lui-même, ou liée à une complication tel qu'un pseudo kyste (21).

L'ictère est un symptôme révélateur mais peut aussi apparaître en cours d'évolution de la pathologie. Il s'agira dans tous les cas d'un ictère rétentionnel soit par sténose de la voie biliaire principale dans son trajet intra pancréatique, soit par une compression par un pseudo kyste ou par la tête du pancréas. Cet aspect définira alors la forme de pancréatite chronique dite « pseudo tumorale » (22).

Au cours de l'évolution de la maladie pancréatique apparaît une insuffisance pancréatique exocrine se manifestant par une stéatorrhée (selles graisseuses) et une insuffisance pancréatique endocrine avec le diabète. Ces deux types d'évolution peuvent être responsables d'une altération de l'état général du patient et d'un amaigrissement (18).

4. Examens complémentaires

Les explorations d'imagerie chez un patient potentiellement atteint d'une pancréatite chronique vont consister en la scanographie abdominale avec et sans injection de produit de contraste. Cet examen est réalisé soit au décours du suivi, soit après une poussée de pancréatite aiguë. Dans tous les cas, on visualise un aspect très variable allant de l'hypertrophie à l'atrophie de la glande, la présence de calcification ou l'existence d'une dilatation du canal de Wirsung. La scanographie explore les possibles complications liées à la pancréatite chronique telle que l'atteinte des vaisseaux (soit pseudo anévrisme soit thrombose) ou la présence d'un pseudo kyste ou d'une compression digestive ou biliaire (Figure 8).

L'imagerie par résonance magnétique ou IRM permet une meilleure visualisation de l'atteinte canalaire pancréatique avec notamment la mise en évidence d'une sténose ou d'une dilatation. Cette technique d'imagerie a détrôné progressivement la Cholangio Pancréatographie Rétrograde Endoscopique (CPRE) (24).

L'échoendoscopie constitue un examen indispensable dans le diagnostic et le suivi des PCC. Elle constitue l'examen de référence pour les lésions débutantes de PCC avant même leur mise en évidence à l'IRM ou au scanner. Par ailleurs on obtient une preuve

anatomopathologique par la réalisation d'une cytoponction. Ce prélèvement est d'autant plus important que dans la forme de PCC dite pseudo tumorale, il est nécessaire d'avoir une preuve anatomopathologique pour poser le diagnostic différentiel avec le cancer du pancréas.

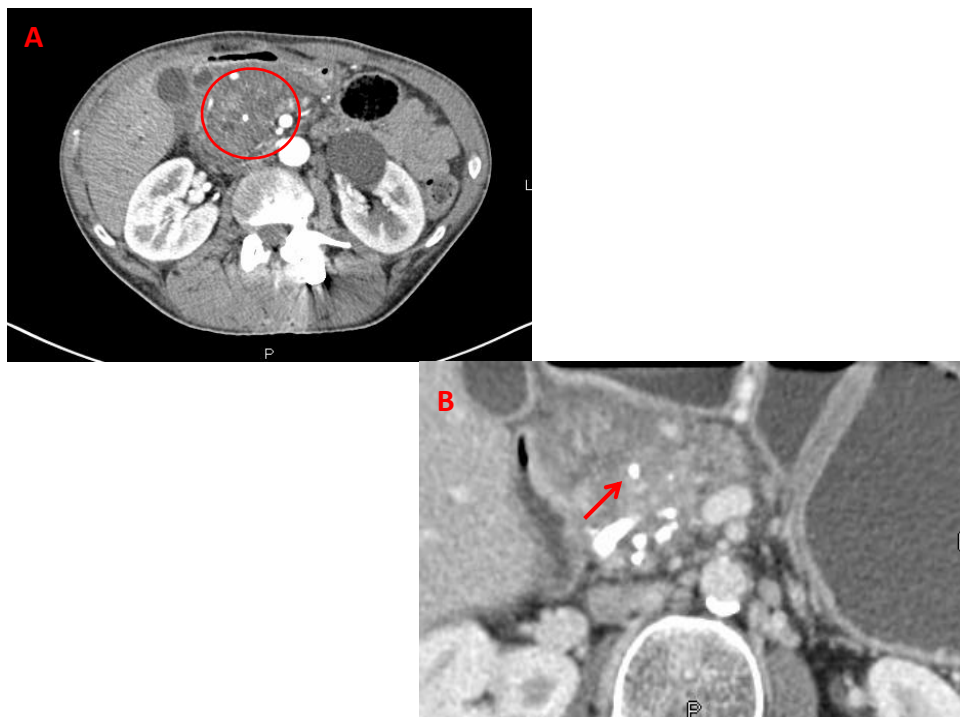


FIGURE 8 : coupe de scanner abdominale avec injection de produit de contraste

A: aspect de pancréatite chronique calcifiante avec augmentation de volume de la tête du pancréas (trait rouge).

B: coupe centrée sur la tête du pancréas avec présence de calcifications (flèche rouge)

5. Une entité particulière : la pancréatite chronique pseudo tumorale

La forme pseudo tumorale des PCC est une forme relativement mal identifiée et peu décrite. Elle pose un double problème avec d'un part le diagnostic positif et d'autre part le diagnostic différentiel avec le cancer du pancréas. Ceci pose un problème dans la pratique clinique car la prise en charge thérapeutique n'est bien évidemment pas la même en cas de cancer. Le terme pseudo tumoral est souvent associé aux formes auto-immunes dont la présentation

radiologique initiale avant biopsie et traitement spécifique (corticothérapie en général puis immunosuppresseurs) est une augmentation diffuse ou localisée du volume de la glande pancréatique.

On définit donc sous le terme de PCC pseudo tumorales toutes les formes de PCC présentant une hypertrophie tissulaire ou mixte localisée ou diffuse du parenchyme pancréatique sur le plan radiologique qui au terme des investigations (échoendoscopie avec cytoponction, tomodensitométrie et IRM) ne correspondent pas à une tumeur de cet organe (adénocarcinome, cystadénome, cystadénocarcinome, tumeur intracanaulaire papillaire et mucineuse du pancréas et autres lésions kystiques) ou à une atteinte auto-immune. Le doute permanent concernant la transformation maligne implique donc un suivi rapproché, clinique et radiologique et la mise en évidence de marqueurs moléculaires discriminants pour le diagnostic différentiel entre ces deux entités (25).

IV. ROLE DE L'ÉCHOENDOSCOPIE AVEC CYTOPONCTION DANS LE DIAGNOSTIC D'UN SYNDROME DE MASSE PANCREATIQUE

Pour les 85% des patients atteints d'un cancer du pancréas ayant une prise en charge palliative, il est nécessaire d'obtenir une preuve anatomopathologique de la dégénérescence du syndrome de masse exploré. L'échoendoscopie avec cytoponction constitue l'examen idéal pour explorer un syndrome de masse pancréatique tout en obtenant une preuve histocytologique (26). Cet examen d'imagerie se déroule sous anesthésie générale. Un endoscope porteur d'une sonde d'échographie de haute fréquence est mené jusqu'au duodénum. L'appareil est positionné contre la paroi digestive (duodénum, estomac) afin d'obtenir une véritable fenêtre échographique pour détecter avec une haute résolution le pancréas tout proche. L'échoendoscopie combine à la fois l'exploration morphologique par échographie d'un syndrome de masse pancréatique et permet aussi de réaliser, par l'intermédiaire d'une ponction guidée, un prélèvement. La ponction d'une masse pancréatique peut se faire par voie trans gastrique ou par voie trans duodénale (27). La technique de ponction peut être différente d'un opérateur à l'autre en terme de nombre de passage d'aiguille, de mouvement de va et vient dans la lésion ou encore avec ou sans mise en place du stylet au moment du passage de l'aiguille. Il en est de même pour le mode de recueil de l'échantillon qui peut se faire par la mise en place du stylet ou par l'injection de solution saline (voire d'air) à travers l'aiguille. L'échantillon est placé dans le milieu de conservation (28) (Figure 9). Le prélèvement se pratique à l'aide de plusieurs types d'aiguille de diamètre différent de 19, 22 et 25 gauge, il existe aussi des aiguilles biseautées facilitant la réalisation de carottes biopsiques (Trucut biopsy) (29).

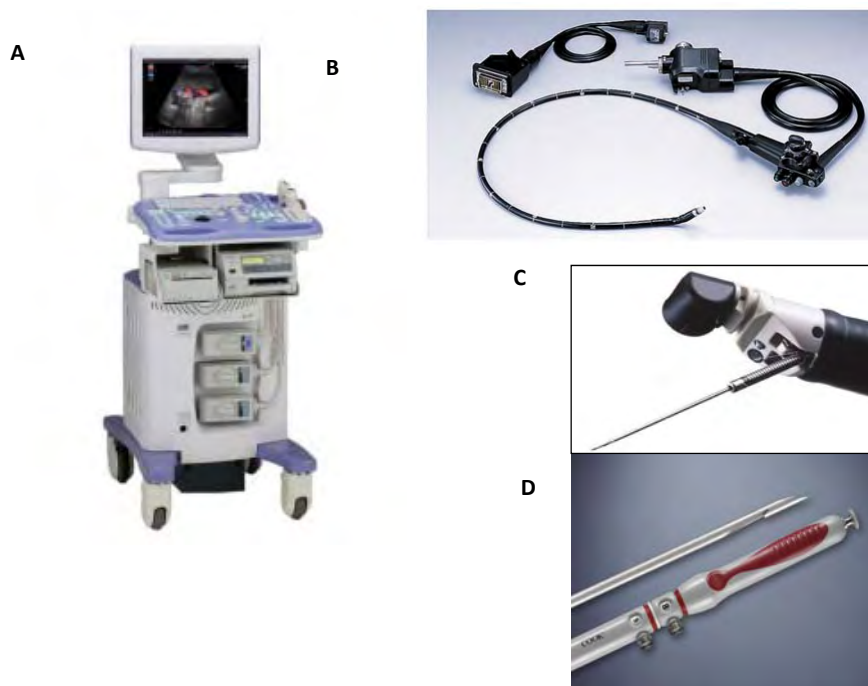


FIGURE 9 :

A: console pour connexion l'échoendoscope

B: échoendoscope UM160 olympus

C: extrémité distale de l'échoendoscope avec passage de l'aiguille à biopsie par le canal opérateur

D: aiguille pour ponction sous échoendoscopie

Cependant, l'échantillon obtenu est de taille mais surtout de qualité variable rendant difficile son analyse. Dans une étude prospective, Iglesias-Garcia et al (31, 32), ont démontré qu'un élément important est l'expérience de l'anatomo pathologiste et non pas la technique de prélèvement pour obtenir un résultat concordant avec le diagnostic final à partir d'un matériel obtenu par échoendoscopie. En revanche, la qualité des prélèvements varie en fonction du type d'aiguille utilisé : ainsi les aiguilles de 19G permettent d'obtenir du matériel de qualité sans augmenter la morbidité mais elles ne peuvent pas toujours être utilisées pour des raisons techniques notamment lors de la voie trans duodénale du fait de leur rigidité plus marquée (33).

Il est possible de pratiquer une cytologie conventionnelle ou une inclusion du matériel directement en paraffine à partir du matériel obtenu par ponction. L'analyse cytologique permet de préciser en premier lieu le diagnostic du syndrome de masse prélevé (30). Dans le cas qui nous intéresse particulièrement, il s'agit de faire le diagnostic différentiel entre la PCC et le cancer du pancréas (Figure 10). L'échoendoscopie avec ponction est une technique qui permet l'obtention d'échantillons pour l'étude des différents marqueurs moléculaires, qui peuvent être recherchés en « routine » grâce aux plateformes de biologie moléculaire ou être utilisés dans le cadre de « recherche translationnelle ». Nous avons été l'une des premières équipes à mettre en œuvre ce type de prélèvement à visée de recherche mais aussi de diagnostic dans le cadre d'un transfert de technologie (34).

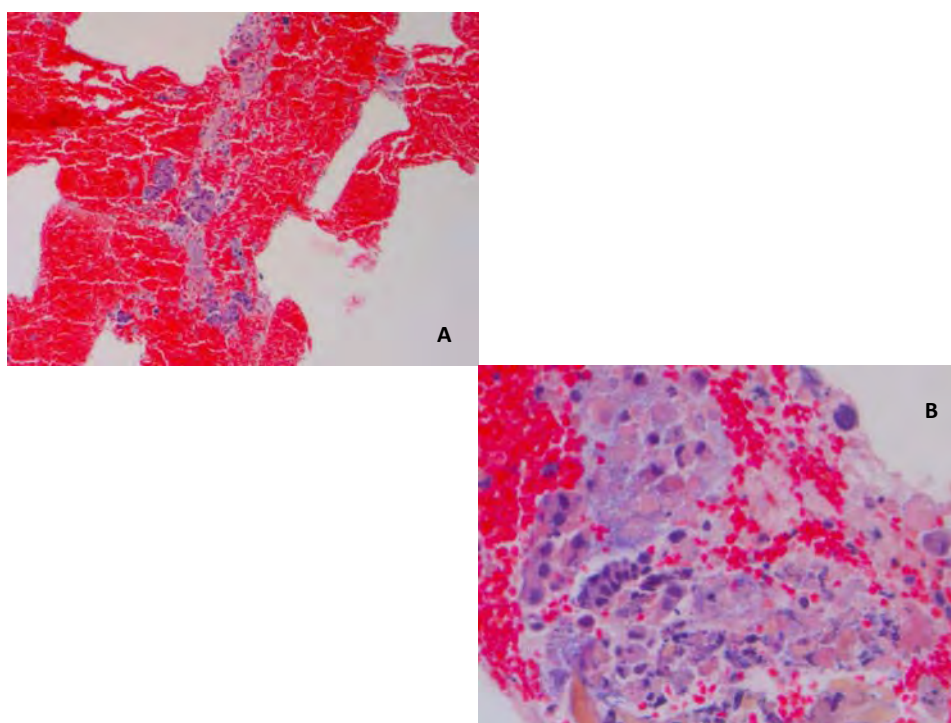


FIGURE 10 :

A: coupe histologique d'une biopsie faite sous échoendoscopie d'un adénocarcinome pancréatique

B: grossissement X100 d'une coupe histologique d'un adénocarcinome pancréatique avec présence de nécrose tumorale

L'échoendoscopie présente une faible morbidité, de l'ordre de 0,093%, et une absence de mortalité. Si on associe à l'EUS la cytoponction d'un syndrome de masse pancréatique, la

morbidity augmente entre 1 et 3% ; un travail réalisé dans l'équipe a permis de démontrer une morbidité de l'ordre de 2,2% sans mortalité (35) (résultats sur 500 patients). La sensibilité et la spécificité de cette technique sont respectivement de 87% et de 96% pour l'obtention d'un résultat anatomo pathologique d'un syndrome de masse pancréatique (36, 37). La sensibilité est supérieure à celle d'une biopsie réalisée sous contrôle échographique trans pariétal ou scanner qui est de 62% ; de plus ces voies d'abord sont à risque non négligeable d'essaimage intra péritonéal en cas de biopsies de tumeurs malignes (d'où le risque de récurrence après traitement notamment sous forme de carcinose péritonéale) (38). Ce risque conduit à privilégier la réalisation d'une échoendoscopie avec cytoponction en première intention pour obtenir un diagnostic anatomopathologique de confirmation d'un syndrome de masse pancréatique (tissulaire, kystique ou mixte tissu/kyste). Dans le cadre de la PCC, il faut savoir que la sensibilité et la spécificité de l'échoendoscopie avec cytoponction pour le diagnostic est moins performante. En effet la sensibilité est de l'ordre de 64 à 74% et la spécificité est de 76 à 100% selon différentes études. Cette différence est surtout liée à la structure histologique du pancréas qui est plutôt fibreux et calcifié pouvant ainsi gêner le prélèvement et l'analyse anatomopathologique (39-41).

Malgré la ponction sous échoendoscopie, certains patients n'ont pas de diagnostic histologique pour leur syndrome de masse pancréatique (42). Cette situation problématique est estimée entre 5 et 35% des patients selon les séries qui vont se voir proposer une duodéno pancréatectomie céphalique (morbidity de 15 à 65 % et mortalité de 3 à 9 % selon les équipes) pour une pathologie bénigne, parmi laquelle on retrouve aussi la pancréatite auto immune(43) (Figure 11). Compte tenu des difficultés pour obtenir un diagnostic anatomopathologique dans le cadre d'une PCC pseudo tumorale, il est nécessaire d'identifier d'autres éléments d'orientation vers le diagnostic positif. Ainsi, l'idée est d'associer une analyse d'altérations moléculaires à partir des échantillons obtenus afin d'améliorer le rendement diagnostique de l'échoendoscopie avec cytoponction. Ce concept est à la base de nos travaux. Il est en effet, possible de réaliser une extraction d'ADN ou d'ARN à partir du matériel prélevé pour identifier des marqueurs moléculaires, dans un but de diagnostic, qu'il soit positif ou différentiel (44). Cependant, ces études sont plus difficiles compte tenu de la pauvreté en cellules et en tissu de ces prélèvements ; en conséquence, la plupart des approches moléculaires font appel à l'amplification génique. Pour pouvoir

réaliser ces analyses, il faut cependant éviter tout conditionnement des prélèvements dans un milieu de fixation contenant de l'acide picrique (dénaturant les acides nucléiques) comme le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique) ou de Duboscq Brazil (mélange acide picrique, acétique, formol et éthanol à 100%). Selon les différentes pratiques du laboratoire d'anatomie pathologique, le prélèvement est soit directement fixé dans la salle d'endoscopie où il est nécessaire de privilégier comme milieu de fixation le formol, soit conditionné dans un milieu de transport « Cytolyt® » pour être secondairement fixé au laboratoire dans du Preservcyt®. Ces deux milieux (formol et Preservcyt®) permettent un recueil de cellules et par conséquent l'extraction d'acides nucléiques. L'extraction peut aussi être réalisée sur du matériel frais (cytologie) immédiatement congelé à -25°C. Pour la conservation de l'ARN, on privilégie le RNeasy Lysis Buffer (QUIAGEN) afin de préserver leur quantité et leur qualité. La recherche de la mutation *KRAS* est l'analyse la plus fréquemment réalisée que ce soit dans le cadre du diagnostic positif du cancer du pancréas ou pour le diagnostic différentiel avec la pancréatite chronique pseudo tumorale (45-47).

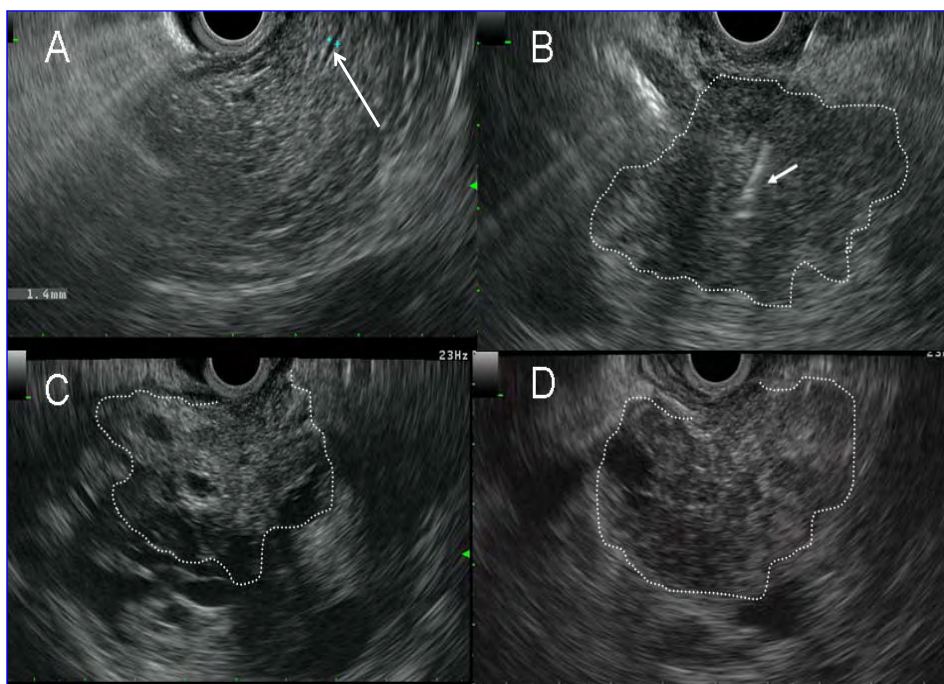


FIGURE 11 : échoendoscopie

A: pancréas normal canal de Wirsung (flèche blanche)

B: aspect en échoendoscopie d'un adénocarcinome pancréatique avec aiguille de cytoponction (flèche blanche)

C: aspect hétérogène et hypertrophié du parenchyme pancréatique évocateur d'une pancréatite chronique pseudo-tumorale (*alcool*)

D: aspect évocateur d'une pancréatite chronique pseudo-tumorale (*auto-immune*)

V. LES ALTERATIONS DE L'EXPRESSION GENIQUE AU COURS DU CANCER DU PANCREAS ET DE LA PANCREATITE CHRONIQUE

La carcinogénèse pancréatique est complexe et consécutive à une multitude d'altérations moléculaires. Aussi plusieurs acteurs cellulaires entrent dans l'architecture de ce cancer tel que la cellule cancéreuse épithéliale, mais aussi les cellules souches cancéreuses ou les cellules étoilées du micro environnement. Ce dernier va notamment jouer un rôle dans la dissémination tumorale. La connaissance des différentes voies qui conduisent au développement du cancer du pancréas permet l'élaboration de nouvelles stratégies non seulement diagnostiques mais aussi thérapeutiques avec l'utilisation de molécules qui pourront cibler certaines étapes de la cancérogénèse. Dans ce document, nous nous sommes principalement concentrés sur l'étude des altérations moléculaires des cellules cancéreuses pancréatiques à visée diagnostique (48).

1. Les altérations géniques dans le cancer du pancréas

De nombreuses altérations géniques apparaissent progressivement au décours de la carcinogénèse pancréatique (49). Deux principales classes de biomolécules sont la cible de ces altérations : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur.

Les oncogènes proviennent de gènes cellulaires non altérés (proto-oncogènes) contrôlant les étapes de la croissance et de la différenciation cellulaire. Lorsqu'ils sont activés (surexpression, mutation ponctuelle), ils contribuent à la transformation maligne de la cellule. D'une façon générale, une mutation ponctuelle mono-allélique ou des deux allèles d'un oncogène se traduit par une dérégulation de la fonction ou de l'expression de la protéine pour laquelle il code. Les oncogènes sont classés selon leurs propriétés en familles : facteurs de croissance, récepteurs de facteurs de croissance, protéines impliquées dans la transduction des signaux prolifératifs, protéines nucléaires régulant le cycle cellulaire (51). Les altérations frappant les oncogènes sont multiples et apparaissent à différents moments de l'évolution et sur différents types anatomo pathologique de lésions pré cancéreuses. Ainsi Jones et al (50) ont rapporté 4 principales altérations géniques au décours du développement du cancer du pancréas. Ces modifications sont représentées par la mutation du gène *KRAS*, et par une atteinte de 3 gènes suppresseurs de tumeur que sont *p16/CDKN2*,

Tp53 et *SMAD4/DPC4*. L'altération de ces gènes va conduire à la dysfonction d'une douzaine de voies de signalisations cellulaires impliquées dans l'apoptose, l'invasion ou le contrôle des dommages à l'ADN. En marge de l'altération de ces gènes, on peut détecter la mutation ou l'amplification de facteurs de croissance et/ou de leurs récepteurs tels que l'EGFR (52). La connaissance de ses différentes anomalies génétiques a pour objectif de mettre en place, et si possible de valider, des moyens de diagnostics précoces, mais aussi d'aider au diagnostic différentiel, d'obtenir des éléments sur le pronostic du patient et enfin d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques (Figure 12).

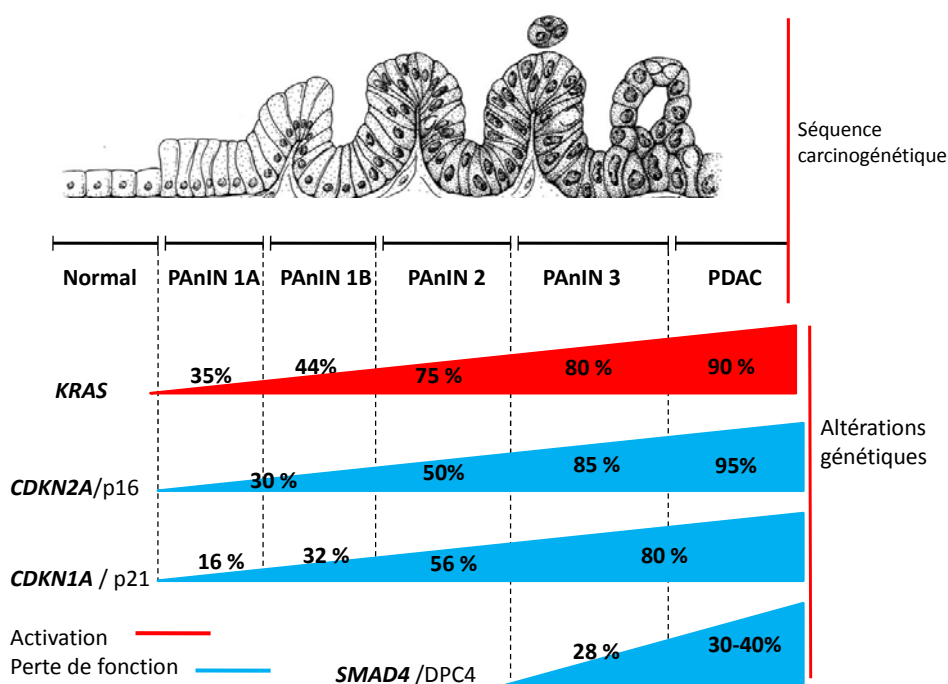


FIGURE 12 : Séquence carcinogénétique des lésions PanIN à l'adénocarcinome pancréatique (d'après Hruban 2000 et Iacobuzio-Donahue 2012)

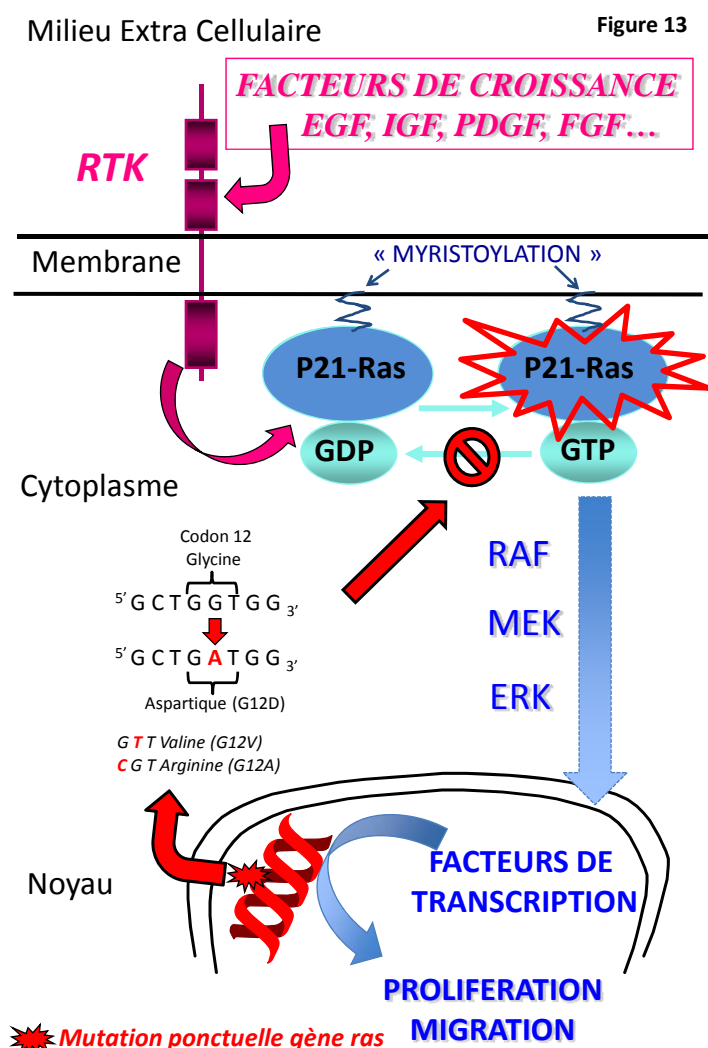
A. Exemple de gènes dont l'expression ou l'activité est induite lors de la carcinogenèse pancréatique.

a. L'oncogène KRAS

L'oncogène *KRAS* fait partie de la famille ras (H pour Harvey, N pour neuroblastome, et K pour Kirsten) codant pour une protéine de 21 kDa impliquée dans la transduction de signaux prolifératifs. Le gène *KRAS* se situe sur le chromosome 12 (12p12 pour K-ras). La protéine p21-ras est cytosolique et son ancrage à la face interne de la membrane cytoplasmique par son extrémité c-terminale est nécessaire à son activité. La protéine p21 ras présente des homologies de structure avec la sous-unité alpha des G-protéines (53). Son activation se fait en 4 étapes : dans un premier temps, la farnétylation décroche la protéine de la membrane cellulaire et permet son ancrage à un micrososome. Dans un deuxième temps, elle présente le clivage du peptide AAX ; dans un troisième temps intervient la carboxylation des résidus farnétylcystéine N terminaux et enfin une palmitoylation qui permet à nouveau l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire (Figure 13). Les protéines ras ont une activité GTPase intrinsèque faible et fonctionnent comme un « interrupteur GDP/GTP ». La forme liée au GTP est active, alors que la forme liée au GDP est dépourvue d'activité(54). Les facteurs d'échanges de nucléotides guanidiques (GEF) permettent l'échange de GDP en GTP avec activation de ras. De leur côté les GTPase-activating proteins (GAP) stimule l'activité GTPasique de p21 ras transformant le GTP en GDP et par conséquent provoquant l'inactivation de la protéine ras. Une fois activée, p21-ras transmet les signaux prolifératifs des facteurs de croissance couplés au récepteur 7G et aux récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGF. Après activation de p21-ras, les signaux prolifératifs sont activés en cascade des protéines de transduction situées en aval comme MAPK/MEK mais aussi PI3K et ERK (sérine/thréonine kinases) via les protéines Raf par phosphorylation (55).

La mutation de l'oncogène *KRAS* siège au niveau des exons 1 et 2 et plus particulièrement au niveau du codon 12 (mutation de loin la plus fréquente au niveau de la première ou deuxième base), plus rarement au niveau des codons 13, 19, 59 et 61. La forme sauvage du codon 12 est GGT (pour l'acide aminé glycine). La mutation survient en général sur le premier ou le deuxième nucléotide. Par ordre de fréquence, les formes mutées sont GAT (acide aspartique), GTT (valine) et enfin CGT (arginine). Concernant le codon 13, une glycine

est transformée le plus souvent en acide aspartique (GAT). Toutes les mutations modifient le site de liaison du GTP (19). L'activité GTP-asiq de p21-ras mutée est réduite, ainsi que sa capacité à interagir avec les GTP-ase activating proteins. La conséquence fonctionnelle de cette mutation est une activation permanente puisque p21 ras est en permanence liée au GTP.



Depuis 2003, la communauté scientifique dispose de modèles animaux de souris génétiquement modifiées constituant une aide à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de cancérogenèse. Ces lignées murines ont permis de valider le rôle oncogénique du gène *KRAS*. Ainsi, la cassette Lox-Stop-Lox-*KRAS* G12D est placée au niveau du locus endogène de *KRAS*. La recombinaison Cre exprimée sous le contrôle des promoteurs des facteurs de transcription PDX1 ou PTF1 induit l'expression de *KRAS* muté à des niveaux physiologiques dans le pancréas embryonnaire. En conséquence, ces souris

transgéniques développent des lésions de type PANIN mais l'évolution vers le cancer est très rare (10% des cas.) Par la suite, d'autres modèles ont été développés combinant l'expression conditionnelle d'une forme mutante de *KRAS* et l'inactivation du locus de *P16*, ou l'expression d'une forme dominante négative de *p53* (56).

La mutation de l'oncogène *KRAS* est retrouvée dans 75 à 95 % des pièces d'exérèse tumorale de pancréas. En revanche, sa mise en évidence est moins fréquente lorsque la recherche est réalisée à partir de matériel obtenu sous échoendoscopie; ainsi selon les séries de la littérature, la fréquence de mutation de l'oncogène *KRAS* varie entre 63 et 83%. C'est l'une des premières anomalies à apparaître au décours de la carcinogénèse pancréatique. Ainsi dès l'apparition des PANIN de type 1, on retrouve dans 35% des cas un *KRAS* muté. Dans les PANIN de type 3, l'oncogène *KRAS* est retrouvé muté dans 75 % des cas (57). La mutation de *KRAS* est aussi mise en évidence dans l'évolution des TIPMP dans 50 % des cas, tous types anatomopathologiques confondus. La fréquence de la mutation de l'oncogène *KRAS* est variable (21) selon le sous type histologique : la mutation est plus fréquente dans le type pancréato biliaire que dans la forme oncocytaire (58, 59). Dans le cadre des kystes mucineux, la fréquence de la mutation est variable selon le type histologique. Les lésions de type adénome présentent un taux de mutation de 20 %, les formes dites borderline sont retrouvées mutées dans 33% et les carcinomes *in situ* dans 87% des cas. Il n'existe pas de corrélation entre la taille de la lésion et la présence de la mutation de *KRAS*. (60)

b. L'oncogène *BRAF*

BRAF fait parti de la famille serine/thréonine kinase RAF. Ce gène est situé sur le chromosome 7. Il s'agit d'un acteur de la voie ras/MAP kinases. La mutation de *BRAF* provoque la stimulation permanente de la voie engendrant l'activation par phosphorylation de MEK et en conséquence la prolifération cellulaire (61, 62). En l'absence de mutation de *KRAS*, la mutation de *BRAF* constitue un moyen pour les cellules cancéreuses d'activer la voie des MAP kinases. La mutation activatrice de *BRAF* est retrouvée au niveau de l'exon 15, représentée le plus fréquemment par la mutation V600E et plus rarement V600D. Cette mutation est à l'origine du remplacement d'une Valine par un autre acide aminé (63). On dispose d'un modèle animal de souris génétiquement modifiée exprimant la mutation *BRAF* V600E. L'induction de la mutation de *BRAF* se retrouve à l'âge adulte sous le contrôle de la

Cre recombinase en aval du promoteur de Pdx1. Les souris développent des lésions de types PanIN, ce qui démontre que BRAF peut aussi provoquer la carcinogénèse pancréatique (64).

Les mutations de l'exon 15 du gène *BRAF* (et plus particulièrement la mutation V600E) ne sont rencontrées que dans 7 à 15 % des cas de cancer. La mutation de *BRAF* est plus rarement mise en évidence dans les TIPMP et ne représente que 3 % des altérations géniques dans cette pathologie (57, 65).

c. L'oncogène *GNAS*

GNAS code pour la sous unité alpha d'une protéine G (guanine nucleotide-binding protein). Le gène se situe sur le chromosome 20. La mutation ponctuelle est retrouvée sur le codon 201 ; il existe deux types de mutations R201C ou la R201H. Plus rarement, on peut mettre en évidence la mutation sur le codon 227 dans certaines tumeurs hypophysaires. Dans tous les cas, cette mutation est la conséquence de la substitution d'un acide aminé de type arginine, par une cystéine, ou une histidine. La mutation *GNAS* va entraîner l'activation de la voie GPCR (G-protein coupled receptors) (66). Les 3 sous unités du GPCR sont la sous unité alpha, bêta et gamma. La fixation d'un facteur de croissance sur le récepteur 7G provoque la séparation de la sous unité alpha des deux autres sous unités. La dissociation provoque l'activation de la sous unité alpha par le remplacement d'un GDP en GTP. Son fonctionnement provoque l'inhibition ou la stimulation de l'activité de l'adenylyl cyclase ce qui a pour conséquence une modulation de la production d'AMP cyclique. La sous unité alpha est inactivée par sa liaison au GDP. La mutation se trouve sur le site d'hydrolyse de la protéine qui restera couplée avec un GTP et donc active, selon un schéma comparable à ce qui est retrouvé avec l'oncogène *KRAS*. La mutation *GNAS* est mise en évidence dans 60% des TIPMP et apparaît précocement dans leur évolution ; en revanche aucun cancer du pancréas n'est muté pour *GNAS* sauf si la carcinogénèse a pour point de départ une TIPMP. *GNAS* semble donc être pour l'instant un gène muté spécifiquement au cours des TIPMP (67).

d. Le récepteur de l'EGF et son ligand

L'EGFR est un récepteur membranaire de la famille des récepteurs ErbB pourvu d'une activité tyrosine kinase. Il est aussi appelé aussi Erb1/HER1. La fixation de son ligand, à savoir EGF, TGF α ou l'amphiréguline, active 3 voies principales : la voie MAP kinase, la voie

PI3kinase, et la voie STAT (68, 69). Au cours du cancer du pancréas, on retrouve dans 65% des cas l'amplification du gène de l'EGFR, alors que la mutation ponctuelle est plus rare (de l'ordre de 4%). Cette mutation se localise au niveau de 4 exons (exons 18-21). La surexpression de l'EGFR est rencontrée dès le stade PANIN de type 1 et dans 25 à 65 % des cas de cancer du pancréas (tout comme celle de son ligand). Dans le cystadénocarcinome mucineux, cette surexpression est mise en évidence dans 60 % des cas alors qu'elle est absente dans la forme bénigne. Dans le cas des TIPMP, la mutation de l'EGFR semble spécifique de la forme intestinale (7,5% des cas) (70).

e. La télomérase

Les télomérases sont des ribonucléoprotéines qui catalysent l'addition d'une séquence répétée spécifique (télomère) à l'extrémité des chromosomes. Elles sont constituées de deux sous unités :

- la TERT ou sous unité protéique qui est une enzyme à activité transcriptase inverse de type ADN polymérase ARN dépendante. Elle assure la synthèse du télomère.
- La TERC ou sous unité ARN; il s'agit d'un ARN structuré comprenant plusieurs régions tige boucle et un pseudo nœud. Une des boucles de ce pseudo nœud sert de matrice à la synthèse de la répétition télomérique.

L'activité de la télomérase apparait réprimée dans la plupart des cellules somatiques sauf au sein de cellules à potentiel prolifératif comme les précurseurs hématopoïétiques, les cellules basales de la peau ou les cellules souches intestinales (71). La répression de l'activité de la télomérase a pour conséquence un raccourcissement progressif des télomères au fur et à mesure des divisions cellulaires, ce qui entraîne la sénescence de la cellule et sa mort. Dans les cellules cancéreuses, l'augmentation d'activité télomérase est liée à la mutation activatrice du gène hTERT codant pour la sous unité TERT de l'enzyme (72). L'activité télomérase a été mise en évidence dans 85 à 95% des cas de cancer du pancréas, mais également dans 3% des pancréatites chroniques ; en revanche cette activité télomérase est complètement absente dans le tissu pancréatique normal. Dans le cadre des TIPMP, une

augmentation de l'activité télomérase est retrouvée dans 23,7% des adénomes et des formes borderline, et dans 88,6% des carcinomes invasifs (73, 74).

B. Exemple de gènes dont l'expression ou l'activité est réprimée lors de la carcinogénèse pancréatique.

a. Les gènes suppresseurs de tumeur CDKN2, SMAD4 et P53.

Le gène *CDKN2A* est localisé sur le chromosome 9p, il code pour la protéine p16. La fonction de p16 est de se lier et d'inhiber la cycline D/CDK4 protéine kinase qui est une enzyme clé de la régulation du cycle cellulaire, notamment pour l'entrée des cellules en phase G1.

L'inactivation de *CDKN2A* s'accompagne d'une absence de contrôle du cycle cellulaire et par conséquent d'une persistance de la prolifération cellulaire. Dans 40% des cas, une délétion homozygote est responsable de la perte d'expression du gène *CDKN2A*, dans 40% des cas, c'est une mutation ponctuelle avec perte du deuxième allèle et dans 15 % une méthylation responsable de la mise sous silence du promoteur du gène (74). Ces anomalies sont observées dans 95% des cancers du pancréas ; elles apparaissent très précocement dans la carcinogénèse pancréatique (dans 30 % des PANIN 1 et 80 % des PANIN de type 2). Dans les TIPMP, la perte d'expression de p16 est mise en évidence dans près de 50 % des cas quel que soit le stade de différenciation anatomo pathologique (adénome, borderline ou dysplasie sévère). Cette perte est aussi détectée dans les cystadénomes mucineux (75, 78). Il existe un modèle murin associant la mutation activatrice G12D de *KRAS* et l'inactivation de p16 ; cette association conduit à un modèle animal développant des tumeurs très agressives, ce qui démontre l'importance de p16 dans la carcinogénèse pancréatique induite par la mutation *KRAS* (76, 77).

Le gène suppresseur de tumeur *SMAD4/DPC4*, fait partie de la famille des protéines SMAD est localisé sur le chromosome 18q. Il joue un rôle prépondérant dans la signalisation extra cellulaire via la voie du TGF bêta et plus particulièrement dans son activité anti proliférative et pro apoptotique. Dans le cancer du pancréas, l'inactivation de *SMAD4* est due soit à une mutation intra génique avec perte du deuxième allèle, soit à une délétion homozygote du locus 18q21.1 (79). La survenue de la mutation de *DPC4* apparait tardivement dans la carcinogénèse pancréatique; elle n'est mise en évidence qu'à partir du stade PANIN de type

3 dans 34% des cas. SMAD4 est perdu dans 55 % des cancers du pancréas. Dans les TIPMP, l'altération de DPC4 n'est mise en évidence qu'au stade d'adénocarcinome dans 38 % des cas (80-82). Le modèle murin associant la mutation activatrice de *KRAS* G12D et la délétion de *SMAD4* conduit au développement de cancer dont l'aspect anatomopathologique est en faveur d'une TIPMP de type gastrique (ces souris développent aussi des cancers gastriques) (83).

Le gène *TP53* (Tumor Protein 53, 17p) est un facteur de transcription qui présente une fonction essentiellement de régulation des processus d'apoptose, de réparation de l'ADN, de prolifération cellulaire, mais aussi de sénescence. P53 contrôle la transcription du gène codant pour la protéine p21 ou WAF1 ou CDK1 qui en se liant au complexe cyclin-CDK, bloque la cellule dans le cycle en G1 et provoque sa sénescence. L'inactivation du gène *TP53* est la conséquence d'une mutation intra génique avec perte du second allèle. Elle provoque une augmentation de l'instabilité génomique avec l'apparition de lésions non réparées de l'ADN (84). Près de 75 % des cancers du pancréas présentent une mutation de *TP53*. Quelque soit le type de lésions pré cancéreuses, l'inactivation de *TP53* survient tardivement dans la carcinogénèse pancréatique. Ainsi dans les lésions pré néoplasique PANIN, la mutation de *TP53* est rarement mise en évidence (12 %) avant le stade PANIN de type 3. En revanche, elle est beaucoup plus fréquente dans les TIPMP, ainsi la mutation de *TP53* dans la forme borderline des TIPMP est retrouvée dans (30 %) et dans la forme avec carcinome invasif dans 65 % (85-87). Le modèle murin combinant la mutation activatrice de *KRAS* G12D associée à la mutation de *TP53* dans le pancréas provoque le développement de tumeurs pancréatiques agressives avec une forte composante stromale (88).

b. Le récepteur de la somatostatine 2 ou SST2

La somatostatine est un neuropeptide hormonal secrétée par l'hypothalamus, le pancréas, l'estomac et l'intestin. Elle est synthétisée sous la forme d'une pré-protéine qui va subir un clivage alternatif pour obtenir deux formes actives en fonction du nombre d'acide aminés : la sst 14 ou 28(89). Cette hormone agit par l'intermédiaire de 5 sous-types de récepteurs transmembranaires (sst1 à sst5) couplés aux protéines G. La somatostatine est un naturel de la sécrétion de l'hormone GH ou des hormones gastro- intestinales. Nous avons démontré la perte d'expression du récepteur sst2 dans les cancers du pancréas (90%

incluant les métastases) D'une part, les deux mutations ponctuelles 83 A/G (33%) et 57 C/G (63%) dans la région promotrice du gène permet la fixation spécifique du facteur de transcription NF-1 qui inhibe la transcription de ce gène (92). D'autre part, la méthylation d'îlots CpG de la région promotrice distale participe à la perte d'expression de sst2. Des travaux réalisés dans l'équipe ont démontré que le gène de sst2 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur pour le cancer du pancréas (90, 91). *In vitro*, l'occupation du récepteur sst2 engendre un effet anti prolifératif via l'activation d'une tyrosine phosphatase (modèles de cellules normales et tumorales transfectées). La réexpression de ce récepteur dans des modèles expérimentaux de cancer du pancréas (transfection stable de cellules cancéreuses pancréatiques humaines *in vitro* et transfert de gène intra-tumoral *in vivo*) s'accompagne d'un effet antiprolifératif, d'une inhibition de la croissance *in vivo*, d'un effet anti tumoral de voisinage et de la réduction du pouvoir métastatique (93). En conséquence, le transfert du gène sst2 est à la base d'un essai de thérapie génique de phase I dans le traitement de l'adénocarcinome pancréatique. Cet essai a été conduit dans l'équipe chez 22 patients porteurs d'un cancer du pancréas métastatique ou localement avancé pendant les 2 dernières années ; les résultats en termes de faisabilité, sécurité et efficacité sont très prometteurs et autorisent la conduite d'un essai de phase II.

C. La voie Hedgehog

Sonic Hedgehog (Shh) est une protéine de la famille hedgehog au même titre que Dhh (*Drosophila* hh) et Ihh (*Indian* hh). Shh est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est ensuite clivé pour constituer la protéine active. Il s'agit d'un ligand pour le récepteur patched (PTCH). En absence de Shh, ce récepteur transmembranaire bloque le récepteur smoothed (SMO) et réprime son activité. La fixation de Shh sur PTCH provoque la levée de l'inhibition de SMO et engendre le signal de transduction par l'intermédiaire de la famille GLI (facteur de transcription en doigt de zinc) (94, 95).

La voie hedgehog est altérée dans trois des compartiments cellulaires du cancer du pancréas à savoir la cellule cancéreuse pancréatique, la cellule souche pancréatique et les cellules étoilées. La production de Shh par la cellule cancéreuse pancréatique provoque l'activation de la voie hedgehog qui est responsable notamment du développement du stroma de type ovarien (96). Ce signal entraîne aussi la prolifération cellulaire. Shh n'est pas exprimé dans le

pancréas normal; en revanche, Shh est augmenté dans les PAnIN et dans 70% des adénocarcinomes pancréatiques. Le développement d'un modèle murin avec une expression de Shh induite par le promoteur Pdx1 conduit à l'apparition dans le pancréas d'anomalies morphologiques et génétiques évoquant des lésions de PanIN, ce qui démontre le rôle causal de Shh dans la carcinogenèse pancréatique (97).

2. Etude du profil transcriptomique des cellules cancéreuses pancréatiques

A. Intérêt clinique

Les travaux de l'équipe de Iacobuzio-Donahue (98, 99), menés sur des tissus provenant de pièces opératoires, ont démontré la surexpression de plusieurs gènes dont S100P, kératine 17 et MSLN (mésothéline) dans le cancer du pancréas avec en particulier. D'autres travaux ont permis la mise en évidence de la surexpression de S100A4, S100A2, PLAU, et MMP7. En pratique clinique, ces différents gènes présentent un intérêt pronostic dans la prise en charge du patient.

MMP7 est une Matrix Metallo Protéase sécrétée par la cellule pour dégrader la matrice extra cellulaire. Elle est produite à l'état de pro protéine qui est activée par clivage par une protéase extra cellulaire (100). Les protéines S100P, S100A4 et S100A2 font partie de la famille de protéine de liaison au calcium S100 ; elles sont caractérisées par un faible poids moléculaires et sont dénommées ainsi en raison de leur solubilité dans une solution d'ammonium à 100% (101, 103). Cette famille est constituée d'un groupe de protéine ayant la capacité de promouvoir l'invasion et les métastases. S100A4 est connue sous différents noms tel que métastatine ou calvaculine. Elle est impliquée dans la mobilité et l'adhésion cellulaire mais aussi dans la prolifération cellulaire et de l'angiogénèse. S100P est impliquée dans le développement des lésions tumorales secondaires : en effet elle augmente la migration et la capacité de migration des cellules cancéreuses pancréatiques. S100P agit en se fixant à son récepteur RAGE (Receptor Advanced Glycation Endproduct) et active la voie Nuclear Factor- kappaB et Erk pour favoriser la prolifération cellulaire, la survie et la mobilité des cellules (104, 105). L'étude de l'expression par immuno histochimie sur des pièces opératoires ou sur du matériel de ponction sous échoendoscopie a démontré l'intérêt

pronostic de S100P et de S100A2 : ce sont tous deux des marqueurs de mauvais pronostic pour le patient (102).

Les lésions pré cancéreuses pancréatiques de type PanIN ont aussi fait l'objet d'une étude de l'expression des ARNm. En effet l'équipe de Buchholz et al. (107) a réalisé une extraction d'ARN à partir de la microdissection de PanIN, de cancer du pancréas et de pancréas normal afin de déterminer si certains gènes connus comme étant surexprimés dans le cancer du pancréas étaient aussi surexprimés dans les PanIN. Trente gènes correspondent aux critères précédemment déterminés avec parmi eux : S100P ou TFF1 (TreFoil Factors 1). Terris et al. (108) ont étudié par la technique SAGE l'expression de 4992 gènes à partir d'ARN extrait de TIPMP, de cancer du pancréas et de lignées cellulaires pancréatiques normales. Les TIPMP analysées dans l'étude ont été classées en « non invasives » ou « invasives » sur le plan anatomopathologique. Ainsi, les auteurs démontrent la surexpression de la lipocaline 2 (LCN2) ainsi que de trois protéines de la famille du TreFoil Factor (TFF) 1, 2, 3. Ces résultats sont confirmés par la suite par immunohistochimie. Ainsi la lipocaline 2 est surexprimée dans 97% des TIPMP et 95% des cancers du pancréas.

Ces deux études indépendantes font donc apparaître que les facteurs TreFoil sont surexprimés durant la carcinogenèse pancréatique. En condition normale, TFF 1, 2, 3 sont principalement exprimés au niveau du tractus digestif. Outre le cancer du pancréas, ces protéines sont surexprimées dans l'ulcère gastro duodéal et le cancer de l'estomac. Elles jouent un rôle dans la migration cellulaire par action sur les molécules d'adhésion comme la E cadhérine mais leur fonction est encore incomplètement connue.

La surexpression du gène de la protéine lipocaline 2 est mise en évidence dans de nombreux cancers épithéliaux comme le cancer du sein ou du pancréas(109). Elle participe et facilite l'invasion des cellules cancéreuses mais aussi l'angiogénèse tumorale. PLAU (plasmin activator urokinase) et PLAT (Tissue Plasminogen Activator) sont des protéines à activité sérine protéases qui assurent le clivage du plasminogène en plasmine de façon directe pour PLAT ou indirecte via l'urokinase pour PLAU. PLAU et PLAT sont impliqués dans la dégradation de la matrice extra cellulaire ainsi que dans la migration et la prolifération cellulaire en particulier des cellules cancéreuses pancréatiques. Ainsi, elles contribuent à la constitution des métastases. Dans un travail précédent fait au sein de l'équipe, nous avons utilisé une puce à ADNc (Clonetch's Human Cancer 1.2 macroarray) pour étudier le profil d'expression de 1176 gènes associés au cancer du pancréas (110). L'ARN est extrait de

lignées de cellules cancéreuses pancréatiques et de tissus de cancer du pancréas. Nous avons confirmé la surexpression de plusieurs gènes dans le cancer du pancréas tels que PLAT, KRT7, MMP7 et LCN2, par rapport au tissu pancréatique normal. De façon plus générale, nous avons retrouvé la surexpression de ces gènes impliqués dans l'invasion et les métastases dans le matériel de ponction sous échocendoscopie de cancer du pancréas localement avancés et métastatiques.

En conclusion, il est possible de quantifier l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la cancérogénèse pancréatique dans le tissu pancréatique normal, les lignées cellulaires et les tumeurs par la technique de puce à ADN ou celle de SAGE,. Un certain nombre d'études confirme que des gènes sont systématiquement et spécifiquement retrouvés surexprimés dans les tissus d'adénocarcinome pancréatique, provenant soit de cancers réséqués ou métastatiques. De façon remarquable, la plupart des gènes surexprimés sont impliqués dans les processus d'invasion et de migration, ce qui démontre le caractère agressif de cette pathologie tumorale. Ces études ont été à la base du choix des gènes que nous avons analysés dans notre projet qui a fait l'objet de ce travail de thèse par technique de Taqman Array à partir de prélèvement de cancer du pancréas localement avancés et/ou métastatiques.

3. Les microARNs

A. Généralités et biogenèse des microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des ARN courts non codants constitué de 21 à 24 nucléotides (en moyenne 22). Les miARNs sont transcrits sous forme de long précurseurs (les pri miARN). Ces précurseurs sont clivés dans le noyau par les enzymes Drosha et DGCR8 pour donner des pré miARN qui sont transportés de manière active hors du noyau. Dans le cytoplasme, le pré miARN est clivé par l'enzyme Dicer, qui hydrolyse la structure boucle, afin d'obtenir un petit ARN double brin appelé miARNdb. Ce miARN interagit avec des protéines de la famille des Argonautes (AGO1 ou AGO2) pour former le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Un seul brin est incorporé au RISC et va permettre l'interférence avec l'ARNm qu'il cible. Si l'interaction est parfaite entre le micro ARN et l'ARNm, l'hybride miARN:ARNm entraîne la dégradation rapide de l'ARNm. En revanche dans le cas le plus fréquent où la complémentarité est imparfaite, on observe alors une inhibition de la traduction de l'ARNm

cible ou une augmentation de sa dégradation. En général, l'appariement imparfait à lieu au niveau de la région 3'UTR (région 3' non codante de l'ARNm) (111-113) (Figure 14).

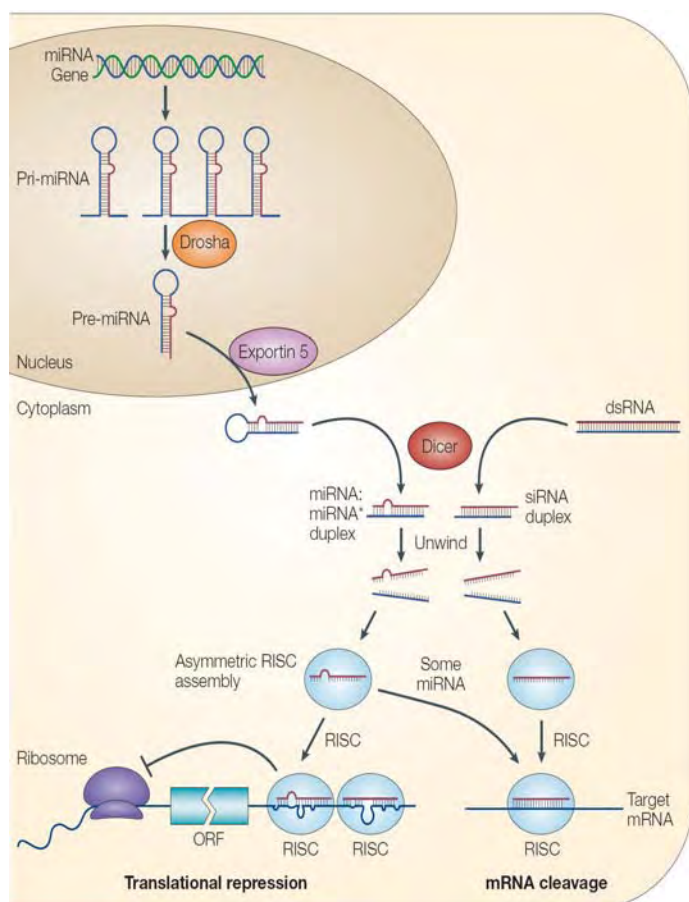


Figure 14 : structures des micro ARN

B. Intérêt clinique

Ainsi, un seul miARNs peut contrôler l'expression de plusieurs dizaines de protéines. En oncologie, les microARNs peuvent être classés en deux catégories:

- Les oncomirs qui sont surexprimés dans les cellules cancéreuses et qui favorisent leur prolifération, leur survie ou leur migration les
- les tsmiRS (pour miARNs suppresseurs de tumeur) qui sont réprimés dont la fonction est d'inhiber la progression tumorale :

Compte tenu de leur abondance relative et de leur grande stabilité, les miARNs sont facilement accessibles quelque soit le matériel biologique (sang, tumeur réséquée, cytoponction à l'aiguille fine) (119) et sont ainsi considérés comme des acteurs importants dans le dépistage du cancer du pancréas (Tableau 2). Notre équipe a caractérisé leur profil d'expression dans des lésions PanINs d'origine murine ou humaine ; nous avons ainsi démontré une augmentation progressive de l'expression de l'oncomiR miR-21 au sein des lésions pré néoplasique de type PanIN (114). Nous avons également étudié l'expression du précurseur du miARN *Let-7* dans le matériel de cytoponction effectuées dans des tumeurs primitives de patients porteurs de cancer pancréatique inopérable (Annexe 1) (115). Nous avons observé une diminution drastique de l'expression de ce miARN non seulement dans le matériel de cytoponction de tumeurs localement avancées mais aussi dans les pièces d'exérèses d'adénocarcinome pancréatique, et dans les lignées cellulaires qui en dérivent. Les miARNs constituent un outil pour le diagnostic positif mais surtout différentiel entre le cancer du pancréas et la pancréatite chronique. Ainsi, nous avons démontré que la méthylation de la séquence promotrice du miARN miR-148a est un marqueur différentiel entre PCC pseudo tumorale et cancer du pancréas localement avancé ou métastatique (116, 117). Enfin, certains miARN permettent d'établir le pronostic du patient mais aussi sa réponse au traitement par Gemcitabine (111). Enfin les miARN représentent une nouvelle classe de cibles thérapeutiques pour la prise en charge du cancer du pancréas. Ainsi, nous avons récemment démontré que le ciblage de l'oncomiR miR-21 dans des modèles expérimentaux inhibe la progression tumorale et favorise la chimio sensibilisation des cellules cancéreuses pancréatiques (118). En conclusion, les miARNs apparaissent comme des bio-marqueurs prometteurs pour le dépistage et pour le diagnostic précoce du cancer du pancréas. Par ailleurs, leur stabilité et leur présence au niveau du sang ou de la salive facilite l'obtention des échantillons biologiques pour des études non invasives.

miRNA	Biopsies	FNA	Serum	Ref
<i>Let-7a</i>	X(↓)	X(↓)		[20]
miR-34a	X(↓)			[11]
miR-96	X(↓)			[10]
miR-99a			X(↑)	[36]
miR-132	X(↑/↓)			[8,9]
miR-141	X(↓)			[14]
miR-143	X(↑)			[14]
miR-145	X(↑)			[14]
miR-146a	X(↑)			[14]
miR-148a	X(↓)			[14,17]
miR-148b	X(↓)	X(↓)		[14,21]
miR-150	X(↑)			[14]
miR155	X(↑)		X(↑)	[13,14,31]
miR-16			X(↑)	[34]
miR-181a	X(↑)			[13]
miR-181b	X(↑)			[13]
miR-181d	X(↑)			[13]
miR-185			X(↑)	[35]
miR-191			X(↑)	[35]
miR-196a	X(↑)	X(↑)	X(↑)	[14,17,18,31,34]
miR-196b	X(↑)			[14,17]
miR-20a			X(↑)	[35]
miR-200a			X(↑)	[33]
miR-200b			X(↑)	[33]
miR-203	X(↑)			[16]
miR-210	X(↑)		X(↑)	[17,32]
miR-212	X(↑)			[7]

miRNA	Biopsies	FNA	Circulating	Ref
miR-216	X(↓)			[14]
miR-217	X(↓)	X(↓)		[14,18]
miR-21	X(↑)	X(↑)	X(↑)	[7,13,15,31,36,37,30]
miR-210	X(↑)		X(↑)	[14,31]
miR-221	X(↑)		X(↑)	[7,13,38]
miR-222	X(↑)			[7,13,14]
miR-223	X(↑)			[14]
miR-24			X(↑)	[36]
miR-27a-3p			X(↑)	[35]
miR-29c	X(↓)			[14]
miR-30a-3p	X(↓)			[14]
miR-301	X(↑)			[7]
miR-31	X(↑)			[14]
miR-375	X(↓)			[14]
miR-376a	X(↑)			[7]
miR-494	X(↓)			[14]

Tableau 2 : Les micro ARN dans le cancer du pancréas d'après Humeau et al Clin Biochem 2013

4. Les altérations géniques dans la pancréatite chronique

A. Généralités

L'étude des altérations géniques dans la pancréatite chronique calcifiante (PCC) a été initiée plus dans un but de diagnostic différentiel avec le cancer du pancréas. En effet, devant un syndrome de masse pancréatique, il est souvent difficile de faire la différence entre un cancer ou une PCC pseudo tumorale sur la simple description morphologique apportée par l'imagerie (120, 121). La biopsie sous échoendoscopie peut avoir un intérêt si elle ne met pas en évidence de cellules carcinomateuses à l'examen anatomopathologique. Cependant, la ponction n'est contributive que dans seulement 10 % des cas. En général, cette intervention met en évidence des cellules participant à un processus inflammatoire (leucocytes, monocytes), ainsi que de la fibrose mêlée à des acini normaux. Le diagnostic de la PCC est

histologique (et non cytologique), donc il requière des micro biopsies pour permettre de différencier les adénocarcinomes bien différenciés et la PCC. En pratique courante, un suivi clinique du patient est nécessaire. Dans les cas où le diagnostic n'est pas établi ou en cas de ponction non-contributive (cellules peu abondantes, contaminants duodénaux ou gastriques, coagulum), les marqueurs moléculaires peuvent s'avérer essentiels pour le diagnostic positif et/ou différentiel (122).

B. Les altérations géniques et cellulaires au cours de la PCC

a. Exemple de gènes dont l'expression est modulée lors de la PCC

Parmi les marqueurs permettant la discrimination entre la PCC et le cancer, deux études menées par l'équipe de Friess et al. ont démontrée l'intérêt diagnostique de CRISP 3 (pour Cysteine Rich Secretory Protein 3) dans la PCC (123, 124). CRISP 3 est une glycoprotéine encodée par le gène *CRISP* situé sur le chromosome 6p. Son autre dénomination est SGP28. CRISP3 est essentiellement exprimée au sein des glandes salivaires, que ce soit du pancréas exocrine ou de la prostate. Dans un travail mené par l'équipe de Friess, il a été démontré une surexpression de l'ARN et de la protéine CRISP3 dans le cytoplasme des cellules pancréatiques chez des patients porteurs d'une PCC en comparaison avec le pancréas normal et les cellules adénocarcinomeuses. Néanmoins le rôle physiologique ou physiopathologique de CRISP3 n'est pas connu à ce jour.

La mutation de l'oncogène *KRAS* a aussi été recherchée au décours des PCC. Cette recherche a été réalisée à partir du sang, du suc pancréatique ou du liquide duodéal, de pièces opératoires et plus récemment à partir de matériel de ponction sous échocytoscopie. Ainsi, plusieurs travaux publiés et notamment ceux de Furuya et al (125) ont démontré la présence de la mutation de l'oncogène *KRAS* dans le suc pancréatique chez des patients porteurs d'une PCC. En parallèle, le travail de Shi et al (126) démontre la possibilité de rechercher la mutation de l'oncogène *KRAS* à partir de suc pancréatique obtenu en per opératoire. Pour expliquer cette positivité, les auteurs ont étudié les pièces opératoires sur le plan anatomopathologique et ont mis en évidence des lésions de type PanIN. Ainsi l'hypothèse avancée est une détection de la mutation de l'oncogène *KRAS* par la présence des lésions de type PanIN et non pas en raison de la PCC elle-même (127).

b. Rôles des cellules étoilées et du TGF β dans la PCC

La pancréatite chronique est caractérisée par le développement de fibrose avec apparition d'anomalie morphologique non spécifique des cellules acinaires et le recrutement de cellules de l'inflammation. Sa physiopathologie n'est pas encore complètement élucidée. On sait cependant que la pancréatotoxicité de l'alcool est dose-dépendante. Pour que les lésions de PCC apparaissent, une consommation chronique et prolongée d'alcool est nécessaire, sans que n'ait été définie de dose seuil journalière. L'alcool augmente la concentration protéique et par conséquent la viscosité du suc pancréatique ce qui entraîne la formation de bouchons (calculs) protéiques endo canaux qui vont progressivement se calcifier tout en obstruant les canaux excréteurs. Néanmoins, les événements cellulaires ne sont pas tous connus. La cellule étoilée du pancréas jouerait un rôle dans le développement des lésions de PCC. En effet l'alcool provoque la stimulation des cellules étoilées *in vitro* (128). L'activation de ces cellules provoque la dégradation de la matrice extra cellulaire, via l'activation des métallo protéases (MMP), ce qui peut engendrer fibrose et lésions cellulaires. Dernièrement, le rôle du TGF bêta a été avancé comme médiateur du développement et de l'accumulation de la fibrose pancréatique sans que le mécanisme d'action ne soit complètement élucidé. Le TGF β existe sous 3 iso formes (TGF bêta 1, 2, 3). L'iso forme 1 est, entre autre, produite par les cellules étoilées mais aussi par les cellules acinaires. La synthèse de TGF β 1 par les cellules acinaires entraîne l'augmentation de la production du collagène par les cellules étoilées. Le TGF β joue aussi un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Il s'agit d'une cytokine de l'immunomodulation. On le retrouve impliqué dans de la carcinogenèse et dans d'autres pathologies tel que le diabète, les maladies auto immune et cardio vasculaire. Le TGF β agit par l'intermédiaire de son récepteur membranaire après s'être dissocié du complexe latent qu'il forme avec le Latency Associated Protein (LAP) et Latent TGF β Binding Protein (LTBP). Il active différentes voies tel que la voie SMAD ou ras. Ainsi, la mise en évidence de l'ARN du TGF β sur le matériel de ponction pourrait être un élément intéressant comme cible thérapeutique pour diminuer la production de fibrose pancréatique(129).

OBJECTIF DU TRAVAIL

Le cancer du pancréas est un cancer de mauvais pronostic puisque le taux de survie à 5 ans est de l'ordre de 3,5%. Quatre-vingt-cinq pour cent des patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique sont diagnostiqués avec des tumeurs avancées ce qui limite grandement les possibilités de prise en charge à visée curative et par conséquent tout espoir de guérison. Les patients bénéficient au décours de leur prise en charge d'une échoendoscopie avec ponction afin d'obtenir une preuve de malignité du syndrome de masse pancréatique dont ils sont porteurs. L'identification des acteurs moléculaires impliqués dans la carcinogénèse pancréatique et pouvant servir d'outils au diagnostic positif de cancer et au diagnostic différentiel avec la PCC présente donc un intérêt majeur pour améliorer la prise en charge des patients.

Ainsi l'objectif de mon travail de thèse était de :

- Evaluer et développer à travers ce travail la faisabilité des techniques de biologie moléculaire à partir d'échantillons cliniques obtenus par ponction à l'aiguille fine sous échoendoscopie.
- Caractériser un profil d'expression de gènes cibles permettant d'aider au diagnostic du cancer du pancréas par des altérations moléculaires et/ou au diagnostic différentiel avec la PCC dans sa forme pseudo tumorale.
- Evaluer la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* comme biomarqueur permettant le diagnostic différentiel entre la PCC pseudo tumorale et le cancer du pancréas.

RESULTATS

I. OBJECTIF DE L'ARTICLE n° 1

- Evaluer la faisabilité des analyses en biologie moléculaire « extraction, purification, amplification, quantification par qPCR » à partir d'échantillons obtenus par ponction à l'aiguille fine sous échoendoscopie d'une masse solide pancréatique.
- Caractériser un profil d'expression de gènes cibles pouvant apporter une aide au diagnostic moléculaire du cancer du pancréas et/ou au diagnostic différentiel avec la PCC pseudo tumorale.

TITRE DE L'ARTICLE

Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low density array on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples

B. Bournet^{a,b}, A. Pointreau^{a,b}, A. Souque^a, N. Oumouhou^c, F. Muscari^{a,b}, B. Lepage^c, P. Senesse^d, M. Barthet^e, N. Lesavre^e, P. Hammel^f, P. Levy^f, P. Ruzniewski^f, P. Cordelier^a, L. Buscail^{a,b,*}

^aINSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, Bât. L3, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

^bDepartment of Gastroenterology, University of Toulouse, CHU Rangueil, Toulouse, France

^cINSERM U558, University of Toulouse, School of Medicine Purpan, Toulouse, France

^dDepartment of Oncology, Val d'Aurelle Center, Montpellier, France

^eDepartment of Gastroenterology and Center for Clinical Investigation, CHU Nord, Marseille, France

^fDepartment of Gastroenterology and Pancreatology, Beaujon Hospital, Clichy, France

[Pancreatology](#). 2012 Jan-Feb;12(1):27-34

Ce travail avait pour but d'étudier la faisabilité clinique et l'utilisation de la technique de Taqman low density array pour l'identification de l'expression de gènes discriminants entre le cancer du pancréas et la PCC à partir d'échantillons obtenus par ponction sous échoendoscopie.

Le cancer du pancréas et la PCC pseudo tumorale sont deux entités bien distinctes sur le plan du traitement, du pronostic pour le patient et de l'évolution de la maladie. Malheureusement, les examens d'imagerie actuels ne sont pas suffisamment performants pour poser un diagnostic de certitude sans obtenir une preuve anatomo-pathologique. Ainsi les cliniciens sont souvent confrontés à un patient porteur d'un syndrome de masse pancréatique pour lequel le diagnostic final peut être un cancer avec ses conséquences à court terme (chirurgie ? chimiothérapie ? pronostic ?) ou une PCC pseudo tumorale avec un meilleur pronostic mais des conséquences à long terme telles que la nécessité d'un suivi en particuliers pour rechercher des complications chroniques (diabète, insuffisance pancréatique exocrine).

Sur le plan histologique, l'aspect des cellules cancéreuses pancréatiques est pathognomonique et ne laisse pas de place au doute diagnostique lorsque celles-ci sont obtenues à partir d'une pièce opératoire. Le diagnostic devient plus difficile et nécessite toute l'expérience de l'anatomo-cytopathologiste pour faire le diagnostic à partir d'un matériel exigu et partiel de la tumeur, c'est-à-dire lorsque celui-ci est obtenu par ponction sous échoendoscopie. L'analyse cytologique et/ou histologique d'une PCC pseudo tumorale reste difficile compte tenu d'un matériel pauvre en cellule pancréatique mais riche en fibrose ou en cellules de l'inflammation. Ainsi le plus souvent, le diagnostic histologique de PCC est posé par défaut devant l'absence de mise en évidence de cellules cancéreuses. Avec un faisceau d'arguments à la fois « cliniques, para cliniques et de suivi », l'objectif final sera de conforter les cliniciens a posteriori dans le diagnostic de PCC.

L'analyse du transcriptome à la recherche de marqueurs moléculaires pour le diagnostic précoce, le pronostic et le développement de thérapies ciblées est réalisée historiquement à partir de puces à ADN complémentaire ou soit *via* la technique SAGE. Plusieurs équipes dont celles d'Iacobuzio-Donahue ou de Crnogorac-Jurcevic ont réalisés des travaux de transcriptomique utilisant soit les puces à ADN, soit la technique SAGE (Serial Analysis Gene

Expression) (98, 99, 130). Brièvement, la méthode SAGE est basée sur le séquençage : après extraction des ARNm, production d'ADNc puis isolation de petites séquences par digestion enzymatique, s'en suit la jonction de ces petites séquences puis enfin le clonage dans un vecteur bactérien et enfin séquençage. D'autre part, le choix de l'utilisation de la puce à ADN complémentaire se porte sur la possibilité de la composer « à façon » en fonction des gènes que l'on souhaite quantifier. Cette approche est cependant limitée par le nombre de gènes analysables et par la nécessité de procéder à une validation ultérieure des résultats par PCR en temps réel. En conséquence, nous avons opté pour l'utilisation d'une approche de Taqman array, qui présente l'avantage de fournir une mesure quantitative de l'expression des gènes, afin d'établir de façon prospective et multicentrique un profil d'expression de gènes discriminants à partir d'échantillons obtenus par ponction d'une masse solide pancréatique (PCC ou cancer) sous échoendoscopie.



Original article

Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low density array on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples

B. Boumet^{a,b}, A. Pointreau^{a,b}, A. Souque^a, N. Oumouhou^c, F. Muscari^{a,b}, B. Lepage^c, P. Senesse^d, M. Barthet^e, N. Lesavre^e, P. Hammel^f, P. Levy^f, P. Ruzsniowski^f, P. Cordelier^a, L. Buscail^{a,b,*}^aINSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, Bât. L3, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France^bDepartment of Gastroenterology, University of Toulouse, CHU Rangueil, Toulouse, France^cINSERM U558, University of Toulouse, School of Medicine Purpan, Toulouse, France^dDepartment of Oncology, Val d'Aurelle Center, Montpellier, France^eDepartment of Gastroenterology and Center for Clinical Investigation, CHU Nord, Marseille, France^fDepartment of Gastroenterology and Pancreatology, Beaujon Hospital, Clichy, France

A B S T R A C T

Keywords:

TaqMan low-density array
Advanced pancreatic cancer
Pseudotumoural Chronic pancreatitis
Cancer invasion
Fine needle aspiration**Aims:** The purpose of this study was to investigate the clinical feasibility and utility of low-density array analysis on samples obtained from endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy in locally advanced and/or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis.**Patients and methods:** In this prospective multicenter study, we quantified candidate gene expression in biopsies sampled from 44 locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma and from 17 pseudotumoural chronic pancreatitis using dedicated low-density array microfluidic plates.**Results:** We first demonstrated that 185 gene expression is stable and comparable in normal pancreas and pancreatic cancer tissues. Next, we found that eight genes (*S100P*, *PLAT*, *PLAU*, *MSLN*, *MMP-11*, *MMP-7*, *KRT7*, *KRT17*) were significantly over expressed in pancreatic cancer samples when compared to pseudotumoural chronic pancreatitis (*p* value ranging from 0.0007 to 0.0215); Linear discriminative analysis identified *S100P*, *PLAT*, *MSLN*, *MMP-7*, *KRT7* as highly explicative variables. The area under receiver operating curve establishes the clinical validity of the potential diagnostic markers identified in this study (values ranging from 0.69 to 0.76). In addition, combination of *S100P* and *KRT7* gave better diagnosis performances (Area Under Receiver Operating Curve 0.81, sensitivity 81%, specificity 77%).**Conclusion:** We demonstrate that molecular studies on EUS-guided FNA material are feasible for the identification and quantification of markers in PDAC patients diagnosed with non-resectable tumours. Using low-density array, we isolated a molecular signature of advanced pancreatic carcinoma including mostly cancer invasion-related genes. This work stems for the use of novel biomarkers for the molecular diagnosis of patient with solid pancreatic masses.

Copyright © 2012, IAP and EPC. Published by Elsevier India, a division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the most deadly tumor types. The 5-year survival rate after diagnosis is less than 3.5% [1]. The only curative treatment is surgical resection but this surgery is possible in only 10 to 15% of cases. The remaining cases with locally advanced and/or metastatic pancreatic cancer are treated in a palliative way with chemotherapy or best supportive cares [1]. This dismal prognostic is partly due to the lack of robust markers for the early diagnosis of PDAC that may jeopardize treatment efficacy in a subset of patients. In addition, discriminate

Abbreviations: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; CP, chronic pancreatitis; EUS-FNAB, endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy; LDA, low-density arrays; ROC curve, receiver operating characteristic curve; Ct, cycle threshold.

* Corresponding author. INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, Bât. L3, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 5 61 32 30 55; fax: +33 5 61 32 27 60.

E-mail address: Buscail.l@chu-toulouse.fr (L. Buscail).

PDAC from benign pancreatic diseases such as chronic pancreatitis (CP) (especially in its pseudotumoural form) is critical to avoid unnecessary resection of benign lesions. Thus, developing new diagnostic tools for the detection of PDAC is essential when current gold standards (cytopathology and histopathology) are not feasible or inconclusive [2]. Furthermore, a better knowledge of molecular mechanism underlying pancreatic oncogenesis may help to define potential new therapeutic targets.

An important issue in pancreatology is the limited access to tissue specimen in non-resected PDAC patients. In this context, endoscopic ultrasonography (EUS) appears as an improvement in abdominal imaging techniques. Moreover, EUS-guided fine needle aspiration-biopsy (EUS-FNAB) is a minimally invasive and effective technique for the diagnosis and staging of PDAC [3–5]. Last, others and we have demonstrated that nucleic acids sampled using EUS-FNAB are suitable for molecular analysis [2,6].

Large-scale analysis of gene expression (using high density micro and macroarrays) has been widely proposed as a powerful method for malignancy diagnosis, and/or to predict invasion and metastasis through the identification of biomarkers. Indeed, PDAC has previously been the focus of several studies comparing the expression profiles of primary and metastatic tissues with normal pancreas, with others tumors or with CP [7–12]. We and others have isolated several markers that are specifically expressed in PDAC tissues. Although these results are very exciting, these studies have been conducted on resected tumors (10 to 15 % of PDAC patients) hence excluding the vast majority (85%) of patients that are not undergoing curative surgery [7–14]. Herein, we conducted a prospective multicenter transcriptomic study based on EUS-FNAB material (i.e. minimally invasive sampling) from patients with pancreatic disease not eligible for surgery. The purpose of this study was to investigate the clinical feasibility and utility of low-density array analysis on EUS-FNAB samples from locally advanced and/or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma and pseudotumoural chronic pancreatitis. Using dedicated TaqMan low-density arrays, we identified a pattern of gene expression that segregates PDAC from benign CP.

2. Patients and methods

2.1. Patients

From January 2005 to April 2007, 108 patients with histologically proven adenocarcinoma by EUS-FNAB (PDAC group including locally advanced and/or metastatic tumours – 58 men, 50 women, mean age 66.1 years) and 27 patients (CP group – 26 men, 1 woman, mean age 59.9 years) with solid pancreatic mass lesion associated with CP (inflammatory pattern and fibrosis on FNAB) were included in four French referral centres (Clichy, Marseille, Montpellier and Toulouse) [2]. Informed written consent for both EUS-FNAB and TaqMan Low-density Array analysis was obtained for all patients. The protocol was approved by the regional ethical committee (CCPPRB Midi-Pyrénées II 6 January 2005 – protocol N°03 042 02). All the patients were followed-up clinically. The median survival was of 7 months for PDAC patients mostly treated with palliative chemotherapy until death. The median follow-up period for pseudotumoural CP patients was of 38 months and repeated EUS-FNA was performed in 12 patients with histological confirmation of CP. Patients with pancreatic cystic lesions, those that had undergone previous chemotherapy or pancreatic surgery, those with tumour different from PDAC and those for whom samples were inconclusive (i.e. presence of coagulum and/or low cell number and/or normal cells including duodenal and gastric cells) were excluded from Taqman Array analysis.

2.2. EUS-guided FNAB samples for mRNA extraction

EUS was performed under intra venous propofol anaesthesia as previously described in [2,5]. EUS-FNAB was performed using Wilson-Cook® EUS N1-22 gauge needle (Limerick, Ireland). Core biopsy samples of pancreatic tissues (head of the pancreas 77%) were transferred into either Dubosq-Brazil or Cytolyte medium with the needle stylet for further cytological and histological diagnoses. Once the core biopsies were reclaimed, the stylet was removed and the cellular material remaining in the needle was air flushed with a sterile 20 ml-syringe and put into a sterile 1 ml Eppendorf tube containing RNA-later reagent (Ambion, Huntington, UK) and immediately frozen at –25 °C until RNA extraction.

2.3. RNA sample extraction and amplification

After centrifugation, FNAB samples were resuspended in RLT lysis buffer (Qiagen SA, Courtabeuf, France) then total RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen SA, Courtabeuf, France) according to the manufacturer's instructions. After DNase treatment, RNA quality and quantity were determined with a bio-analysers (Biorad Experion analyser and Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). At this stage, RNA samples that were highly degraded (RNA 18S/28S ratio less than 1) or with a quantity lower than 100 pg per μ l were discarded. Next, we proceeded to reverse transcription and amplification with 5 ng of RNA using the Full Spectrum RNA Amplification Kit according to the manufacturer's recommendations (SBI, Mountain view, CA, USA). Briefly, this approach makes use of proprietary universal random primers that binds to, and primes synthesis from numerous sites found throughout RNA sequences (including mRNAs). Resulting first-Strand cDNAs are further amplified by 20 cycles of PCR using the full spectrum PCR primer and Taq polymerase. Amplified cDNA obtained from each EUS-FNAB samples were quantified by Pico-Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) and frozen at –80 °C before loading onto TaqMan low-density array micro-plates. Total RNA extracted from normal and cancerous pancreatic tissues [12] was also amplified and used for preliminary experiences in order to select control gene and reliability or RNA amplification.

2.4. TaqMan low-density arrays

To select optimal control endogenous gene, RNA from pancreatic tissues were amplified and loaded onto a low-density array (LDA) containing a panel of human endogenous control genes (Human endogenous control TaqMan® gene signature array from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After selecting the optimal control gene, we next designed a dedicated LDA (TaqMan® Low-Density Custom Arrays Pancreas2, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to analyze the expression of 23 genes simultaneously. These genes were found to be over or under expressed in resected PDAC when compared to normal pancreas or CP. The candidate genes are listed in Table 1 [7–26]. Gene expression analysis was performed in duplicate using 384-wells microfluidic plates (a total of 8 clinical samples were quantified per run). Fifty microliters of amplified cDNA (corresponding to $1.25 \pm 0.11 \mu$ g of cDNA) were loaded onto dedicated TaqMan LDA. Real-time RT-PCR amplifications were run on an ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the fluorescent 5' nuclease assay. A chart flow of the study is presented in Fig. 1.

Table 1
List of the 23 genes loaded on dedicated TaqMan Low density Array.

Gene symbol	Gene name	Molecular/cellular functions	Expression in PDAC ^a	References
<i>ADM</i>	adrenomedullin	Signal transduction angiogenesis	Over expressed	[15]
<i>BNIP3L</i>	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	Pro apoptotic	Over expressed	[16]
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1/Waf1)	Inhibition of Cyclin dependent kinase (CDK2, CDK4)	Over expressed	[12]
<i>CRSP3</i>	Cystein-rich secretory protein 3	unknown	Under expressed but Over expressed in CP	[13]
<i>ITGB4</i>	Integrin beta 4	Cell matrix adhesion	Over expressed	[9,12]
<i>KRT17</i>	Keratin 17	Cytoskeleton assembly	Over expressed	[9,17]
<i>KRT7</i>	Keratin 7	Cytoskeleton assembly	Over expressed	[9]
<i>LCN2</i>	Lipocalin 2	Transporter	Over expressed	[8,10,12]
<i>MMP-11</i>	Matrix metalloprotein 11	Degradation of extra cellular matrix	Over expressed	[12]
<i>MMP-2</i>	Matrix metalloprotein 2	Degradation of extra cellular matrix	Over expressed	[18]
<i>MMP-7</i>	Matrix metalloprotein 7	Degradation of extra cellular matrix	Over expressed	[8]
<i>MESN</i>	Mesothelin	Cell adhesion and proliferation	Over expressed	[9,10,19]
<i>PLAT</i>	Plasminogen activator tissue	Tissue degradation, cell invasion	Over expressed	[12]
<i>PLAU</i>	Plasmin activator urokinase	Markers of tumor metastasis, cell invasion	Over expressed	[8,11,12]
<i>S100A4</i>	S100 calcium binding protein A4	Markers of tumor metastasis and invasion	Over expressed	[10,20]
<i>S100P</i>	S100 binding protein P	Cell differentiation and tumor progression	Over expressed	[8,9,11,21]
<i>SFN</i>	Stratfin	Cell proliferation, apoptosis	Over expressed	[22]
<i>DPC4</i>	deleted in pancreatic cancer 4	Transcription factor activity	Under expressed	[23]
<i>SSTR2</i>	Somatostatin receptor 2	Negative regulation of cell proliferation	Under expressed	[24]
<i>TIMP1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Metalloproteinase inhibitor 1	Over expressed	[7,12]
<i>TIMP2</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Metalloproteinase inhibitor 2	Over expressed	[18]
<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase	Cell immortality	Over expressed	[25]
<i>SHH</i>	Sonic hedgehog homolog	signaling protein	Over expressed	[26]
<i>18S</i>	Ribosomal gene	Endogenous gene control	–	–

^a Results from studies mostly using cDNA arrays CHIP with comparison between: pancreatic carcinoma (PDAC) and normal pancreas or PDAC and chronic pancreatitis (CP) tissues.

2.5. Data analysis

TaqMan low-density array data were analyzed using the Cycle threshold (Ct) Comparative Method of relative quantification. The delta Ct results (ΔCt) (normalization with 18S) were used for

statistical analysis comparing the two groups of patients with PDAC and CP. Statistical analysis were performed using STAT32, PRISM 5 and R Development Core Team (version 2.9.2) softwares.

3. Results

3.1. Selection of candidate reference gene

Many reference genes, assumed to have a stable expression have been used to normalize expression in transcriptomics. Surprisingly, there are relatively few reports concerning the study of stably expressed genes for pancreatic tissues studies. As a consequence, we conducted preliminary experiments to identify the optimal endogenous control gene that would be subsequently used for gene normalization. Amplified RNA sampled from normal pancreas ($n = 4$) and PDAC ($n = 4$, from surgical resection) was subjected to Human endogenous control TaqMan[®] gene signature array. As shown in Fig. 2, *18S*, *HRPT1*, *IPO8*, *TBP* and *UBC* gene expression is stable (SD less than three times the mean average and median values) and statistically not different in normal pancreas as compared to PDAC. Noteworthy, *18S* RNA is up-regulated in these samples as compared to RNA encoding for *HPRT1*, *IPO8*, *TBP* and *UBC*. On the other hand, we found that the common reference genes used in transcriptomic studies such as *GAPDH* and, to a lower extent, *ACTIN* were up regulated in tumour tissues when compared to normal pancreas. Based on these results, we elected *18S* as reference for gene normalization.

3.2. Reliability of RNA amplification of human pancreatic samples

We next assessed the efficacy and the reproducibility of gene quantification following RNA amplification. Thus, RNA sampled from pancreatic tumour tissues following surgery ($n = 4$) were amplified and analysed by qPCR on the dedicated LDA as described in material and methods. While most of the candidate genes were not detected when using very low quantity of starting material

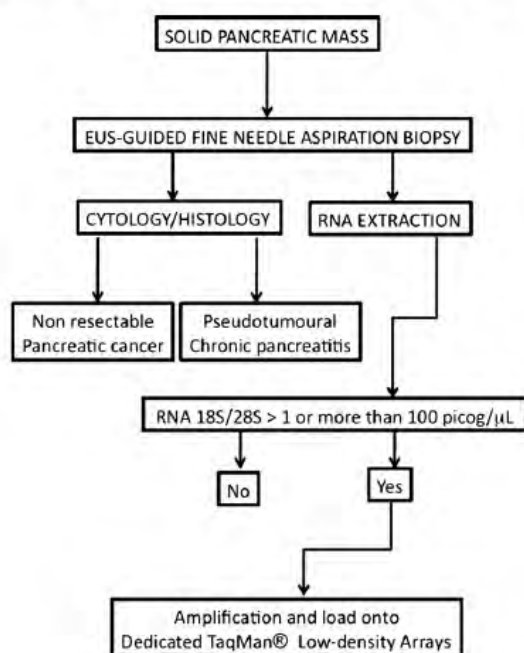


Fig. 1. Detailed chart flow of the study.

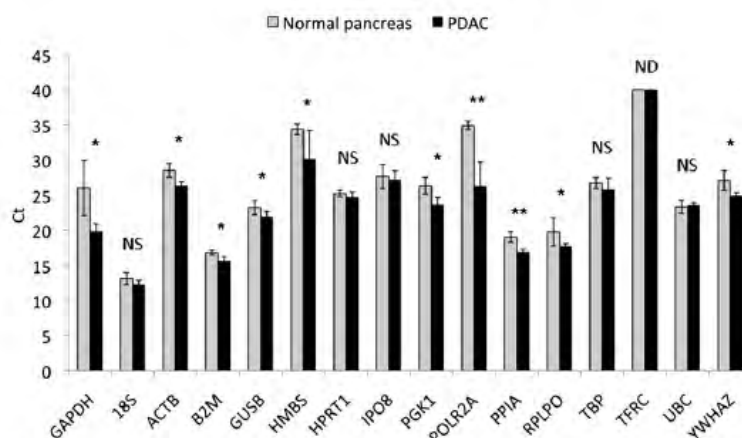


Fig. 2. Selection of the candidate reference gene. Total RNA was collected from normal pancreas ($n = 4$) or pancreatic adenocarcinoma (PDAC) tissues ($n = 4$) before amplification. Gene expression was measured in duplicate by quantitative PCR using Human endogenous control TaqMan® gene signature array. Results are expressed as Ct and indicated as mean \pm S.E. Unpaired t -test: (PDAC vs normal pancreas) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. NS: not significant, ND: not detected. *GAPDH*: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *18S*: 18S ribosomal RNA, *ACTB*: beta actin, *B2M*: beta2-microglobulin, *GUSB*: glucuronidase beta, *HMBS*: hydroxymethylbilane synthase, *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyltransferase I, *IPO8*: importin β , *PGK1*: phosphoglycerate kinase, *POLR2A*: polymérase II polypeptide 2A, *PPIA*: peptidylprolyl isomerase A, *RPLPO*: ribosomal protein large P0, *TBP*: TATA box binding protein, *TERC*: transferrin receptor, *UBC*: ubiquitin C, *YWHAZ*: monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide.

(5 ng) for reverse transcription, RNA amplification substantially increases the level of detection of the candidate genes, except for *HTERT* and *SHH* (Fig. 3A). Last, we found that RNA amplification is highly reproducible (RNA amplified vs non amplified RNA: Pearson test result = 0.88 ± 0.11) for the entire panel of genes tested in pancreatic tumours. We next applied this approach to RNA extracted from EUS-FNAB samples of PDAC and CP. Based on their quantity and quality, RNA sampled from 17 CP (over 27 CP), 14 locally advanced PDAC and 30 metastatic PDAC (44 PDAC over 108) were eligible for amplification. The amount of cDNA generated following amplification was quantified by picogreen analysis. We found that RNA amplification efficacy is similar in PDAC and CP samples (Fig. 3B) and corresponds to a mean 600-fold of amplification. Taken together, our results demonstrate that RNA amplification from EUS-FNAB material is feasible and not influenced by the sample's origin (i.e. tumoural or inflammatory pancreatic mass).

3.3. Comparative expression profiling in PDAC and pseudotumoural CP

Sixty-one samples were successfully analyzed following RNA amplification and LDA quantification. After normalization with 18S gene quantification, the results expressed in Δ Ct of each selected gene from PDAC group were compared to those from CP group. Rough expression data are available on URL: recommended software Filezilla. ftp://194.57.225.215, login: cordelieftp, password: cordelieftp, directory ftp "bournet". After normality and equality variances tests (Shapiro, Fisher), the multiple Student and Wilcoxon tests revealed that 8 genes were significantly over expressed in the PDAC group (Fig. 4). To definitively avoid alpha risk possibly generated by multiple tests, Benjamini-Hochberg correction test has been applied and confirmed that these 8 genes were definitively significantly over expressed in PDAC samples when compared to those from pseudotumoural CP as follow in rank of significance *S100P* ($p = 0.0007$), *KRT7* ($p = 0.0031$), *PLAU* ($p = 0.0059$), *MSLN* ($p = 0.0068$), *MMP-11* ($p = 0.0070$), *MMP-7* ($p = 0.0105$), *KRT17* ($p = 0.0139$) and *PLAT* ($p = 0.0215$) (Table 2). After linear discriminative analysis (Wilks lambda and bivariate

analysis), 5 genes have been isolated as explicative variables: *S100P*, *PLAT*, *MMP7*, *MSLN* and *KRT7*. Using these 5 genes isolated by this discriminative analysis, the graphic representation of the results from patients of both groups is shown on Fig. 5. This representation confirm that the gene profile of the PDAC group clearly discriminates from that of the CP group (i.e. two distinct profiles on two separate sides of a discriminative axis).

Receivers operating characteristic (ROC) curve analysis and diagnosis values of *S100P*, *KRT7*, *PLAU*, *MSLN*, *MMP-11*, *MMP-7*, *KRT17* and *PLAT* are shown in Table 3. Noteworthy, the calculated area under ROC curve values is superior to 0.68 and significantly discriminate PDAC from CP. Applying multivariate logistic model we investigate the interest of combination of genes in order to improve area under ROC curves and diagnosis values. Among all combinations, only one allowed to increase the area under ROC curve, sensitivity and specificity: combination of *S100P* and *KRT7* with area under ROC curve of 0.81, sensitivity 80%, specificity 77%. We next performed molecular analysis on nine additional pancreatic FNA with inconclusive results at cytopathology that were ultimately diagnosed as PDAC following a second EUS-guided FNA and/or surgery. After extraction of RNA and amplification, Taqman analysis of *KRT7* and *S100P* expression revealed that the Δ Ct was over the cut-off value in 89% (8 from 9) and 67% (6 from 9) of cases for *KRT7* (mean \pm SD: 14.6 ± 2.2 ; median 14.6; range 3.8–29.5) and *S100P* (mean \pm SD: 6.2 ± 2.3 ; median 6.1; range 3.3–10.8) respectively. Last, the combination of the two markers classified the nine patients as PDAC.

4. Discussion

In the present study, we validated the clinical interest of using low density array on EUS-guided FNA biopsies from solid pancreatic masses for the diagnosis of PDAC. EUS-guided FNAB is a minimally invasive technique in diagnosing and staging PDAC especially at an advanced stage. Furthermore, EUS-guided FNA biopsies can be obtained for cytopathology and molecular analysis [2]. While DNA analysis (mainly *KRAS* mutation detection) has been validated in these samples, RNA expression remains scarcely investigated to

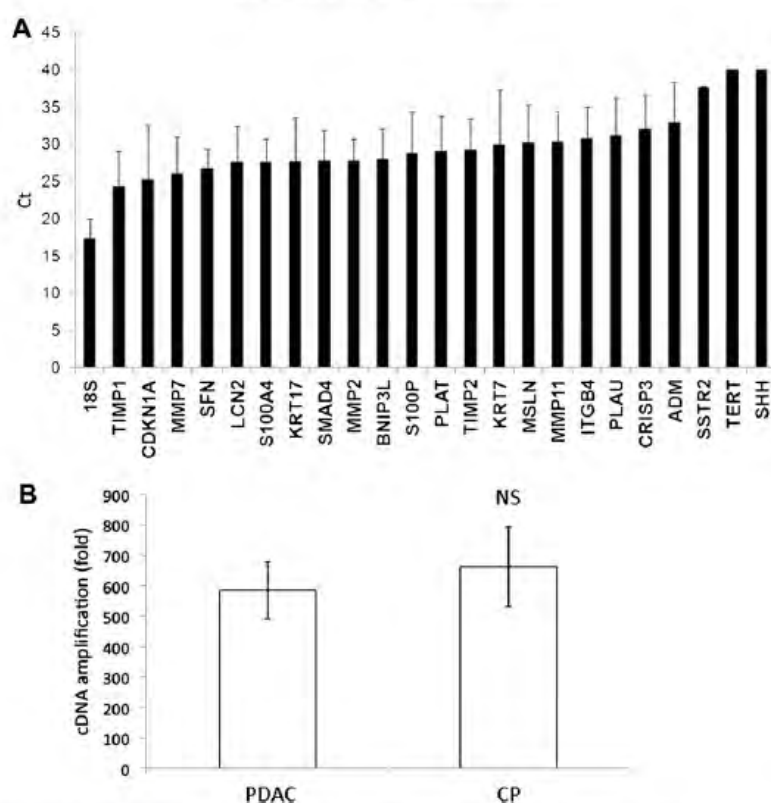


Fig. 3. Reliability of RNA amplification of human pancreatic samples **A:** Total RNA was collected from pancreatic adenocarcinoma (PDAC) tissues ($n = 4$) before amplification. Gene expression was measured in duplicate by quantitative PCR for the indicated genes as described in material and methods. Gene expression is expressed as Ct and indicated as mean \pm Standard Error. **B:** Total RNA was collected from chronic pancreatitis (CP) ($n = 17$) or PDAC EUS-guided fine needle aspiration biopsies ($n = 44$) before amplification and quantification as detailed in material and methods. cDNA amplification is expressed as the mean \pm Standard Error of the ratio of the total nucleic acid content after amplification and before amplification. Unpaired *t*-test: (PDAC vs CP), NS: not significant.

date. In the present work, we demonstrate that RNA amplification allows for real-time gene expression quantification in very low levels of starting material. As a consequence, we identified a panel of eight genes that are specifically expressed in primary locally advanced PDAC tissues when compared to pseudotumoural CP tissues.

Quantitative real-time PCR is currently the most accurate method for detecting differential gene expression. This approach strongly relies on the identification of uniformly expressed 'housekeeping gene'. However, organs, tissues and pathologies examined profoundly influenced the reliability of these endogenous controls. It is therefore important to identify the best reference genes to use in each biological system before using qRT-PCR such as LDA to investigate differential gene expression [27]. In this work, we determine that *18S* is the most stably expressed gene in normal pancreas and PDAC. Interestingly, we found that common reference genes previously used in transcriptomic studies such as *GAPDH* and *ACTIN* are up-regulated in cancer and, as a consequence, could be not suitable for normalization in differential gene expression studies.

Because of the paucity of the material collected following EUS-guided FNAB, we next assessed the efficacy and the reliability of RNA amplification. RNA samples collected from pancreatic tumours were subjected to amplification with the Full Spectrum™ method.

Since this approach does not rely on poly-A priming like the T7 protocol, it should amplify all regions of the transcripts (both non coding and messenger RNAs) relatively equally. The amplified cDNAs obtained were directly taken for PCR analysis using LDA. We found that RNA amplification efficacy is similar in PDAC and CP samples collected by EUS-guided FNA. These results demonstrate that RNA amplification is robust and reliable in this notoriously difficult RNA (pancreas is an organ rich in RNase) and maintains the relative levels of each transcript.

Next, we selected 23 genes that had been found to be differentially expressed in retrospective studies based on DNA chips from primary PDAC, normal pancreas or CP tissues [6–13]. The present study was carried out prospectively and included patients from different centers. We demonstrate herein that *S100P*, *KRT7*, *PLAU*, *MSLN*, *MMP-11*, *MMP-7*, *KRT17* and *PLAT* are also over-expressed in locally advanced and/or metastatic tumors as compared to pseudotumoural forms of CP (i.e. solid mass associated with parenchymal and duct lesions of CP). Linear discriminative analysis has been performed in order to attempt to classify individuals with minimal risk of error. By this analysis one can minimize inter individual differences among each group (homogeneous groups, minimal intra class variances) and maximize difference between the two groups (distinct groups, maximal inter class variances). Five genes appeared highly discriminative for PDAC after this analysis.

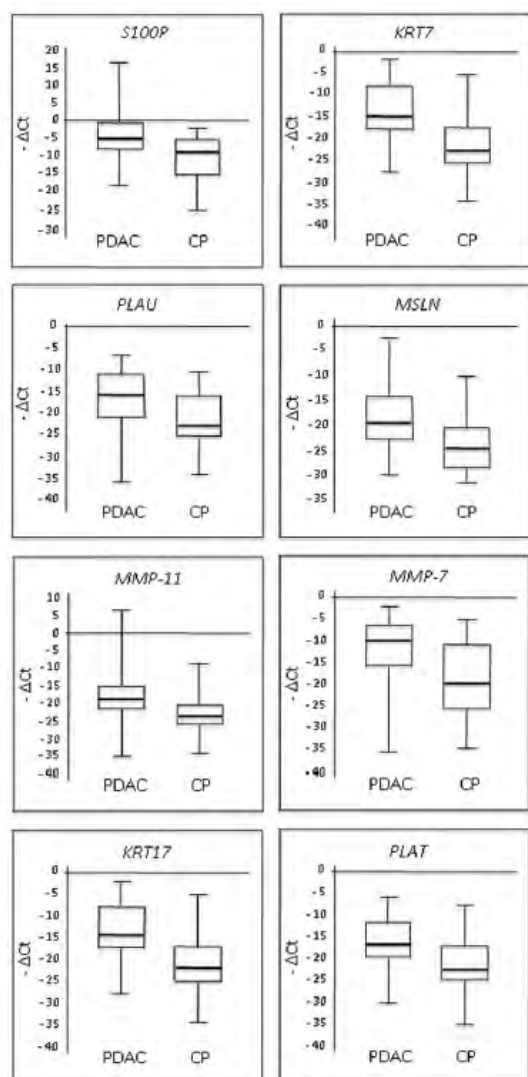


Fig. 4. Plots of the 8 genes significantly over expressed in pancreatic adenocarcinoma samples. Total RNA was collected from chronic pancreatitis (CP) (n=17) or PDAC EUS-guided fine needle aspiration biopsies (n=44) before amplification and quantification as detailed in material and methods. Gene expression was measured in duplicate by quantitative PCR for the indicated genes as described in material and methods. 18S was used as reference gene to calculate ΔCt (Ct candidate gene – Ct 18S). Results are expressed mean \pm Standard Error, medians are indicated in horizontal bold line within the plots.

Next, the area under ROC curves (>0.68) summarises the clinical validity of the potential diagnostic markers identified in this study. However, this must be validated prospectively to confront qPCR analysis of FNA samples with non-contributive or inconclusive cytopathological analysis of solid pancreatic masses. Surprisingly, *MMP2* or *S100A4* expression do not discriminate PDAC from CP, probably because these genes are not over expressed in advanced PDAC. Of note, none of the candidate genes are significantly up-

Table 2

List of discriminative genes significantly over expressed in advanced pancreatic carcinoma (PDAC) samples when compared to pseudotumoral chronic pancreatitis samples (CP).

Gene Name	PDAC ΔCt Mean (median)	CP ΔCt Mean (median)	$-2\Delta\Delta Ct$	fold	p value
<i>S100P</i>	4.5 (5.3)	11.45 (9.5)	7	128	0.0007
<i>KRT7</i>	13.74 (14.7)	20.08 (22.3)	7	128	0.0031
<i>PLAU</i>	16.5 (16.05)	21.8 (23)	5	32	0.0059
<i>MSLN</i>	18.16 (19.55)	23.37 (24.4)	5	32	0.0068
<i>MMP-11</i>	18.05 (18.95)	22.85 (23.6)	4	16	0.0070
<i>MMP-7</i>	11.2 (9.85)	17.85 (19.3)	7	128	0.0105
<i>KRT17</i>	14.08 (14.85)	20.36 (22.4)	6	64	0.0139
<i>PLAT</i>	17.31 (16.85)	22.16 (22.4)	4	16	0.0215

regulated in CP as compared to PDAC. This is not surprising since cDNA chip studies mostly focused on PDAC rather than CP. Based on previous studies, *CRISP-3* is expressed at moderate to high levels in CP tissues, at moderate levels in pancreatic cancer tissues but at low levels in normal pancreatic tissues [13]. Its role in CP pathogenesis is still unknown and, based our study, *CRISP-3* appears to be a poor molecular marker for CP.

Cytokeratin-7 and *cytokeratin-17* genes are known to be predominantly expressed in pancreatobiliary malignancies. We confirm herein that these two genes are significantly over expressed in PDAC. While cytokeratin 7 is routinely used for the diagnosis of PDAC using immunohistochemistry, cytokeratin-17 expression and diagnosis value is still to be documented for this disease. Thus, our results strongly suggest that cytokeratin 17 analyses may prove helpful in the armamentarium of PDAC diagnostic tools. More importantly, many of the over expressed candidate diagnostic genes we identified encode for proteins that participate to invasion and metastatic processes (*S100P*, *UPA*, *PLAT*, *MMP-7*, *MMP-11*) of PDAC [19,20,28,29]. The expression of *MSLN*, *UPA*, and *MMP-7* is also correlated to bad prognosis of PDAC [30–33]. Based on our results (present study and Laurell and al. Ref. [12]) expression of *MMP11*, *MMP7*, *KRT7*, *PLAT* and *PLAU* is up-regulated in advanced and/or metastatic PDAC as compared to resected tumours. On the other hand, whether the level of expression of one or multiple molecular markers that we have isolated in the present study is correlated to the size and the spread of the tumour remains to be demonstrated. While resected PDAC are generally smaller in size and less invasive than unresected tumours, increase in invasion and metastatic-prone gene expression may explain the shorter median survival time (7 months) of the later patients.

Although very provocative, our study suffers from a major caveat. Indeed, we quantified gene expression in the cellular material retained in the biopsy needle after sampling a core biopsy from which we specifically obtained a confirmation of the diagnosis after histopathological analysis. Because of the paucity of the material collected, we validated for the first time the use of RNA amplification for the analysis of gene expression using TaqMan[®] LDA microplates dedicated to pancreatic samples. While the full spectrum amplification kit may allow for amplification regardless of RNA degradation, we selected in this study high quality RNA samples. Under these stringent conditions, only 40 % of samples were eventually processed for TaqMan LDA analysis. We are aware that the small percentage of sample analyzed may limit the transfer of our approach to routine clinical practice. We believe that a higher amount of starting RNA material can be obtained by sampling part or the entire core biopsy. Previous works has demonstrated that qPCR can be performed on FNA samples exclusively reserved for molecular analysis. However, the quantity of extracted RNA that was comprised between 300 ng to 2.5 micrograms, is not

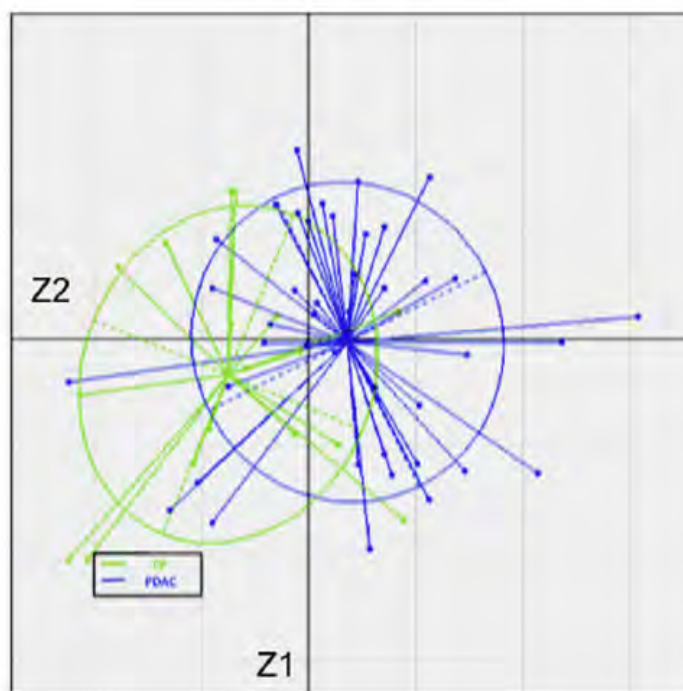


Fig. 5. Plots of the discriminative analysis between de pancreatic cancer group and chronic pancreatitis group Cluster plots of the 5 genes isolated after linear discriminative analysis (*S100P*, *PLAT*, *MMP-7*, *MSLN* and *KRT17*) showing difference of expression in pancreatic adenocarcinoma samples (PDAC: blue points and lines) when compared to chronic pancreatitis samples (CP: green points and lines). The projection of the results of the expression of these 5 genes in the 61 individuals (44 PDAC, 17 CP) are distributed according 2 discriminative axis (Z1 and Z2) and the centre of gravity of the PDAC subgroup is clearly distinct from that of CP group (Wilks's Lambda test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

compatible with our current protocol [7, 34]. From a clinical point of view, one or more additional needle passes are necessary to obtain such amount of RNA. Use of RNA amplification appears to be the unique alternative to preserve cytopathological analysis. Last, we included in our study nine patients for whom pancreatic-derived FNA cytopathological analysis was inconclusive. However, *KRT7* and *S100P* levels were high in all patients tested, and strongly suggested PDAC in the absence of standard diagnosis. Interestingly, PDAC diagnosis was confirmed in all patients a second EUS-guided FNA and/or during surgery. Thus, molecular markers such as *KRT7* and *S100P* expression can be used for PDAC diagnosis even in the

absence of cytology. This is of prime importance for the early diagnosis of PDAC.

In conclusion, we demonstrate that molecular studies on EUS-guided FNA material are promising investigational techniques for the identification and quantification of markers in PDAC patients diagnosed with non resectable tumours. Using this approach, we isolated a molecular signature of advanced pancreatic carcinoma including mostly cancer invasion-related genes. In the future, these potential molecular markers may provide diagnostic and prognostic information that is beyond routine conventional cytology of solid pancreatic masses.

Table 3

Value of Area under Receiver Operating Characteristic (ROC) curves, sensitivity and specificity from the 8 discriminative genes over expressed in pancreatic carcinoma samples

Gene Name	Area under ROC curve	SE	95% confidence interval	p value	Cut-off Δ Ct	sensitivity	specificity
<i>S100P</i>	0.76	0.07	0.63–0.88	0.001	6.94	71%	71%
<i>KRT7</i>	0.74	0.07	0.58–0.91	0.003	17.32	71%	75%
<i>PLAU</i>	0.74	0.08	0.60–0.89	0.003	21.2	75%	65%
<i>MSLN</i>	0.73	0.08	0.59–0.88	0.004	22.10	73%	71%
<i>MMP-11</i>	0.72	0.08	0.57–0.87	0.007	22.15	82%	71%
<i>MMP-7</i>	0.71	0.08	0.56–0.87	0.005	11.62	68%	71%
<i>KRT17</i>	0.69	0.08	0.54–0.85	0.018	20.75	77%	59%
<i>PLAT</i>	0.69	0.08	0.55–0.85	0.019	19.44	64%	76%
<i>S100P</i> + <i>KRT7</i> ^a	0.81	0.06	0.70–0.93	0.001	–	80%	77%

SE: Standard Error.

^a No improvement of area under ROC curve, sensitivity and specificity values with any other combination of markers.

Acknowledgments

The authors thank J-J Maoret (molecular biology platform from IFR-150 Genotoul, Toulouse, France) and M. Bouisson (INSERM U531, Toulouse, France) for technical development and helpful advices.

Financial support

SNFGE (Société Nationale Française de Gastroentérologie), IRMAD (Institut des Maladies de l'Appareil digestif), INSERM, Toulouse University Hospital (Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse), Cancéropôle Grand Sud-Ouest.

Disclosure of potential conflict of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

References

- [1] Warshaw AL, Fernandez-del-Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Eng J Med* 1992;326:455–65.
- [2] Bournet B, Souque A, Senesse P, Assenat E, Barthet M, Lesavre N, et al. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2009;41:552–7.
- [3] Wiersma MJ. Accuracy of endoscopic ultrasound in diagnosing and staging pancreatic carcinoma. *Pancreatology* 2001;1:625–32.
- [4] Buscail L, Faure P, Bournet B, Selves J, Escourrou J. Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic diseases. *Pancreatology* 2006;6:7–16.
- [5] Bhutani MS, Logroño R. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for diagnosis above and below the diaphragm. *J Clin Ultrasound* 2005;33:401–11.
- [6] Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, et al. Let-7 microRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 2009;20:831–44.
- [7] Crnogorac-Jurčević T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, et al. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 2001;20:7437–46.
- [8] Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, et al. Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2002;160:1239–49.
- [9] Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003;63:2649–57.
- [10] Sato N, Maitra A, Fukushima N, van Heek NT, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, et al. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003;63:4158–66.
- [11] Crnogorac-Jurčević T, Missiaglia E, Blaveri E, Gangeswaran R, Jones M, Terris B, et al. Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. *J Pathol* 2003;201:63–74.
- [12] Laurell H, Bouisson M, Berthelemy P, Rochaix P, Dejean S, Besse P, et al. Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol* 2006;12:3344–51.
- [13] Friess H, Ding J, Kleeff J, Liao Q, Berberat PO, Hammer J, et al. Identification of disease-specific genes in chronic pancreatitis using DNA array technology. *Ann Surg* 2001;234:769–78.
- [14] Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, et al. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 2003;162:1151–62.
- [15] Ramachandran V, Arumugam T, Hwang RF, Greenson JK, Simeone DM, Logsdon CD. Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor. *ADMR. Cancer Res* 2007;67:2666–75.
- [16] Niederegthmann M, Alves F, Neff JK, Heidrich B, Aramin N, Li L, et al. Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model. *Br J Cancer* 2007;97:1432–40.
- [17] Sarbia M, Fritze F, Geddert H, von Weyhern C, Rosenberg R, Gellert K. Differentiation between pancreaticobiliary and upper gastrointestinal adenocarcinomas: is analysis of cytokeratin 17 expression helpful? *Am J Clin Pathol* 2007;128:255–9.
- [18] Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J, Lemoine NR, Neoptolemos JP. Expression of collagenase (MMP2), stromelysin (MMP3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases (TIMP1) in pancreatic and ampullary disease. *Br J Cancer* 1996;73:972–8.
- [19] Bharadwaj U, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via activation of signal transducer and activator of transcription protein 3. *Mol Cancer Res* 2008;6:1755–65.
- [20] Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, Wang YH, Costello E, Neoptolemos JP, et al. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer* 2004;112:100–12.
- [21] Whiteman HJ, Weeks ME, Downen SE, Barry S, Timms JF, Lemoine NR, et al. The role of S100P in the invasion of pancreatic cancer cells is mediated through cytoskeletal changes and regulation of cathepsin D. *Cancer Res* 2007;67:8633–42.
- [22] Guweidhi A, Kleeff J, Giese N, El Fitori J, Ketterer K, Giese T, et al. Enhanced expression of 14-3-3sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis. *Carcinogenesis* 2004;25:1575–85.
- [23] Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 1997;388:87–93.
- [24] Buscail L, Saint-Laurent N, Chastre E, Vaillant JC, Gespach C, Capella G, et al. Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:1823–7.
- [25] Suehara N, Mizumoto K, Muta T, Tominaga Y, Shimura H, Kitajima S, et al. Telomerase elevation in pancreatic ductal carcinoma compared to non-malignant pathological states. *Clin Cancer Res* 1997;3:993–8.
- [26] Hayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851–6.
- [27] Goulter AB, Harmer DW, Clark KL. Evaluation of low density array technology for quantitative parallel measurement of multiple genes in human tissue. *BMC Genomics* 2006;7:34.
- [28] Steg A, Wang W, Blanquicett C, Grunda JM, Eltoun IA, Wang K, et al. Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array: application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *J Mol Diagn* 2006;8:76–83.
- [29] Paciucci R, Tora M, Diaz VM, Real FX. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene* 1998;16:625–33.
- [30] Diaz VM, Planaguma J, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R. Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 2002;122:806–19.
- [31] Nielsen A, Scarlett CJ, Samra JS, Gill A, Li Y, Allen BJ, et al. Significant over-expression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:256–63.
- [32] Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D, et al. Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:4935–43.
- [33] Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin Cancer Res* 2004;10:2832–45.
- [34] Chen Y, Zheng B, Robbins DH, Lewin DN, Mikhitarian K, Graham A, et al. Accurate discrimination of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis using multimarker expression data and samples obtained by minimally invasive fine needle aspiration. *Int J Cancer* 2007;120:1511–7.

DISCUSSION

Le cancer du pancréas est un cancer de mauvais pronostic. 85% des patients sont diagnostiqués à un stade tumoral localement avancé ou métastatique (18). Dès lors, les patients ne peuvent espérer au mieux une prise en charge par chimiothérapie et au pire une prise en charge palliative avec la mise en place de soins de support. C'est ce groupe de patients qui va bénéficier d'une ponction sous échoendoscopie pour l'obtention de la preuve anatomo-pathologique du cancer du pancréas. Malheureusement, cette technique ne permet pas d'obtenir un échantillon exploitable dans 100% des cas dès le premier prélèvement (sensibilité 75 -95%, valeur prédictive négative de 50 à 60%)(32) et nécessite parfois une deuxième voire une troisième biopsie pour avoir enfin la preuve anatomo-pathologique. Cette nécessité de réaliser un nouveau prélèvement entraîne un retard conséquent dans la prise en charge du patient mais aussi un risque accru de morbidité consécutive à l'anesthésie générale et à la technique de prélèvement elle-même.

L'autre problème rencontré est celui du diagnostic avec faux négatif qui amène le clinicien à surveiller un patient qu'il considère comme porteur d'une PCC pseudo tumorale alors que celui-ci est porteur d'un authentique adénocarcinome pancréatique (39).

Pour pallier aux difficultés de diagnostic du cancer du pancréas et du diagnostic différentiel avec la PCC pseudo tumorale, nous avons voulu déterminer un profil d'expression génique afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité (mais aussi les valeurs prédictives) du diagnostic cyto-histologique de cancer. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux différentes publications issues de notre groupe de recherche et de la littérature concernant l'étude des marqueurs moléculaires dans le cancer du pancréas opéré et la PCC (table 1 de l'article référencé). Ainsi, nous avons sélectionné 23 gènes dont l'expression est modulée (surexpression dans le cas de PLAU, PLAT, KRT 7 ou KRT17 ; invalidation concernant SST2 et DPC4) dans le cancer du pancréas et qui font ainsi office de marqueurs ou d'acteurs potentiels pour ce cancer. Certains de ces gènes jouent un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire cancéreuse (SFN) ou dans l'invasion des cellules tumorales (S100P, S100A4) (103, 104). En marge de ce travail, nous avons étudié l'expression du gène *CRISP3* qui serait surexprimé dans la PCC en comparaison au cancer du pancréas. Cependant, nous avons été dans l'incapacité de déterminer l'intérêt de ce gène pour le diagnostic différentiel entre le cancer du pancréas et la PCC (123, 124).

Le choix des gènes nous a donc conduit à la constitution d'une microplaque 384 puits dédiée à notre étude afin de pouvoir tester 8 échantillons simultanément. Nous avons limité le nombre de gène à 23 car nous avons préféré qu'ils soient quantifiés en double pour améliorer la fiabilité de l'analyse. Le principal problème, a résidé en l'obtention d'ARN en quantité ou en qualité suffisante. Durant cette étude de faisabilité, nous avons choisis des critères stricts en termes de qualité d'ARN qui ont été défini par un ratio ARN 28S/18S supérieur à 1,8. *In fine*, près de 50% des échantillons n'étaient pas exploitables selon nos critères. Ainsi nous n'avons pas pu appliquer cette technique à tous les patients inclus dans l'étude car, tout comme pour l'analyse histologique nous sommes confrontés au même problème vis-à-vis de la qualité inégale des ressources biologiques dans le domaine de la pancréatologie clinique (110).

Une fois les critères de qualité établis et afin d'avoir une quantité suffisante d'ARN, nous avons été amenés à amplifier ce matériel. En effet la quantité moyenne d'ARN obtenu pour une ponction était de 15 ng alors que l'analyse par Taqman Array requiert au minimum 1µg d'ARN. Ainsi l'ARN a été amplifié et reverse transcrit dans le même temps pour pallier à ce déficit quantitatif

Dans ce travail, nous avons tout d'abord déterminé le gène de ménage dont l'expression est la plus stable entre les échantillons analysés afin de servir de calibrateur interne. Pour cela, nous avons étudié l'expression dans des échantillons de tumeurs pancréatiques opérées et de pancréas sains de plusieurs gènes dont celui de la GAPDH, d'HRPT1, de l'actine et du 18S par le biais d'une microplaque Taqman Array dédié aux « housekeeping genes ». Ainsi nous avons démontré que le gène codant pour la GAPDH est sur exprimée dans les lésions cancéreuses par rapport au tissu sain, au contraire de l'actine qui est surexprimé dans le tissus sain. Par conséquent, il n'était pas envisageable de réaliser une normalisation des données (détermination des deltas CT) à partir de ces gènes. A l'inverse, le 18S est apparu comme ayant l'expression la plus stable entre le tissu sain et le tissu tumoral et par conséquent, a été retenu comme calibrateur dans nos expériences.

Les résultats de notre étude, qui est un des premiers travaux de transcriptomique réalisé à partir de matériel de cytoponction sous échoendoscopie, ont permis de mettre en évidence la surexpression de 8 gènes dans le cancer du pancréas localement avancé ou métastatique

en comparaison avec la PCC d'allure pseudo tumorale. Ces gènes (S100P, KRT7 et 17, PLAU, PLAT, MSLN, MMP7 et MMP11) jouent un rôle important dans l'invasion tumorale et sont des marqueurs de la dégradation de la matrice extra cellulaire et de la formation de métastases. De façon intéressante, nos travaux font apparaître que le profil d'expression de ces marqueurs est conservé dans les tumeurs opérées et celles localement avancées ou déjà métastatique. Ces résultats suggèrent que la cellule cancéreuse acquiert très précocement la capacité de métastaser.

La réalisation d'une sous analyse nous a permis de démontrer que qu'en combinant l'analyse de l'expression de S100P et de KRT7 dans ces échantillons, la sensibilité et la spécificité de notre approche pour le diagnostic différentiel du cancer du pancréas et de la PCC atteint 80% et 77%, respectivement. Ainsi, nous avons recherché lors d'un travail complémentaire ces deux marqueurs moléculaires par immuno histochimie sur les lames obtenues à partir du matériel de cytoponction sous échoendoscopie. Nous avons obtenu la confirmation d'un marquage positif pour KRT 7 chez les patients atteint de cancer pour lesquels le matériel de microbiospie est obtenu en quantité suffisante. Cette approche devrait permettre à terme de « typer » la tumeur que l'on étudie et de déterminer sa nature épithéliale. Plusieurs publications ont démontré l'intérêt de S100P comme marqueur de l'adénocarcinome pancréatique. En effet, S100P est un marqueur diagnostique positif de tumeurs pancréatiques cancéreuses réséquées mais est aussi indicateur de mauvais pronostic (106). Par contre, nos résultats démontrent que le marquage de S100P est moins fréquent et surtout moins intense dans les lésions localement avancées et/ou métastatiques de cancer du pancréas. L'évolution des connaissances sur la carcinogenèse, y compris pancréatique, a permis de mettre en évidence l'existence et l'importance des miARNs en oncologie. Ainsi dans un travail complémentaire nous nous sommes intéressés à l'expression du miARN let-7, qui est un inhibiteur post-transcriptionnel de l'oncogène KRAS..

Dans cette étude réalisée au sein de l'équipe par Torrisani et al (115), nous avons mesuré l'expression de let-7 dans le matériel obtenu par cytoponction préalablement décrit. Compte tenu des limitations technologiques inhérentes à ce protocole, il nous était impossible de mesurer la forme courte du miARN let-7 ; en conséquence, nous avons quantifié le précurseur de ce miARN et démontré que l'expression de let-7 est extrêmement faible dans le cancer du pancréas en comparaison au tissu pancréatique normal adjacent ou

à la PCC. Ainsi, notre étude est également une des premières à démontrer la faisabilité de l'étude des miARNs à partir de matériel obtenu par ponction à l'aiguille fine sous échocardiographie d'une masse pancréatique. Ainsi, ce travail laisse suggérer des possibilités diagnostiques mais aussi thérapeutiques si on considère que la restauration de l'expression de let-7 dans les cellules cancéreuses pancréatiques pourrait contrecarrer la carcinogenèse pancréatique dépendante de *KRAS*. Malheureusement, si on observe *in vitro* un effet sur la croissance cellulaire après transfection de let 7 dans des cellules Capan1, *in vivo* ce miARN est incapable d'impacter la croissance tumorale dans un modèle expérimental de souris athymique xenogreffée (annexe1). En conclusion, les perspectives cliniques de notre travail sont multiples et constituent un exemple type de recherche translationnelle. Par conséquent, nous avons donc ciblé les gènes S100P et de KRT 7 afin d'améliorer les performances diagnostiques de la ponction sous échocardiographie d'un syndrome de masse pancréatique. Nous réalisons actuellement une étude prospective d'expression de ces deux gènes à partir d'ARN extrait de matériel obtenu par ponction sous échocardiographie d'une masse pancréatique. L'évolution des méthodologies combinée à la limitation du nombre de gène amplifié nous permet de nous affranchir de l'étape d'amplification génique. Cependant, il demeure que la qualité des ARNs reste insuffisante dans la plupart des cas ce qui exclu de fait près de la moitié des échantillons prélevés. Récemment, nous avons mis au point l'extraction combinée d'ADN, d'ARN et de miARNs à partir de matériel de cytoponction dans le cadre de la collection biologique BACAP. De façon très intéressante, 20ng d'ARN sont suffisants pour mener à bien une étude par (RT)PCR quantitative de l'expression de 96 miARNs candidats. Compte tenu de leur abondance et de leur stabilité, les miARNs se présentent comme une alternative viable pour le diagnostic, le pronostic et la réponse au traitement de patients atteints de cancer du pancréas.

II. OBJECTIF DE L'ARTICLE n° 2

- Evaluer et développer à travers ce travail la faisabilité des techniques de biologie moléculaire à partir d'échantillons cliniques obtenus par ponction à l'aiguille fine sous échoendoscopie.
- Evaluer la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* comme « biomarqueur » de diagnostic différentiel entre la pancréatite chronique pseudo tumorale et le cancer du pancréas.

Titre de l'article

Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with *KRAS* mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis

Authors

B. Bournet¹, A. Souque¹, P. Senesse², E. Assenat², M. Barthe³, N. Lesavre³, A. Aubert⁴, D. O'Toole⁴, P. Hammel⁴, P. Levy⁴, P. Ruzniewski⁴, M. Bouisson¹, J. Escourrou¹, P. Cordelier¹, L. Buscail¹

Institutions

¹ Department of Gastroenterology and INSERM U858, University of Toulouse, CHU Rangueil, Toulouse, France

² Val d'Aurelle Center, Montpellier, France

³ Department of Gastroenterology and Centre d'Investigation Clinique, CHU Nord, Marseille, France

⁴ Department of Gastroenterology, Beaujon Hospital, Clichy, France

[Endoscopy](#). 2009Jun;41(6):552-7

La carcinogénèse pancréatique est complexe et hétérogène. En effet les cellules cancéreuses pancréatiques interagissent avec le stroma de type ovarien mais aussi avec les cellules souches cancéreuses. Jones et al (50) ont colligé près de 63 altérations géniques dans ce cancer. Ces altérations sont regroupées dans 12 voies de signalisations telles que la voie ras. Parmi les cancers épithéliaux, l'adénocarcinome pancréatique est celui qui présente le plus fréquemment une mutation de l'oncogène *KRAS*, participant au gain de prolifération et d'invasion pour ce cancer de mauvais pronostic et difficile à traiter. Les gènes de la famille ras (H pour Harvey, N pour neuroblastome, et K pour Kirsten) codent une protéine de 21 kilodaltons impliquée dans la transduction de signaux prolifératifs. L'oncogène *KRAS* est muté sur le codon 12 préférentiellement mais aussi au niveau des codons 13, 19, 59 et 61 (54). La mutation ponctuelle du codon 12 modifie le site de fixation du GTP sur la protéine p21-ras. Cette modification du site de fixation a pour conséquence une activation permanente de la protéine et par conséquent de la voie de signalisation ras pour la prolifération cellulaire.

La recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* à visée diagnostique ou pronostique a été réalisée sur de nombreux milieux tel que le plasma, le suc pancréatique, des pièces opératoires et dernièrement à partir de matériel obtenu par ponction à l'aiguille fine d'une masse pancréatique. Par ailleurs la détermination de cette mutation s'est faite avec de nombreuses techniques telles que la RFLP et/ou le séquençage.

L'objectif de nombreux travaux de recherche en pancréatologie est de permettre de détecter le plus précocement possible le cancer du pancréas. Cependant, un des problèmes les plus fréquents auxquels les cliniciens sont confrontés en pratique clinique courante est de différencier une lésion bénigne telle que la PCC pseudo tumorale d'une lésion maligne. Ainsi notre travail réalisé à partir d'une série prospective multicentrique de patients porteur d'un syndrome de masse pancréatique avait pour objectif de déterminer l'intérêt de la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* pour l'aide au diagnostic différentiel entre un cancer du pancréas et une PCC pseudo tumorale et d'ainsi assurer une prise en charge efficace des patients atteints de cancer

Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with *KRAS* mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis

Authors

B. Bournet¹, A. Souque¹, P. Senesse², E. Assenat², M. Barthet³, N. Lesavre³, A. Aubert⁴, D. O'Toole⁴, P. Hammel⁴, P. Levy⁴, P. Ruzsniwski⁴, M. Bouisson¹, J. Escourrou¹, P. Cordelier¹, L. Buscail¹

Institutions

¹ Department of Gastroenterology and INSERM U858, University of Toulouse, CHU Rangueil, Toulouse, France
² Val d'Aurelle Center, Montpellier, France
³ Department of Gastroenterology and Centre d'Investigation Clinique, CHU Nord, Marseille, France
⁴ Department of Gastroenterology, Beaujon Hospital, Clichy, France

submitted

18 September 2008

accepted after revision

25 February 2009

Bibliography

DOI 10.1055/s-0029-1214717
 Endoscopy 2009; 41:
 552–557 © Georg Thieme
 Verlag KG Stuttgart · New York
 ISSN 0013-726X

Corresponding author

L. Buscail, MD PhD

Department of
 Gastroenterology
 CHU Rangueil
 1 avenue Jean Poulhès,
 TSA 50032
 31059 Toulouse Cedex 9
 France
 Fax: +33-5-61323599
 Buscail.L@chu-toulouse.fr

Background and study aims: Differential diagnosis between pancreatic adenocarcinoma (PADC) and pseudotumoral forms of chronic pancreatitis remains difficult. Mutation of *KRAS* oncogene is present in 75% to 95% of PADC. This study aimed to evaluate whether the combined analysis of *KRAS* mutation with cytopathological findings from endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNAB) might improve discrimination between PADC and chronic pancreatitis.

Patients and methods: This prospective multicenter study included 178 patients with solid pancreatic masses (men 104, women 74; mean age 64.5 years). Cytopathological examination and *KRAS* mutation analysis (codon-12 and codon-13, restriction fragment length polymorphism [RFLP] and direct sequencing) were performed on EUS-FNAB material. Final diagnoses were obtained on EUS-FNAB analysis and/or a second biopsy and/or clinical follow-up and/or

surgery: PADC, n = 129; chronic pancreatitis, n = 27; other pancreatic neoplasms, n = 16; and benign lesions, n = 6.

Results: *KRAS* status analysis was successful in all EUS-FNAB samples. Codon-12 *KRAS* point mutation was found in 66% of PADC samples. No case of chronic pancreatitis displayed *KRAS* mutation. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and overall accuracy of cytopathology alone for diagnosis of PADC versus chronic pancreatitis were 83%, 100%, 100%, 56% and 86%, respectively. When *KRAS* mutation analysis was combined with cytopathology, these values reached 88%, 100%, 100%, 63% and 90% respectively.

Conclusion: Although the value of *KRAS* analysis in addition to EUS-FNAB is limited for distinguishing pancreatic mass lesions, when chronic pancreatitis presented as a pseudotumor a negative finding (wild-type *KRAS*), was useful in strongly suggesting a benign lesion.

Introduction

Pancreatic cancer remains one of the most deadly tumor types. The 5-year survival rate after diagnosis is less than 3.5% [1,2]. Difficulties persist pertaining to early diagnosis of pancreatic adenocarcinoma (PADC) and in distinguishing PADC from benign diseases such as chronic pancreatitis; the latter frequently presenting as a pseudotumor. The differential diagnosis is of critical importance, to avoid unnecessary resection of benign lesions (such as focal lesions of chronic pancreatitis or autoimmune pancreatitis) or indeed delaying treatment of PADC in a subset of patients.

The molecular mechanisms underlying pancreatic oncogenesis remain only partially understood. Several genetic alterations are well characterized in PADC such as codon-12 *KRAS* mutation (75% to 95%) and to a lesser extent *p16*, *DPC4* and *p53*

gene mutations [3,4]. Previous studies conducted by us and others on pure pancreatic juice obtained at endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) have found that *KRAS* mutation was found in 60% to 65% of PADC [5–7]. Also, the addition of *p16* and *DPC4* mutation analysis of pure pancreatic juice did not improve the sensitivity and specificity of *KRAS* mutation analysis alone for the diagnosis of PADC or in distinguishing PADC from chronic pancreatitis [8]. Currently, despite improvement in abdominal imaging techniques (including endoscopic ultrasound (EUS)), the discrimination of PADC from focal pancreatitis remains problematic [9,10]. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration-biopsy (EUS-FNAB) is a safe and effective technique in diagnosis and staging of PADC [11–13]. However, its accuracy for the diagnosis of malignancy varies widely with a sensitivity ranging from 65% to 95%; its mean accuracy is 85%

with negative predictive values ranging from 50% to 70%. In addition, EUS-FNAB may be inconclusive in up to 20% of cases [11–14].

Recent studies have revealed that the *KRAS* mutation can be detected in cellular materials obtained in EUS-FNAB samples [15–18]. *KRAS* mutation analysis when combined with cyto-/histological findings obtained via EUS-FNAB appeared to be highly accurate in distinguishing benign and malignant solid pancreatic lesions [15,16,18]. These single-center studies concluded that *KRAS* mutation analysis may be essential to reinforce the diagnosis of pancreatic masses assessed using EUS. Herein, we conducted a prospective multicenter study to assess whether combining EUS-FNAB with *KRAS* mutation analysis might effectively distinguish between PADC and a pseudotumoral form of chronic pancreatitis.

Patients and methods



Patients

A total of 178 patients (men 104, women 74; mean age 64.5 ± 11.6 years) with solid pancreatic masses underwent EUS-FNAB procedures between January 2005 and April 2007 at four French referral centers (Clichy, Marseille, Montpellier, and Toulouse). All patients were referred for EUS-FNAB based on clinical data and results of previous imaging techniques (abdominal ultrasound, EUS, computed tomography [CT] scan or magnetic resonance cholangiopancreatography [MRCP]) that suggested or raised suspicion of a pancreatic mass. Patients with pancreatic cystic lesions, those who had undergone previous chemotherapy or pancreatic surgery, and those with contraindications for EUS were excluded.

Informed consent for *KRAS* analysis was obtained from all patients. The protocol has been approved by the regional ethical committee (CCPPRB Midi-Pyrénées II 6 January 2005 – protocol N°03 042 02 including external audit of the data).

EUS-FNAB and sample for *KRAS* analysis

EUS was carried out with the patient under intravenous propofol anesthesia, as previously described in [12, 19], using curved linear array echo endoscopes, FG-36 UA Pentax (Argenteuil, France) or UCT140T Olympus (Rungis, France), connected to Hitachi or Aloka ultrasound devices, respectively. EUS-FNAB was done using the EUS N1–22 gauge needle (Wilson-Cook, Limerick, Ireland) [19,20]. At each center, at least two needle passes were done until sufficient tissue material was collected.

Core biopsy samples of pancreatic tissues were transferred into either Dubosq-Brazil or Cytolyte medium [20] with the needle stylet, for further cytological and histological diagnosis. Once the core biopsies had been transferred, the stylet was removed and the cellular material remaining in the needle catheter was air-flushed with a sterile 20-ml syringe and put into a sterile 1-ml Eppendorf tube and immediately frozen at –20 °C until DNA extraction.

KRAS mutation analysis

The EUS-FNAB samples were centrifuged for 30 minutes at 7000 r.p.m. DNA was extracted from the pellets using the QIAamp DNA micro kit (Qiagen, Les Ulis, France) and eluted in 20- μ l volumes. To identify *KRAS* codon-12 mutations, we performed a two-step nested polymerase chain reaction (PCR) amplification, followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) a-

nalyses, as previously described [6,8,21] with minor modifications.

DNA sequencing using the BigDye Terminator v3.1 kit in an automatic ABI 3100 sequencer (Applied Biosystems, California, USA) allowed verification and identification of mutations of the first or second nucleotide of codon-12 and a possible mutation of codon-13 in case of a wild-type codon-12 [8]. DNA extracted from human pancreatic cancer cells Capan-1 and BxPC-3, respectively, was used as positive (mutated *KRAS*) and negative (wild-type *KRAS*) control. *KRAS* mutation assays were performed by A.S. and M.B., who were blinded to all clinical data.

Follow up after EUS-FNAB analysis

After an initial EUS-FNAB procedure coupled with a *KRAS* mutation analysis, patients were clinically followed up with additional imaging examinations (including a second EUS-FNAB if required), especially in the case of a lack of a definite diagnosis and/or benign lesions. Data recorded comprised the results of subsequent imaging and cytopathology (as well as *KRAS* mutation analysis) if performed, treatments, date and cause of death (patients with PADC were followed monthly), new clinical events, and last contact.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD. Analysis was based on two-way contingency tables, sensitivity, specificity, predictive values, and accuracy, and on 95% confidence intervals of relative frequencies, using of GraphPad InStat software.

Results



EUS-FNA was done successfully in the 178 patients included in this prospective study, without any complications. Codon-12 and codon-13 mutations of the *KRAS* gene were analyzed in 100% of patient samples with no failure of amplification and sequencing. Four groups of patients were considered: those with PADC, with pseudotumoral chronic pancreatitis, with other pancreatic neoplasia, and with benign lesions without chronic pancreatitis.

The main clinical characteristics and follow-up, and results of the first FNAB together with *KRAS* mutation analysis, are detailed in **Tables 1 and 2**. The appearance of adenocarcinoma and pseudotumoral pancreatitis at EUS examination is illustrated in **Fig. 1**. The management algorithm of EUS-FNAB and the steps leading to a confirmed diagnosis at each stage are detailed in **Fig. 2**.

Patients with pancreatic adenocarcinoma (n = 129). Cytological and/or histological analyses had established a definitive diagnosis of adenocarcinoma in 108 of the 129 cases after the first EUS-FNAB. The diagnosis was unequivocal, based on the presence of adenocarcinoma cells with positive staining for cytokeratin-7 (histological diagnosis using paraffin-embedded cores from microbiopsies can be finally achieved in 90% of cases). A mutated codon-12 *KRAS* gene was detected in 79 cases.

In the remaining 21 patients, the FNAB analysis was inconclusive due to poor cellularity, absence of epithelial cells, presence of only blood clot, or presence of only normal cells. A mutated codon-12 *KRAS* was detected in 7 out of these 21 inconclusive cases. The final diagnosis of PADC was subsequently established by a second EUS-FNAB (n = 10), an FNA on a metastatic site at CT scan (n = 8), or during surgery (n = 3). No mutation of the *KRAS* gene at

Table 1 Main clinical characteristics of patients in the four groups. The mean and median duration of follow-up for the entire population were 12.8 and 10 months, respectively (range: 3–27). In the adenocarcinoma group, two patients were lost to follow-up and 61% of patients died before the end of the inclusion period.

	Pancreatic adenocarcinoma (n = 129)	Pseudotumoral chronic pancreatitis (n = 27)	Other pancreatic neoplasia (n = 16)	Benign lesions (n = 6)
Gender, m/f	68/61	26/1	8/8	2/4
Mean age, years	66.1 ± 1.6	59.9 ± 9.7	59.3 ± 14	61 ± 16
Location, % head	74%	85%	69%	33%
Follow-up, months				
Mean ± SD	8.8 ± 6	20.2 ± 4.1	16.8 ± 5.9	15.2 ± 3.6
Range	3–17	16–27	6–24	11–26
Median	7	18	16	15

Final diagnosis*	Histo/cytopathological diagnosis at the first EUS-FNAB	Codon 12 KRAS mutations†	Total codon 12 KRAS mutations
Adenocarcinoma (n = 129)	Adenocarcinoma, n = 108 Inconclusive, n = 21‡	n = 79 n = 7	86/129 <i>GAT n = 38</i> <i>GTT n = 31</i> <i>CGT n = 17</i>
Pseudotumoral chronic pancreatitis (n = 27)	Chronic pancreatitis, n = 21§ Inconclusive, n = 6‡	n = 0 n = 0	0/27
Other pancreatic neoplasias (n = 16)	Metastasis, n = 6 Endocrine, n = 8 Inconclusive, n = 2	n = 1 n = 0 n = 0	1/16 <i>GAT</i>
Benign lesions (n = 6)	Inflammation and necrosis	n = 0	0/6

* At first and if necessary a second EUS-FNAB and/or follow-up or surgery.

† Wild type codon-13 KRAS was found in all the wild type KRAS codon-12 samples.

‡ Normal cells or blood clot only and/or samples without presence of epithelial cells.

§ Inflammatory changes with fibrosis highly evocative of chronic pancreatitis.

Table 2 Results of histopathology, cytopathology, and codon-12 KRAS mutation analysis of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNAB) samples in the different groups of patients (The sequences of mutated KRAS are given in italic).

codon-13 was detected in codon-12 KRAS-negative samples (data not shown).

Patients with pancreatic mass lesion associated with chronic pancreatitis (n = 27). The final diagnosis of pseudotumoral chronic pancreatitis was determined from the following data: clinical context (previous symptoms or complications of chronic pancreatitis in 18 cases); imaging (17 had calcified pancreatitis); histological diagnosis obtained from one or two EUS-FNAB analyses, and a clinical follow up of at least 12 months. Of the chronic pancreatitis cases, 21 were related to alcohol abuse (● Fig. 1c), 2 to autoimmune pancreatitis (● Fig. 1d), and 4 were idiopathic.

In 21 cases, cytology and/or histology revealed features/lesions highly suggestive of chronic pancreatitis (inflammatory changes together with fibrosis) at the first EUS-FNAB. In 6 cases, EUS-FNAB was inconclusive. Chronic pancreatitis was confirmed at a second EUS-FNAB in all 6 cases. No mutation of the KRAS gene at codon-12 or codon-13 was detected in samples from chronic pancreatitis patients, both on the first and second EUS-FNAB. Patients with chronic pancreatitis were clinically reviewed every 2 months for 6 months, then every 6 months if there were no new events. A systematic CT scan was done in all patients at 6 months after initial EUS and treatment (biliary stent and/or surgical bypass if necessary). Subsequent investigations were done in 15 patients. No development of pancreatic lesions has been detected. All the 27 chronic pancreatitis patients are currently alive and well.

Patients with other pancreatic neoplasia. Definite diagnoses (including immunohistochemical findings) of endocrine tumors and pancreatic metastasis, respectively, were obtained in 12 and 4 cases; the patients with metastases had a previous history of either primary colorectal cancer (n = 2) or renal cell cancer (n = 2). Two initial FNABs were inconclusive but diagnosis was confirmed following a second EUS-FNAB. Codon-12 KRAS mutation was detected in only one case of colorectal metastasis.

Patients with a benign pancreatic lesion. In 6 patients, histo-/cytopathological analysis revealed either necrotic, inflammatory, or normal pancreatic tissue (wild type KRAS in all cases). The clinical follow-up (every 2 months for 6 months, then every 6 months) and subsequent investigations at 4 months (CT scan, n = 4; CT scan and EUS, n = 2) showed regression or disappearance of the pseudotumoral appearance in the pancreas in all cases, and both pancreatic cancer and chronic pancreatitis could be ruled out. These patients were deemed to have had sequelae of inflammatory pancreatitis. All these patients had previously experienced episodes of acute pancreatitis, and they are currently alive and well.

Inconclusive first FNAB: summary. Overall, FNAB was inconclusive in 29 cases (● Fig. 2), and among these codon-12 KRAS mutations were found in 7 cases. A second FNAB was performed in all cases: wild type KRAS was observed in 22 cases and a codon-12 KRAS mutation in 7. The final diagnoses were PADC in 21 cases (including all the 7 cases of KRAS mutation), and chronic pancreatitis and endocrine tumor in 6 and 2 cases, respectively.

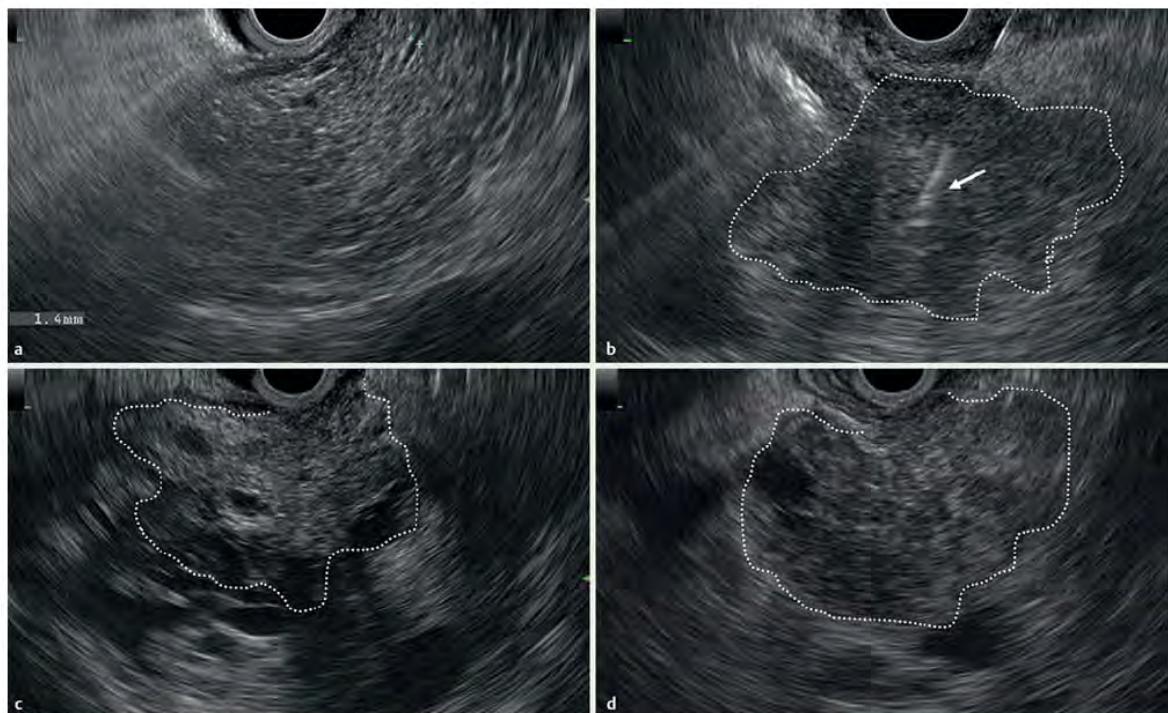
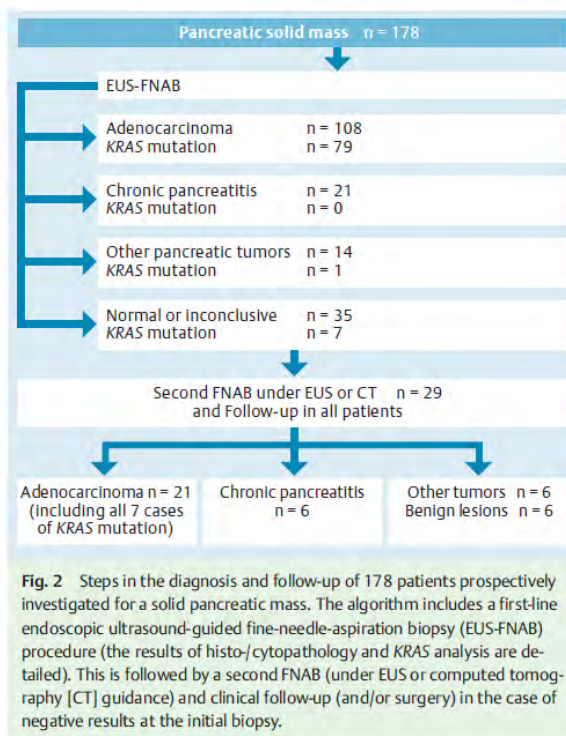


Fig. 1 Endoscopic ultrasound (EUS) views of the pancreas. The dotted white lines delineate abnormal hypoechoic patterns of a solid mass. **a** Normal appearance. **b** Pancreatic adenocarcinoma; the biopsy needle (arrow) can be seen within the hypoechoic malignant pancreatic mass. **c** Pseudotumoral chronic pancreatitis of alcoholic origin. **d** Pseudotumoral chronic pancreatitis of autoimmune origin.



(The second FNAB established the final diagnosis in 18/29 inconclusive cases; the remaining 11, all PADC, were established at CT or surgery as described above.)

Diagnostic accuracy. Sensitivity, specificity, predictive values, and overall accuracies of cyto-/histopathology alone, *KRAS* analysis alone, and the combination of two tests are given in **Table 3** (all pancreatic neoplasias versus all benign pancreatic lesions) and in **Table 4** (PADC versus chronic pancreatitis). The diagnostic performances were not significantly different between the four centers (data not shown).

We observed that combining *KRAS* mutation analysis and histo-/cytopathological findings increases the accuracy in diagnosing solid pancreatic tumors. However, the gain appears minimal. In patients with a strong clinical and radiological suggestion of pancreatic adenocarcinoma and an inconclusive biopsy, a repeat FNAB is recommended, even if *KRAS* mutation is highly suggestive of malignancy. However, in patients with clinical and morphological data suggesting a pseudotumoral form of chronic pancreatitis, where FNAB is frequently nondiscriminatory, malignancy can be ruled out in the presence of a wild-type *KRAS* gene.

Discussion

In the current prospective multicenter study, we demonstrated that combining histo-/cytopathology and *KRAS* mutation analysis in EUS-FNAB materials may be helpful in distinguishing PADC and pancreatic mass associated with chronic pancreatitis. We also demonstrated for the first time that, despite multiple centers and operators (two or three per center performing EUS-FNAB),

Table 3 Performance of histo- and cytopathology alone, *KRAS* mutation analysis alone, and both tests combined, on endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNAB) material, in the differential diagnosis of pancreatic neoplasia (adenocarcinoma, endocrine tumors, and metastasis) versus benign lesions (pseudotumoral chronic pancreatitis and other benign lesions). (95% confidence intervals are given in parentheses)

Pancreatic neoplasia vs. benign pancreatic lesions					
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Histo-/cytopathology alone	81 % (75–88)	100 % (86–100)	100 % (96–100)	48 % (41–70)	84 % (68–88)
<i>KRAS</i> analysis alone	58 % (54–81)	100 % (93–100)	100 % (95–100)	40 % (25–50)	67 % (56–78)
Combination of histo-/cytopathology and <i>KRAS</i> analysis	86 % (78–90)	100 % (85–100)	100 % (97–100)	59 % (36–67)	89 % (76–94)

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 4 Performance of histo- and cytopathology alone, *KRAS* mutation analysis, and both tests combined on (EUS-FNAB) material, in the differential diagnosis of pancreatic adenocarcinoma versus pseudotumoral chronic pancreatitis (95% confidence intervals are given in parentheses).

Adenocarcinoma vs. pseudotumoral chronic pancreatitis					
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Histo-/cytopathology alone	83 % (76–89)	100 % (87–100)	100 % (96–100)	56 % (41–70)	86 % (69–88)
<i>KRAS</i> analysis alone	67 % (57–74)	100 % (100–12)	100 % (95–100)	38 % (27–50)	72 % (62–77)
Combination of histo-/cytopathology and <i>KRAS</i> analysis	88 % (82–93)	100 % (87–100)	100 % (96–100)	63 % (49–79)	90 % (84–94)

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

that *KRAS* mutation analysis (both codon-12 and codon-13) is technically possible in 100% of cases (including sequencing). Despite the minute quantities of material collected for molecular analysis, *KRAS* mutation screening can be readily transferred into routine clinical practice. The use of a new extraction micro-kit may explain this success (the literature reports 6% to 13% failure rates for amplification both with tissue samples and with pure pancreatic juice) [5–8]. Collection of both core biopsies for histo-/cytology (using the stylet to empty the needle contents) and cellular material for *KRAS* analysis (by simply flushing the biopsy needle) can be done during the same procedure. The total cost for one *KRAS* assay, including sequencing, is estimated at €45 to €49.

Several authors have suggested that the combination of histo-/cytopathology and *KRAS* analysis on EUS-FNAB increases the positive diagnosis of malignant pancreatic mass [16,18]. In the present study, *KRAS* mutation analysis improved on the accuracy of cytopathology alone only from 86% to 90% when the subgroup of patients with adenocarcinoma was considered. Thus, adding *KRAS* mutation analysis to histo-/cytopathology does not seem to make a major contribution to the positive diagnosis of PADC. However, when the histo-/cytopathology is inconclusive or perhaps inadequate in the case of a pancreatic mass, the presence of a *KRAS* mutation is highly suggestive of adenocarcinoma. Several studies have been conducted in order to increase the diagnostic yield of EUS-FNAB. It has been demonstrated that on-site cytopathology interpretation has a significant clinical impact and is cost-effective [22,23]. This could be one of the limitations of our study, as none of the four centers had an on-site pathologist during EUS-FNAB. In addition, EUS elastography and contrast-enhanced EUS improve pancreatic tissue characterization [24,25]. However, the distinction between chronic pancreatitis and hard tumors still appears to be difficult using elastography, and EUS-FNAB remains necessary [26].

From our results, *KRAS* mutation analysis may be useful to distinguish PADC from chronic pancreatitis especially in its pseudotumoral form. The multicenter design of the study allowed us to recruit 27 patients with pseudotumoral chronic pancreatitis who were followed up after initial histo-/cytopathological analysis and *KRAS* mutation assay. None of these patients developed a PADC, despite the relatively advanced disease associated with the high mean age (59 years) and the frequency of calcifications (85%) found with disease of alcoholic origin. In fact, the incidence of PADC is known to increase with time during the course of chronic pancreatitis. Based on the combination of histo-/cytopathological findings (including a second biopsy in the case of negative results at first biopsy) and *KRAS* mutation analysis, conservative medical or surgical treatment (bypass, n=3) was possible in all 27 of these patients, thus avoiding unnecessary pancreatic resection. With a clinical and radiological presentation of chronic pancreatitis, the presence of wild type *KRAS* at EUS-FNAB is therefore highly suggestive of benign lesions. As previously observed in single-center studies, in chronic pancreatitis the rate of *KRAS* mutations is low or zero in material obtained by EUS-guided FNAB [15–18,27,28]. With chronic pancreatitis, the rate of *KRAS* mutation in tissue samples is lower than that observed in pancreatic juice; the pancreatic juice may be enriched by a cell population that is preferably shed from the epithelial cell lining including those mutated for *KRAS* [27–29]. The importance of *KRAS* mutation during the course of apparently benign chronic pancreatitis remains poorly understood. Controversial data have been published from single-center studies that included long-term follow-up of chronic pancreatitis with codon-12 *KRAS* mutation found in pancreatic juice. Only a low percentage of patients with *KRAS* mutation developed a PADC [30,31]. Indeed, *KRAS* mutation is a possible event during chronic pancreatitis especially in ductal hyperplasia and in the absence of adenocarcinoma [27–29]. However, with a clinical and radiological presentation

of chronic pancreatitis, the presence of mutated *KRAS* at EUS-FNAB may justify a second biopsy and a follow-up to rule out a PADC.

In conclusion, following a multicenter evaluation, the current study demonstrates that the combination of histo-/cytopathology and *KRAS* analysis on samples obtained at EUS-FNAB does not significantly increase the positive diagnosis of malignant pancreatic mass. Conversely, when confronted with a clinical and radiological presentation of pseudotumoral chronic pancreatitis both histo-/cytopathological analysis (inflammation, fibrosis) and wild-type *KRAS* are strongly suggestive of a benign condition.

Acknowledgment

Financial support was given by the SNFGE (Société Nationale Française de Gastroentérologie), IRMAD (Institut de Recherche des Maladies de l'Appareil digestif), INSERM and Toulouse Hospital (Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse).

Competing interests: None

References

- 1 Warshaw AL, Fernandez del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Eng J Med* 1992; 326: 455–465
- 2 Buscail L, Pagès P, Berthélémy P et al. Role of EUS in the management of pancreatic and ampullary carcinoma: a prospective study assessing resectability and prognosis. *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 34–40
- 3 Hahn SA, Schmiegel WH. Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion* 1998; 59: 493–501
- 4 Koorstra JBM, Hustinx SR, Offerhaus GJA et al. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol* 2008; 8: 110–125
- 5 Van Laethem JL, Vertongen P, Deviere J et al. Detection of c-Ki-ras gene codon 12 mutations from pancreatic duct brushings in the diagnosis of pancreatic tumours. *Gut* 1995; 36: 781–787
- 6 Berthélémy P, Bouisson M, Escourrou J et al. Identification of *KRAS* mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1995; 123: 188–191
- 7 Tascilar M, Caspers E, Sturm PD et al. Role of tumor markers and mutations in cells and pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 (Suppl 4): 107–410
- 8 Costentin L, Pagès P, Bouisson M et al. Frequent deletions of tumor suppressor genes in pure pancreatic juice from patients with tumoral or nontumoral pancreatic diseases. *Pancreatol* 2002; 2: 17–25
- 9 Varadarajulu S, Tamhane A, Eloubeidi MA. Yield of EUS-guided FNA of pancreatic masses in the presence or the absence of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 728–736
- 10 Fritscher-Ravens A, Brand L, Knöfel WT et al. Comparison of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for focal pancreatic lesions in patients with normal parenchyma and chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2768–2775
- 11 Wiersema MJ. Accuracy of endoscopic ultrasound in diagnosing and staging pancreatic carcinoma. *Pancreatol* 2001; 1: 625–632
- 12 Buscail L, Faure P, Bournet B et al. Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic diseases. *Pancreatol* 2006; 6: 7–16
- 13 Bhutani MS, Logroño R. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for diagnosis above and below the diaphragm. *J Clin Ultrasound* 2005; 33: 401–411
- 14 Savides TJ, Donohue M, Hunt G et al. EUS-guided FNA diagnostic yield of malignancy in solid pancreatic masses: a benchmark for quality performance measurement. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 277–282
- 15 Tada M, Komatsu Y, Kawabe T et al. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263–2270
- 16 Takahashi K, Yamao K, Okubo K et al. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 76–79
- 17 Khalid A, Nodit L, Zahid M et al. Ultrasound fine needle aspirate DNA analysis to differentiate malignant and benign pancreatic masses. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2493–2500
- 18 Maluf-Filho F, Kumar A, Gerhardt R et al. *Kras* mutation analysis of fine needle aspirate under EUS guidance facilitates risk stratification of patients with pancreatic mass. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 906–910
- 19 Bournet B, Miguères I, Delacroix M et al. Early morbidity of endoscopic ultrasound: 13 year's experience at a referral center. *Endoscopy* 2006; 38: 349–354
- 20 Voss M, Hammel P, Molas G et al. Value of endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of solid pancreatic masses. *Gut* 2000; 46: 244–249
- 21 Jiang W, Kahn SM, Guillem JG et al. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 1989; 4: 923–928
- 22 Pellisé Quiza M, Fernandez-Esparrach G, Solé M et al. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: predictive factors of accurate diagnosis and cost-minimization analysis of on-site pathologist. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 319–324
- 23 Klapman JB, Logrono R, Dye CE, Waxmann I. Clinical impact of on-site cytopathology interpretation on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1289–1294
- 24 Janssen J, Schlörer E, Greiner L. EUS elastography of the pancreas: feasibility and pattern description of the normal pancreas, chronic pancreatitis and focal pancreatic lesions. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 971–978
- 25 Kitano M, Sakamoto H, Matsui U et al. A novel perfusion imaging technique of the pancreas: contrast-enhanced harmonic EUS. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 141–150
- 26 Hirche TO, Ignee A, Barreiros AP et al. indications and limitations of endoscopic ultrasound elastography for evaluation of focal pancreatic lesions. *Endoscopy* 2008; 40: 910–917
- 27 Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P et al. Frequency of *KRAS* mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005; 7: 17–23
- 28 Orth M, Gansauge F, Gansauge S et al. *KRAS* mutations at codon 12 are rare events in chronic pancreatitis. *Digestion* 1998; 59: 120–124
- 29 Löhr M, Maisonneuve P, Lowenfels AB. K-RAS mutations and benign pancreatic disease. *Int J Pancreatol* 2000; 27: 93–103
- 30 Arvanitakis M, Van Laethem JL, Parma J et al. Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation. *Endoscopy* 2004; 36: 535–542
- 31 Furuya N, Kawa S, Akamatsu T et al. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology* 1997; 113: 593–598

DISCUSSION

La découverte d'un syndrome de masse au niveau du pancréas est lourde de conséquences pour le patient. En plus de l'inquiétude que génère le mauvais pronostic du cancer du pancréas, le patient devra bénéficier d'un ensemble d'examen à visée diagnostique dont la réalisation d'une biopsie de la lésion qui peut s'avérer bénigne (PCC) ou tumorale. En effet, la PCC est une pathologie non néoplasique qui peut parfois se confondre sur le plan clinique mais surtout en imagerie avec une pathologie maligne. Cette présentation pose le problème du diagnostic différentiel avec le cancer du pancréas et peut engendrer un retard de prise en charge des patients porteurs de tumeurs

L'évolution des techniques d'examen a vu apparaître ces dernières années l'échoendoscopie avec cytoponction. Il s'agit d'un examen ayant une faible morbi-mortalité et qui présente une sensibilité de 85% et une valeur prédictive négative de 50 à 60% pour le diagnostic positif d'un syndrome de masse pancréatique. Par ailleurs, cette approche évite l'essaimage des cellules tumorales en intra péritonéal comme cela a pu être démontré avec la biopsie sous échographie per cutanée (39).

Ainsi, nous avons colligé de manière consécutive sur deux ans des patients porteurs d'un syndrome de masse pancréatique à partir d'une étude multicentrique prospective. Notre objectif était de réaliser le diagnostic différentiel entre le cancer du pancréas et la PCC pseudo tumorale avec l'aide de la biologie moléculaire grâce à la détermination de la mutation de l'oncogène *KRAS*.

La fréquence de la mutation de l'oncogène *KRAS* dans le cancer du pancréas est variable selon les séries de la littérature (entre 65 et 95 %) (53). Cette variable est à mettre en rapport avec la technique utilisée mais aussi avec le matériel ou avec le milieu (suc, sang) utilisé pour la détection. Les pourcentages les plus élevés sont obtenus à partir des pièces opératoires. Actuellement, l'échantillon obtenu par ponction sous échoendoscopie permet d'obtenir un taux de mutation de l'oncogène *KRAS* de l'ordre de 67 à 76 % selon les séries (47). La recherche de cette mutation est réalisée par la technique de RFLP dont le résultat est confirmé par séquençage. Cette technique permet de détecter la mutation des codons 12 et 13. Sur le plan de la faisabilité, nous avons pu obtenir dans 100 % des cas la détection d'une forme sauvage ou d'une forme mutée de *KRAS*. Cette technique présente cependant des inconvénients car elle est longue et coûteuse (estimé à 49€). Dans notre travail, aucune

PCC pseudo tumorale ne présente de mutation de l'oncogène *KRAS*. Ce résultat semble similaire aux données de la littérature ; ainsi Takahashi et al (44) présentent des résultats de 77 patients inclus sur une période de 5 ans. Ils ont pu détecter la présence de la mutation *KRAS* dans 74 % des cas de cancer du pancréas et aucune mutation n'a été détectée chez les patients porteurs d'une PCC.

Ainsi l'association d'un syndrome de masse avec sur le plan anatomo pathologique l'absence d'éléments évoquant la présence de cellules cancéreuses associé à l'absence de mutation de l'oncogène *KRAS* permet de poser le diagnostic de bénignité. Par ailleurs, dans un autre travail non publié mais qui a fait l'objet d'un travail de thèse, nous avons suivi sur le plan clinique mais aussi par des examens d'imageries pendant une durée minimale de 5 ans des patients porteurs d'une PCC pseudo tumorale. Au cours de ce suivi, nous avons renouvelé l'échoendoscopie avec cytoponction et la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS*. Durant ce suivi, aucun patient n'a présenté sur le plan clinique ou anatomo pathologique d'éléments évoquant une dégénérescence carcinomateuse ni de mutation *de novo* de l'oncogène *KRAS*.

Les patients inclus dans l'étude ont bénéficié aussi de la recherche de la mutation V600 E de l'oncogène *BRAF*. Aucun de nos patients n'a été détecté muté pour l'oncogène *BRAF*.

En conclusion, il existe une amélioration de la sensibilité mais surtout de la valeur prédictive négative lorsque l'on associe les résultats cyto-histologique avec la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS*. Ainsi la sensibilité qui était évaluée initialement à 83% augmente à 88% ainsi que la valeur prédictive négative qui augmente de 56% à 63%.

En pratique clinique, nous nous sommes également intéressés à l'impact de la mutation de l'oncogène *KRAS* sur le pronostic et la survie des patients. Récemment Ogura et al (131) ont publié une série de 242 patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique chez qui le statut de la mutation de l'oncogène *KRAS* était connu. La survie globale des patients porteurs d'une mutation de l'oncogène *KRAS* était significativement plus courte en analyse uni et multi varié par rapport aux patients ayant un statut *KRAS* sauvage. L'étude de la survie globale en fonction des sous type de mutations du codon 12 a permis de déterminer que la mutation G12V aurait un pronostic similaire aux patients non mutés par rapport au deux autres types de mutations G12D et G12R (132). Au contraire, les travaux de Schultz et al (63)

n'ont pas retrouvé d'implication de la mutation de l'oncogène *KRAS* comme facteur de mauvais pronostic de l'adénocarcinome pancréatique. Nous avons obtenu des résultats similaires qui démontrent l'absence de corrélation entre la présence de la mutation de l'oncogène *KRAS* et la survie des patients quelque soit le stade de leurs tumeurs. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé de modification de la survie des patients traités ou non par Gemcitabine en fonction de leur statut *KRAS* (annexe 2) (133). En conclusion, au vu des données de la littérature et de notre propre expérience, il est encore difficile d'évaluer l'impact et l'influence véritable de la mutation de l'oncogène *KRAS* sur la survie des patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique ou sur leur réponse aux traitements contrairement aux patients porteurs d'un cancer du colon.

Ce travail a permis de modifier la pratique clinique quotidienne de prise en charge des patients porteurs d'un syndrome de masse. En effet, les cliniciens réalisent désormais de manière systématique la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* après obtention du consentement éclairé du patient. Compte tenu du nombre de prélèvement réalisé, nous avons du modifier notre technique de détection de la mutation de l'oncogène *KRAS*. Avec le développement du plan cancer 2009-2013 sont apparues des plateformes de biologie moléculaire dédiées notamment à la détermination de la mutation de l'oncogène *KRAS* sur les codons 12 et 13 par une technique de discrimination allélique par Taqman. Nous avons réalisé une étude comparative des résultats de la mutation *KRAS* entre la détermination par notre ancienne technique RFLP et séquençage et la discrimination allélique. Nous n'avons pas mis en évidence de différence en termes de résultats mais en revanche la technique de discrimination allélique apparait comme une technique plus rapide et moins couteuse que la précédente. Ainsi depuis 2010, nous déterminons la mutation de l'oncogène *KRAS* par discrimination allélique constituant donc un transfert de technologie.

En conclusion, l'association de l'analyse cyto-histologique et la détermination de la mutation de l'oncogène *KRAS* améliore la valeur prédictive négative de la biopsie sous échoendoscopie. Cet élément pourrait permettre une modification de prise en charge des patients porteurs d'un syndrome de masse pancréatique. En effet, on peut envisager de concevoir de traiter des patients présentant un syndrome de masse pancréatique porteurs d'une mutation de l'oncogène *KRAS* pour un cancer même si le résultat de l'analyse cyto-histologique reste non ou peu contributif. Cette attitude permettrait de traiter plus

rapidement les patients mais aussi de diminuer la morbidité liée à la réalisation d'un autre prélèvement. Actuellement, un travail est en cours concernant le suivi et l'évolution de cette catégorie de patients porteurs d'une mutation de l'oncogène *KRAS* et présentant une biopsie du syndrome de masse non contributive.

CONCLUSIONS

Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer dans le monde. Malgré ce rang, les moyens mis en place pour la prévention, le diagnostic précoce et le traitement restent encore insuffisants. Ainsi avec son incidence en augmentation, le cancer du pancréas pourrait devenir un problème de santé publique et même représenter la première cause de décès par cancer d'ici 20 ans. Près de 85% des patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique sont diagnostiqués à un stade localement avancé ou métastatique et par conséquent ne peuvent pas prétendre à une prise en charge à visée curative et présentent donc un taux de survie faible.

A travers ces deux publications et leurs annexes, nous avons démontré les différentes possibilités de recherche translationnelle que nous avons pu mener à bien à partir d'échantillons obtenus sous échoendoscopie. Tout d'abord ces travaux constituent une étude de faisabilité pour l'obtention d'échantillons sous échoendoscopie et pour les possibilités d'extraction d'ADN ou d'ARN en vue d'analyse de biologie moléculaire. Les échantillons sont obtenus chez les patients en absence de morbi- mortalité.

Par la suite, les résultats obtenus au décours de ces deux études sont actuellement utilisés en pratique clinique courante et quotidienne pour nous aider au diagnostic de cancer du pancréas et au diagnostic différentiel avec la pancréatite chronique pseudo tumorale. Mais les résultats obtenus ne nous permettent pas encore d'avoir une certitude de 100 % dans le diagnostic positif ou différentiel. Ainsi dans les perspectives futures on envisage d'associer à la recherche de la mutation de l'oncogène KRAS, les microARNs. Ils constituent des marqueurs qui peuvent être mis en évidence en intra tumoral mais aussi circulants facilitant l'accèsibilité.

Afin de pouvoir répondre aux multiples questions que soulèvent le cancer du pancréas pour sa prévention, son diagnostic ou son traitement, nous avons été sélectionnés lors d'un appel d'offre INCA 2012 pour la création d'une base clinico biologique sur le cancer du pancréas (BACAP). L'objectif de la création de cette base clinique et biologique est de recueillir des données cliniques de manière multi centrique et prospective chez des patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique associées à un prélèvement de la tumeur soit par échoendoscopie soit par voie radiologique ou par chirurgie. Ainsi à partir de tous ces échantillons collectés, les équipes scientifiques, dont la notre, adossées au projet pourront

mener à bien leurs différents travaux de recherche. Le nombre d'échantillons prévu sur les trois ans à venir est de 1500 ponctions sous échoendoscopie et de 500 pièces opératoires.

La constitution de ce type de base de donnée, combinée aux avancées technologiques majeures décrites lors de ce travail de thèse, sont deux pré-requis essentiel afin de découvrir de nouveaux marqueurs moléculaires diagnostiques, pronostiques et de suivi de réponse au traitement afin d'améliorer significativement la prise en charge des patients atteints de cancer du pancréas.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Le pancréas. Principes fondamentaux de gastro entérologie états pathologiques et démarches thérapeutiques 5èmes édition. Habal F, Gaisano H, Rossos P. thomson ABR, Shaffer EA, editors. Canada.
- 2- Ductal cells of the pancreas. Grapin-Botton A. the international journal of biochemistry and Cell Biology. 2005;27:504-10.
- 3- Pancreatic cancer. Hidalgo M. N Engl J Med. 2010 Apr 29;362(17):1605-1
- 4- Cancer statistics, 2012. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. CA Cancer J Clin. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
- 5- Molecular classification of neoplasms of the pancreas. Hruban RH, Adsay NV. Hum Pathol. 2009 May;40(5):612-23
- 6- The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. Skrypek N, Duchêne B, Hebbar M, Leteurtre E, van Seuningem I, Jonckheere N. Oncogene. 2012 May 14.
- 7- Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications. Singh M, Maitra A. Pancreatology. 2007;7(1):9-19.
- 8- Precursor lesions in pancreatic cancer: morphological and molecular pathology. Scarlett CJ, Salisbury EL, Biankin AV, Kench J. Pathology. 2011 Apr;43(3):183-200.
- 9- Clinical fate of branch duct and mixed forms of intraductal papillary mucinous neoplasia of the pancreas. Bournet B, Kirzin S, Carrère N, Portier G, Otal P, Selves J, Musso C, Suc B, Moreau J, Fournanier G, Pradère B, Lazorthes F, Escourrou J, Buscail L. J Gastroenterol Hepatol. 2009 Jul;24(7):1211-7.
- 10- Long-term clinical and imaging follow-up of non operated branch duct form of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Arlix A, Bournet B, Otal P, Canevet G, Thevenot A, Kirzin S, Carrere N, Suc B, Moreau J, Escourrou J, Buscail L. Pancreas. 2012 Mar;41(2):295-301.
- 11- International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas. Tanaka M, Fernández-del Castillo C, Adsay V, Chari S, Falconi M, Jang JY, Kimura W, Levy P, Pitman MB, Schmidt CM, Shimizu M, Wolfgang CL, Yamaguchi K, Yamao K; International Association of Pancreatology. Pancreatology. 2012 May-Jun;12(3):183-97.

- 12- Mucin gene expression in intraductal papillary-mucinous pancreatic tumours and related lesions. Terris B, Dubois S, Buisine MP, Sauvanet A, Ruzsniwski P, Aubert JP, Porchet N, Couvelard A, Degott C, Fléjou JF. *J Pathol.* 2002 Aug;197(5):632-7.
- 13- Prognosis of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm depends on histological and precursor epithelial subtypes. Mino-Kenudson M, Fernández-del Castillo C, Baba Y, Valsangkar NP, Liss AS, Hsu M, Correa-Gallego C, Ingkakul T, Perez Johnston R, Turner BG, Androutsopoulos V, Deshpande V, McGrath D, Sahani DV, Brugge WR, Ogino S, Pitman MB, Warshaw AL, Thayer SP. *Gut.* 2011 Dec;60(12):1712-20.
- 14- Pancreatic mucinous cystic neoplasm defined by ovarian stroma: demographics, clinical features, and prevalence of cancer. Reddy RP, Smyrk TC, Zapiach M, Levy MJ, Pearson RK, Clain JE, Farnell MB, Sarr MG, Chari ST. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 Nov;2(11):1026-31.
- 15- Diagnosis and treatment of cystic pancreatic tumors. Al-Haddad M, Schmidt MC, Sandrasegaran K, Dewitt J. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011 Aug;9(8):635-48.
- 16- Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical implications. Magee CJ, Greenhalf W, Howes N, Ghaneh P, Neoptolemos JP. *Surg Oncol.* 2001 Jul-Aug;10(1-2):1-23.
- 17- Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer. Klein AP. *Nat Rev Cancer.* 2013 Jan;13(1):66-74.
- 18- *Traité de pancréatologie Clinique.* Levy P, Ruzsniwski P, Sauvanet A. Médecine- Sciences Flammarion.
- 19- Pancreatic cancer. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. *Lancet.* 2011 Aug 13;378(9791):607-20.
- 20- Usefulness of predictive tests for cancer treatment. Rosell R, Cuello M, Cecere F, Santarpia M, Reguart N, Felip E, Taron M. *Bull Cancer.* 2006 Aug;93(8):E101-8.
- 21- Chronic pancreatitis. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. *Lancet.* 2011 Apr 2;377(9772):1184-97.

- 22- Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. *Gastroenterology*. 2007 Apr;132(4):1557-73.
- 23- Histopathologic correlates of non calcific chronic pancreatitis by EUS: a prospective tissue characterization study. Varadarajulu S, Eltoun I, Tamhane A, Eloubeidi MA. *Gastrointest Endosc*. 2007 Sep;66(3):501-9.
- 24- Endoscopic ultrasound in chronic pancreatitis: where are we now? Seicean A. *World J Gastroenterol*. 2010 Sep 14;16(34):4253-63
- 25- Endoscopic ultrasound and fine needle aspiration in chronic pancreatitis: differential diagnosis between pseudotumoral masses and pancreatic cancer. Ardengh JC, Lopes CV, Campos AD, Pereira de Lima LF, Venco F, Módena JL. *JOP*. 2007 Jul 9;8(4):413-21.
- 26- Diagnosis of pancreatic tumors by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. Ardengh JC, Lopes CV, de Lima LF, de Oliveira JR, Venco F, Santo GC, Modena JL. *World J Gastroenterol*. 2007 Jun 14;13(22):3112-6.
- 27- Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic diseases. Buscail L, Faure P, Bournet B, Selves J, Escourrou J. *Pancreatology*. 2006;6(1-2):7-16.
- 28- Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration: sampling, pitfalls, and quality management. Kulesza P, Eltoun IA. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;5(11):1248-54.
- 29- EUS-guided Trucut biopsy of suspected nonfocal chronic pancreatitis. DeWitt J, McGreevy K, LeBlanc J, McHenry L, Cummings O, Sherman S. *Gastrointest Endosc*. 2005 Jul;62(1):76-84.
- 30- Ponctions sous échoendoscopie digestive: importance de l'équipe endoscopiste/cytopathologiste. Fabre M, Palazzo L. *Acta Endoscopica* Vol 36 N°3- 2006.
- 31- Feasibility and yield of a new EUS histology needle: results from a multicenter, pooled, cohort study. Iglesias-Garcia J, Poley JW, Larghi A, Giovannini M, Petrone MC, Abdulkader I, Monges G, Costamagna G, Arcidiacono P, Biermann K, Rindi G, Bories E, Doglioni C, Bruno M, Dominguez-Muñoz JE. *Gastrointest Endosc*. 2011 Jun;73(6):1189-96.
- 32- Impact of endoscopic ultrasound-guided fine needle biopsy for diagnosis of pancreatic masses. Iglesias-Garcia J, Dominguez-Munoz E, Lozano-Leon A, Abdulkader I, Larino-Noia J, Antunez J, Forteza J. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 14;13(2):289-93.

- 33- The prospective randomized, controlled trial of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration using 22G and 19G aspiration needles for solid pancreatic or peripancreatic masses. Song TJ, Kim JH, Lee SS, Eum JB, Moon SH, Park do H, Seo DW, Lee SK, Jang SJ, Yun SC, Kim MH. *Am J Gastroenterol*. 2010 Aug;105(8):1739-45.
- 34- Endoscopic ultrasound fine needle aspirate DNA analysis to differentiate malignant and benign pancreatic masses. Khalid A, Nodit L, Zahid M, Bauer K, Brody D, Finkelstein SD, McGrath KM. *Am J Gastroenterol*. 2006 Nov;101(11):2493-500.
- 35- Early morbidity of endoscopic ultrasound: 13 years' experience at a referral center. Bournet B, Miguères I, Delacroix M, Vigouroux D, Bornet JL, Escourrou J, Buscail L. *Endoscopy*. 2006 Apr;38(4):349-54.
- 36- Frequency of major complications after EUS-guided FNA of solid pancreatic masses: a prospective evaluation. Eloubeidi MA, Tamhane A, Varadarajulu S, Wilcox CM. *Gastrointest Endosc*. 2006 Apr;63(4):622-9.
- 37- Factors Predictive of Adverse Events Associated with Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration of Pancreatic Solid Lesions. Katanuma A, Maguchi H, Yane K, Hashigo S, Kin T, Kaneko M, Kato S, Kato R, Harada R, Osanai M, Takahashi K, Nojima M. *Dig Dis Sci*. 2013 Feb 20.
- 38- A randomized comparison of EUS-guided FNA versus CT or US-guided FNA for the evaluation of pancreatic mass lesions. Horwhat JD, Paulson EK, McGrath K, Branch MS, Baillie J, Tyler D, Pappas T, Enns R, Robuck G, Stiffler H, Jowell P. *Gastrointest Endosc*. 2006 Jun;63(7):966-75.
- 39- Yield of EUS-guided FNA of pancreatic masses in the presence or the absence of chronic pancreatitis. Varadarajulu S, Tamhane A, Eloubeidi MA. *Gastrointest Endosc*. 2005 Nov;62(5):728-36;
- 40- Diagnostic performance of EUS for chronic pancreatitis: a comparison with histopathology. Chong AK, Hawes RH, Hoffman BJ, Adams DB, Lewin DN, Romagnuolo J. *Gastrointest Endosc*. 2007 May;65(6):808-14.

- 41- Endoscopic ultrasonography (EUS) and fine-needle aspiration (FNA) cytology for diagnosis of chronic pancreatitis. Hollerbach S, Klamann A, Topalidis T, Schmiegel WH. *Endoscopy*. 2001 Oct;33(10):824-31.
- 42- False-positive EUS-guided FNA cytology for solid pancreatic lesions. Siddiqui AA, Kowalski TE, Shahid H, O'Donnell S, Tolin J, Loren DE, Infantolino A, Hong SK, Eloubeidi MA. *Gastrointest Endosc*. 2011 Sep;74(3):535-40.
- 43- Pancreaticoduodenectomy for suspected but unproven malignancy. Thompson JS, Murayama KM, Edney JA, Rikkers LF. *Am J Surg*. 1994 Dec;168(6):571-3; discussion 573-5.
- 44- Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S. *Gastrointest Endosc*. 2005 Jan;61(1):76-9.
- 45- Molecular Biologic Approach to the Diagnosis of Pancreatic Carcinoma Using Specimens Obtained by EUS-Guided Fine Needle Aspiration. Kato K, Kamada H, Fujimori T, Aritomo Y, Ono M, Masaki T. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:243524.
- 46- DNA analysis of cells obtained from endoscopic ultrasound-fine needle aspiration in pancreatic adenocarcinoma: Fool's Gold, Pandora's Box, or Holy Grail? Mishra G. *Am J Gastroenterol*. 2006 Nov;101(11):2501-3.
- 47- Genetic and epigenetic markers in the evaluation of pancreatic masses. Ginestà MM, Mora J, Mayor R, Farré A, Peinado MA, Busquets J, Serrano T, Capellá G, Fabregat J. *J Clin Pathol*. 2012 Nov 7.
- 48- Molecular signatures of pancreatic cancer. Hong SM, Park JY, Hruban RH, Goggins M. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jun;135(6):716-27.
- 49- Molecular classification of neoplasms of the pancreas. Hruban RH, Adsay NV. *Hum Pathol*. 2009 May;40(5):612-23

- 50- Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1801-6.
- 51- Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. Macgregor-Das AM, Iacobuzio-Donahue CA. *J Surg Oncol*. 2013 Jan;107(1):8-14.
- 52- Markers of pancreatic cancer: working toward early detection. Goggins M. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 15;17(4):635-7
- 53- New molecular targets in pancreatic cancer. Torrisani J, Bournet B, Cordelier P, Buscail L. *Bull Cancer*. 2008 May;95(5):503-12.
- 54- Targeting the RAS signalling pathway in cancer. Mansi L, Viel E, Curtit E, Medioni J, Le Tourneau C. *Bull Cancer*. 2011 Oct;98(9):1019-28.
- 55- PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R. *PLoS One*. 2011;6(7)
- 56- Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, Deng CX, Hruban RH, Adsay NV, Tuveson DA, Hingorani SR. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):229-43.
- 57- Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial Neoplasia. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, Goggins M. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):730-733.
- 58- Different subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasm in the pancreas have distinct pathways to pancreatic cancer progression. Mohri D, Asaoka Y, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Seto M, Ohta M, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Isayama H, Kanai F, Fukushima N, Tada M, Kawabe T, Omata M, Koike K. *J Gastroenterol*. 2012 Feb;47(2):203-13.

- 59- Molecular characteristics and biological behaviours of the oncocytic and pancreatobiliary subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasms. Xiao HD, Yamaguchi H, Dias-Santagata D, Kuboki Y, Akhavanfard S, Hatori T, Yamamoto M, Shiratori K, Kobayashi M, Shimizu M, Fernandez-Del Castillo C, Mino-Kenudson M, Furukawa T. *J Pathol.* 2011 Aug;224(4):508-16.
- 60- Sequential accumulation of K-ras mutations and p53 overexpression in the progression of pancreatic mucinous cystic neoplasms to malignancy. Jimenez RE, Warshaw AL, Z'graggen K, Hartwig W, Taylor DZ, Compton CC, Fernández-del Castillo C. *Surg.* 1999 Oct;230(4):501-9; discussion 509-11.
- 61- Markers of pancreatic cancer: working toward early detection. Goggins M. *Clin Cancer Res.* 2011 Feb 15;17(4):635-7
- 62- BRAF and K-ras gene mutations in human pancreatic cancers. Ishimura N, Yamasawa K, Karim Rumi MA, Kadowaki Y, Ishihara S, Amano Y, Nio Y, Higami T, Kinoshita Y. *Cancer Lett.* 2003 Sep 25;199(2):169-73.
- 63- Frequencies and prognostic role of KRAS and BRAF mutations in patients with localized pancreatic and ampullary adenocarcinomas. Schultz NA, Roslind A, Christensen IJ, Horn T, Høgdall E, Pedersen LN, Kruhøffer M, Burcharth F, Wøjdemann M, Johansen JS. *Pancreas.* 2012 Jul;41(5):759-66.
- 64- A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Collisson EA, Trejo CL, Silva JM, Gu S, Korkola JE, Heiser LM, Charles RP, Rabinovich BA, Hann B, Dankort D, Spellman PT, Phillips WA, Gray JW, McMahon M. *Cancer Discov.* 2012 Aug;2(8):685-93.
- 65- Mutational analyses of multiple oncogenic pathways in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Schönleben F, Allendorf JD, Qiu W, Li X, Ho DJ, Ciau NT, Fine RL, Chabot JA, Remotti HE, Su GH. *Pancreas.* 2008 Mar;36(2):168-72.
- 66- Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, Yoshida S, Hatori T, Yamamoto M, Shibata N, Shimizu K, Kamatani N, Shiratori K. *Sci Rep.* 2011;1:161.
- 67- Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. Wu J, Matthaei H, Maitra A, Dal Molin M, Wood LD, Eshleman JR, Goggins M, Canto MI, Schulick RD, Edil BH, Wolfgang CL, Klein AP, Diaz LA Jr, Allen PJ, Schmidt CM, Kinzler KW, Papadopoulos N, Hruban RH, Vogelstein B. *Sci Transl Med.* 2011 Jul 20

- 68- Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J, Cordelier P. *Curr Genomics*. 2011 Mar;12(1):15-24.
- 69- Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. Lee J, Jang KT, Ki CS, Lim T, Park YS, Lim HY, Choi DW, Kang WK, Park K, Park JO. *Cancer*. 2007 Apr 15;109(8):1561-9.
- 70- EGFR and KRAS mutational analysis and their correlation to survival in pancreatic and periampullary cancer. Oliveira-Cunha M, Hadfield KD, Siriwardena AK, Newman W. *Pancreas*. 2012 Apr;41(3):428-34.
- 71- Determination of qualitative telomerase activity as an adjunct to the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by EUS-guided fine-needle aspiration. Mishra G, Zhao Y, Sweeney J, Pineau BC, Case D, Ho C, Blackstock AW, Geisinger K, Howerton R, Levine E, Shen P, Ibdah J. *Gastrointest Endosc*. 2006 Apr;63(4):648-54.
- 72- Real-time quantitative PCR of telomerase mRNA is useful for the differentiation of benign and malignant pancreatic disorders. Büchler P, Conejo-Garcia JR, Lehmann G, Müller M, Emrich T, Reber HA, Büchler MW, Friess H. *Pancreas*. 2001 May;22(4):331-40.
- 73- Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. *Cancer Res*. 1997 Jan 15;57(2):326-31.
- 74- Frequent deletions of tumor suppressor genes in pure pancreatic juice from patients with tumoral or nontumoral pancreatic diseases. Costentin L, Pagès P, Bouisson M, Berthelémy P, Buscail L, Escourrou J, Pradayrol L, Vaysse N. *Pancreatology*. 2002;2(1):17-25.
- 75- Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, Eckstein RP, Hugh TB, Henshall SM, Sutherland RL. *Gut*. 2002 Jun;50(6):861-8.
- 76- Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA. *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3112-26.

- 77- Activated K-Ras and INK4a/Arf deficiency promote aggressiveness of pancreatic cancer by induction of EMT consistent with cancer stem cell phenotype. Wang Z, Ali S, Banerjee S, Bao B, Li Y, Azmi AS, Korc M, Sarkar FH. *J Cell Physiol.* 2013 Mar;228(3):556-62.
- 78- Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo CY, Chen D, Arking DE, Lowy AM, Hruban RH, Remotti HE, Su GH. *Oncotarget.* 2011 Nov;2(11):862-73.
- 79- DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. Biankin AV, Morey AL, Lee CS, Kench JG, Biankin SA, Hook HC, Head DR, Hugh TB, Sutherland RL, Henshall SM. *J Clin Oncol.* 2002 Dec 1;20(23):4531-42.
- 80- DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, Luo M, Abe H, Henderson CM, Vilardell F, Wang Z, Keller JW, Banerjee P, Herman JM, Cameron JL, Yeo CJ, Halushka MK, Eshleman JR, Raben M, Klein AP, Hruban RH, Hidalgo M, Laheru D. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 10;27(11):1806-13.
- 81- Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. *Am J Surg Pathol.* 2000 Nov;24(11):1544-8.
- 82- SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, Parmigiani G, Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Eshleman JR, Goggins M, Jaffee EM, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Cameron JL, Olino K, Schulick R, Winter J, Herman JM, Laheru D, Klein AP, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Hruban RH. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4674-9.
- 83- Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA. *Genes Dev.* 2006 Nov 15;20(22):3130-46.
- 84- Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minarik M. *World J Gastroenterol.* 2007 Jul 21;13(27):3714-20.

- 85- Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. Salek C, Minarikova P, Benesova L, Nosek V, Strnad R, Zavoral M, Minarik M. *Anticancer Res.* 2009 May;29(5):1803-10.
- 86- Immunohistochemical analysis of p53 and MIB-1 in tissue specimens obtained from endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration biopsy for the diagnosis of solid pancreatic masses. Itoi T, Takei K, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Kurihara T, Nakamura K, Moriyasu F, Tsuchida A, Kasuya K. *Oncol Rep.* 2005 Feb;13(2):229-34.
- 87- Chromosomal instability in mouse metastatic pancreatic cancer--it's Kras and Tp53 after all. Siveke JT, Schmid RM. *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):405-7.
- 88- Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):469-83.
- 89- Somatostatin and somatostatin receptor physiology. Barnett P. *Endocrine.* 2003 Apr;20(3):255-64.
- 90- sst2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. Delesque N, Buscail L, Estève JP, Saint-Laurent N, Müller C, Weckbecker G, Bruns C, Vaysse N, Susini C. *Cancer Res.* 1997 Mar 1;57(5):956-62.
- 91- Gene therapy for pancreatic carcinoma: local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer. Rochaix P, Delesque N, Estève JP, Saint-Laurent N, Voight JJ, Vaysse N, Susini C, Buscail L. *Hum Gene Ther.* 1999 Apr 10;10(6):995-1008.
- 92- Identification of an upstream promoter of the human somatostatin receptor, hSSTR2, which is controlled by epigenetic modifications. Torrisani J, Hanoun N, Laurell H, Lopez F, Maoret JJ, Souque A, Susini C, Cordelier P, Buscail L. *Endocrinology.* 2008 Jun;149(6):3137-47.
- 93- Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238. Benali N, Cordelier P, Calise D, Pages P, Rochaix P, Nagy A, Esteve JP, Pour PM, Schally AV, Vaysse N, Susini C, Buscail L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9180-5.

- 94- The hedgehog pathway and pancreatic cancer. Hidalgo M, Maitra A. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2094-6
- 95- Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. Kelleher FC. *Carcinogenesis*. 2011 Apr;32(4):445-51.
- 96- Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):846-51.
- 97- Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):851-6.
- 98- Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, Walter K, Sato N, Parker A, Ashfaq R, Jaffee E, Ryu B, Jones J, Eshleman JR, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH, Brown PO, Goggins M. *Am J Pathol*. 2003 Apr;162(4):1151-62.
- 99- Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, Walter K, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1239-49.
- 100- A preliminary result of three-dimensional microarray technology to gene analysis with endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens and pancreatic juices. Nonogaki K, Itoh A, Kawashima H, Ohno E, Ishikawa T, Matsubara H, Itoh Y, Nakamura Y, Nakamura M, Miyahara R, Ohmiya N, Ishigami M, Katano Y, Goto H, Hirooka Y. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Apr 25;29:36.
- 101- S100P is a novel marker to identify intraductal papillary mucinous neoplasms. Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Hayashi A, Miyasaka Y, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):824-31.
- 102- Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? Mazzucchelli L. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):7-13.

- 103- S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. Arumugam T, Simeone DM, Van Golen K, Logsdon CD. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 1;11(15):5356-64.
- 104- The role of S100P in the invasion of pancreatic cancer cells is mediated through cytoskeletal changes and regulation of cathepsin D. Whiteman HJ, Weeks ME, Downen SE, Barry S, Timms JF, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8633-42.
- 105- S100P is a metastasis-associated gene that facilitates transendothelial migration of pancreatic cancer cells. Barry S, Chelala C, Lines K, Sunamura M, Wang A, Marelli-Berg FM, Brennan C, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Sep 25.
- 106- Expression of S100A2 calcium-binding protein predicts response to pancreatectomy for pancreatic cancer. Biankin AV, Kench JG, Colvin EK, Segara D, Scarlett CJ, Nguyen NQ, Chang DK, Morey AL, Lee CS, Pinese M, Kuo SC, Susanto JM, Cosman PH, Lindeman GJ, Visvader JE, Nguyen TV, Merrett ND, Warusavitarne J, Musgrove EA, Henshall SM, Sutherland RL; NSW Pancreatic Cancer Network. *Gastroenterology.* 2009 Aug;137(2):558-68
- 107- Specialized DNA arrays for the differentiation of pancreatic tumors. Buchholz M, Kestler HA, Bauer A, Böck W, Rau B, Leder G, Kratzer W, Bommer M, Scarpa A, Schilling MK, Adler G, Hoheisel JD, Gress TM. *Clin Cancer Res.* 2005 Nov 15;11(22):8048-54.
- 108- Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruzsniowski P, Sauvanet A, Lemoine NR. *Am J Pathol.* 2002 May;160(5):1745-54
- 109- Lipocalin2 promotes invasion, tumorigenicity and gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. Leung L, Radulovich N, Zhu CQ, Organ S, Bandarchi B, Pintilie M, To C, Panchal D, Tsao MS. *PLoS One.* 2012;7(10):e46677.
- 110- Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. Laurell H, Bouisson M, Berthelemy P, Rochaix P, Dejean S, Besse P, Susini C, Pradayrol L, Vaysse N, Buscail L. *World J Gastroenterol.* 2006 Jun 7;12(21):3344-51.
- 111- miRNA in clinical practice: Pancreatic cancer. Humeau M, Torrisani J, Cordelier P. *Clin Biochem.* 2013 Apr 6.

- 112- Clinical potential of microRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. Steele CW, Oien KA, McKay CJ, Jamieson NB. *Pancreas*. 2011 Nov;40(8):1165-71.
- 113- MicroRNAs: novel diagnostic and therapeutic tools for pancreatic ductal adenocarcinoma? Mardin WA, Mees ST. *Ann Surg Oncol*. 2009 Nov;16(11):3183-9.
- 114- MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. Du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrère N, Buscail L, Cordelier P. *Clin Chem*. 2010 Apr;56(4):603-12.
- 115- let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, Buscail L, Cordelier P. *Hum Gene Ther*. 2009 Aug;20(8):831-44.
- 116- The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, Tsongalis GJ, Dufresne M, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. *Clin Chem*. 2010 Jul;56(7):1107-18.
- 117- The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool. Delpu Y, Lulka H, Sicard F, Saint-Laurent N, Lopez F, Hanoun N, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. *PLoS One*. 2013;8(1):e55513.
- 118- Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P. *Mol Ther*. 2013 May;21(5):986-94.
- 119- Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis by measurement of microRNA abundance in blood and tissue. Bauer AS, Keller A, Costello E, Greenhalf W, Bier M, Borries A, Beier M, Neoptolemos J, Büchler M, Werner J, Giese N, Hoheisel JD. *PLoS One*. 2012;7(4):e34151.
- 120- Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S. *Cancer Res*. 2003 May 15;63(10):2649-57.

- 121- Towards the identification of new markers of pancreatic cancer by gene expression analysis. Rosty C. *Bull Cancer*. 2004 Jul-Aug;91(7-8):593-8.
- 122- Differentiating neoplastic from benign lesions of the pancreas: translational techniques. Khalid A. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Nov;7(11 Suppl):S55-8.
- 123- Preferential expression of cystein-rich secretory protein-3 (CRISP-3) in chronic pancreatitis. Liao Q, Kleeff J, Xiao Y, Guweidhi A, Schambony A, Töpfer-Petersen E, Zimmermann A, Büchler MW, Friess H. *Histol Histopathol*. 2003 Apr;18(2):425-33.
- 124- Identification of disease-specific genes in chronic pancreatitis using DNA array technology. Friess H, Ding J, Kleeff J, Liao Q, Berberat PO, Hammer J, Büchler MW. *Ann Surg*. 2001 Dec;234(6):769-78; discussion 778-9.
- 125- Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. Furuya N, Kawa S, Akamatsu T, Furihata K. *Gastroenterology*. 1997 Aug;113(2):593-8.
- 126- Sensitive and quantitative detection of KRAS2 gene mutations in pancreatic duct juice differentiates patients with pancreatic cancer from chronic pancreatitis, potential for early detection. Shi C, Fukushima N, Abe T, Bian Y, Hua L, Wendelburg BJ, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins MG, Eshleman JR. *Cancer Biol Ther*. 2008 Mar;7(3):353-360
- 127- Histopathologic correlation of endoscopic ultrasound findings of chronic pancreatitis in human autopsies. Bhutani MS, Arantes VN, Verma D, Moezzi J, Suryaprasad S, Kapadia AS, Gopalswamy N. *Pancreas*. 2009 Oct;38(7):820-4.
- 128- Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. *Front Physiol*. 2012;3:344.
- 129- Expression of transforming growth factor beta by small duct epithelium in chronic, cancer-associated, obstructive pancreatitis: an in situ hybridization study and review of the literature. Fukumura Y, Suda K, Mitani K, Takase M, Kumasaka T. *Pancreas*. 2007 Nov;35(4):353-7.
- 130- Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, Jones M, Tyson K, Bassi C, Scarpa A, Lemoine NR. *Oncogene*. 2001 Nov 1;20(50):7437-46.

- 131- Prognostic value of K-ras mutation status and subtypes in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens from patients with unresectable pancreatic cancer. Ogura T, Yamao K, Hara K, Mizuno N, Hijioka S, Imaoka H, Sawaki A, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Bhatia V, Higuchi K, Hosoda W, Yatabe Y. *J Gastroenterol*. 2012 Sep 15.
- 132- Clinical impact of K-ras mutation analysis in EUS-guided FNA specimens from pancreatic masses. Ogura T, Yamao K, Sawaki A, Mizuno N, Hara K, Hijioka S, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Shimizu Y, Bhatia V, Higuchi K, Hosoda W, Yatabe Y. *Gastrointest Endosc*. 2012 Apr;75(4):769-74.
- 133- KRAS mutations and their correlation with survival of patients with advanced pancreatic cancer. Bournet B, Muscari F, Guimbaud R, Cordelier P, Buscail L. *Pancreas*. 2013 Apr;42(3):543-4.

ANNEXE

I. ANNEXE ARTICLE 1

HUMAN GENE THERAPY 20:831–844 (August 2009)
 © Mary Ann Liebert, Inc.
 DOI: 10.1089/hum.2008.134

Scientific Article

let-7 MicroRNA Transfer in Pancreatic Cancer-Derived Cells Inhibits *In Vitro* Cell Proliferation but Fails to Alter Tumor Progression

Jérôme Torrisani,¹ Barbara Bournet,^{1,2} Maël Chalret du Rieu,¹ Michèle Bouisson,¹
 Anny Souque,¹ Jean Escourrou,² Louis Buscail,^{1,2} and Pierre Cordelier¹

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is still the fourth leading cause of cancer-related deaths in Western countries, with increasing incidence. Neither effective prognostic markers nor therapies exist for this cancer. MicroRNAs are potent inhibitors of protein translation, and aberrantly expressed in many cancers. Because *let-7* microRNA targets the *K-ras* oncogene, we aimed to characterize *let-7* expression and function in PDAC *in vitro* and *in vivo*. *Let-7* expression was quantified by real-time RT-PCR from resected tumors and matching adjacent tissue, and in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration material from patients with PDAC. *Let-7* is detected by reverse transcription *in situ* PCR in a PDAC tissue microarray. PDAC-derived cells were transfected with plasmid-based synthetic microRNAs or by lentiviral transduction, *in vitro* and *in vivo*. *Let-7* microRNA expression is strongly reduced in PDAC samples, as compared with adjacent tissue. *Let-7* is present in normal acinar pancreatic cells, and lost in poorly differentiated cancer samples. In addition, *let-7* expression was repressed in patients with PDAC not eligible for surgery. Restoring *let-7* levels in cancer-derived cell lines strongly inhibits cell proliferation, *K-ras* expression, and mitogen-activated protein kinase activation, but fails to impede tumor growth progression after intratumoral gene transfer or after implantation of Capan-1 cells stably overexpressing *let-7* microRNA. We describe here for the first time the extensive loss of expression of *let-7* in PDAC. In addition, this study provides the initial steps for a microRNA replacement therapy for this cancer.

Introduction

PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA (PDAC) remains the fourth leading cause of cancer-related deaths in Western countries, with an increasing incidence over the last 40 years (Jemal *et al.*, 2007). PDAC prognosis is poor due to a late diagnosis, a long and silent clinical phase during tumor development, and a lack of early diagnostic markers. MicroRNAs have emerged as a new class of potent regulators of gene expression. MicroRNAs bind to multiple sites in the 3' untranslated region (3'-UTR) of target mRNAs, to inhibit their translation (Engels and Hutvagner, 2006). MicroRNAs are aberrantly expressed in both solid and hematopoietic tumors (Gregory and Shiekhattar, 2005); their expression correlates with tissue type, differentiation, aggression, and response to therapy (for review see Cummins and Velculescu, 2006). Thus, the microRNA signature may be used for the molecular diagnosis of many cancers.

The proto-oncogene Kirsten-*ras* (*K-ras*) is mutated in more than 80% of PDACs and thus is considered a potential molecular marker and target for PDAC treatment (Costentin *et al.*, 2002). Interestingly, *let-7* microRNA inhibits *K-Ras* protein expression in human cancer-derived cells (Morris and McManus, 2005). In *Caenorhabditis elegans*, *let-7* controls cell cycle exit timing and differentiation (Johnson *et al.*, 2005). In humans, *let-7* coding regions map to regions altered or deleted in human tumors (Calin *et al.*, 2004). A deregulation of *let-7* is associated with the genesis and maintenance of the lymphoma phenotype in Burkitt lymphoma cells (Sampson *et al.*, 2007). In addition, *let-7* represses the high-mobility group-2 (HMGA2) oncogene (Mayr *et al.*, 2007), to inhibit lung cancer cell-derived proliferation (Takamizawa *et al.*, 2004; Lee and Dutta, 2007). Johnson and colleagues demonstrated that *let-7* alters several signaling pathways in cancer-derived cells, such as mitotic signaling, cell cycling, angiogenesis, and cell adhesion and migration (Johnson *et al.*, 2007). Considering that

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 858-12MR, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Département Cancers Epithéliaux, Angiogenèse et Signalisation, 31432 Toulouse Cedex 4, France.

²Service de Gastro-Entérologie et de Nutrition Centre Hospitalier Universitaire Rangueil, 31059 Toulouse, France.

TABLE 1. CLINICAL DATA AND TUMOR PATHOLOGY OF PDAC TISSUES^a

Sample ID	Age (years)	Sex	Tumor pathology/stage ^b	Differentiation
1	62	M	pT3N1/III	Moderate
2	45	M	pT3N1/III	Well
3	81	M	pT3N1/III	Moderate
4	74	M	pT3N1/III	Moderate
5	70	F	pT3N1/III	Moderate
6	79	M	pT3N1/III	Moderate
7	61	F	pT3N0/II	Well
8	69	M	pT3N0/II	Well
9	73	F	pT3N1/III	Moderate
10	79	M	pT3N0/II	Well
11	76	M	pT3N0/II	Well
12	72	F	pT3N1/III	Well
13	69	F	pT3N1/III	Well
14	54	F	pT3N1/III	Well
15	58	M	pT3N1/III	Moderate
16	40	M	pT3N1/III	Moderate
17	74	M	pT3N1/III	Moderate
18	57	M	pT3N1/III	Moderate
19	59	M	pT3N0/II	Moderate
20	63	M	pT2N0/I	Moderate

Abbreviations: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; UICC, international Union against Cancer (Geneva, Switzerland).

^aSamples were matched with adjacent normal tissue. Tissue sections 13 to 20 were used for *in situ* detection of *let-7*.

^bUICC classification.

the current cancer treatment regimens are directed toward single targets (including *let-7*-targeted mRNAs) the therapeutic benefit of *let-7*, and of microRNAs in general, may be greater. Enthusiasm for the therapeutic development of *let-7* is heightened by the fact that *let-7* is a naturally occurring molecule with biological implications in cancer, which supports the concept of microRNA replacement therapy. Therefore, this study was aimed at characterizing *let-7* microRNA expression in PDAC and at determining whether restoring *let-7* expression in PDAC-derived cells inhibits cell proliferation and tumor progression.

Materials and Methods

Cell lines

Capan-1, Capan-2, BxPC-3, MIA PaCa-2, and PANC-1 cell lines derived from human PDACs were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured as previously described (Torrisoni *et al.*, 2001). Human HPNE (human pancreatic nestin-positive) cells derived from pancreatic ducts were obtained from M. Ouellette (University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE) and were grown as described (Lee *et al.*, 2003). All media were supplemented with amphotericin B (Fungizone; Invitrogen, Cergy Pontoise, France), antibiotics (Invitrogen), and anti-*Mycoplasma* Plasmocin reagent (InvivoGen, Toulouse, France).

Clinical samples

Pancreatic tissue samples were collected from pancreatic surgery patients, in accordance with the policies and practices of the facility's ethics committee at the Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) of Toulouse and Bordeaux, and Can-

céropôle Grand Sud-Ouest (Table 1). All patients gave their informed written consent. Histopathology faculty selected cancerous pancreatic tissue with matched adjacent tissue.

Endoscopic ultrasound (EUS)-guided fine needle aspiration (FNA) was performed in patients ineligible for surgery because of advanced disease or who were in poor health, using a linear ultrasound endoscope (Olympus America [Center Valley, PA] and Pentax Medical [Montvale, NJ]) and an EUSN1 22G needle (Cook Medical, Bloomington, IN). The protocol was approved by the Ethics Committee of Midi-Pyrénées CPCR-1. All patients gave their informed written consent before EUS. FNA tissue material was transferred into Dubosq-Brazil medium or formalin. Residual cellular material was collected in RNAlater (Qiagen, Courtabouef, France) and stored at -20°C . Twelve patients diagnosed with PDAC after histopathological analysis of microbiopsies were included at CHU Toulouse (Table 2: female, $n = 5$; male, $n = 7$; mean age, 65 ± 2.6 years).

Let-7a coding sequence was cloned into the psiSTRIKE U6 hairpin cloning system (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), to obtain psiSTRIKE(Let-7). As control, a small nuclear RNA (siRNA) targeting firefly luciferase (*Luc*) was cloned into the psiSTRIKE U6 hairpin cloning system (Promega) to generate psiSTRIKE(Luc). Plasmids were verified by sequencing (MilleGen, Labège, France). pmaxGFP vector was purchased from Amaxa (Walkersville, MD). pT7A5(RFP) vector was previously described (Cordelier *et al.*, 2003).

Oligonucleotides 5'-tgctgtgaggtaggtgtatagttgtttggccactgactgacaactatacctactactca-3' and 5'-cctgtgaggtaggtgtatagttgtcagtcagtgccaaacaactatacactactactac-3' were annealed and cloned into pcDNA-6.2-GW/emGFP-miR vector (Invitrogen) to obtain pcDNA6.2-GW/emGFP-miR-Let-7 vector. pcDNA6.2-GW/emGFP-miR-Neg vector (Invitrogen) was used as control. GFP-miR-Let-7 and GFP-miR-Neg cassettes were cloned into pDONR221 (Invitrogen), using the BP Clonase reaction (Invitrogen), and subsequently transferred into pLenti4/TO/V5-DEST lentiviral vector (Invitrogen), using the LR Clonase reaction (Invitrogen) to create pLenti4/

TABLE 2. CLINICAL DATA AND TUMOR PATHOLOGY OF ENDOSCOPIC ULTRASOUND-GUIDED FINE NEEDLE ASPIRATION

FNA id	Sex	Age (years)	Grade ^a	TNM ateus
FNA1	M	58	II	T4N0
FNA2	M	57	I	T4N1
FNA3	M	81	II	T3N0
FNA4	F	71	II	T2N0
FNA5	M	72	II	T3N1
FNA6	F	61	I	T3N0
FNA7	F	74	II	T4N0
FNA8	M	59	II	T3N0
FNA9	F	69	II	T4N0
FNA10	F	66	II	T4N0
FNA11	M	48	I	T2N0
FNA12	M	65	I	T4N1

Abbreviations: EUS, endoscopic ultrasound; FNA, fine needle aspiration; id, inner diameter; TNM, cancer staging system (T, tumor size; N, lymph node spread; M, metastasis).

^aGrade I, well differentiated; grade II, moderately differentiated; grade III, poorly differentiated.

TO/GFP-miR-Let-7 and pLenti4/TO/GFP-miR-Neg vectors, respectively.

Cell transfection

Cells were transfected with pre-microRNAs (Ambion/Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) at 10 nM final concentration, or with 1 μ g of microRNA-encoding plasmid [psiSTRIKE(Let-7) and psiSTRIKE(Luc)], using siPort NeoF_x reagent (Ambion/Applied Biosystems) and Nucleofector II (Amaxa, Cologne, Germany), respectively. Cy3-control pre-microRNA was purchased from Ambion/Applied Biosystems.

Cell proliferation and cell viability assays

Cell proliferation assays were performed in 35-mm dishes for 48 hr. Cells were counted with a Coulter counter model ZM (Beckman Coulter, Roissy, France) as described by Buscaill and colleagues (1992).

LV-miR-Neg and LV-miR-Let-7 Capan-1 cells (see below) were seeded at 6×10^3 cells per well of a 96-well dish. After 96 hr, cell viability was measured using a CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay (MTS) (Promega).

RNA extraction

Total RNA was extracted from cell lines and tumors with TRIzol reagent (Invitrogen). Quality and concentration of the RNA were determined with an Experion electrophoresis system (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) and an ND-100 nanospectrophotometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France), respectively. RNA samples displayed a 28S/18S ratio > 1.8. Total RNA from FNA was purified with an RNeasy micro kit (Qiagen).

MicroRNA detection in FNA

Five nanograms of total RNA isolated from FNA samples was amplified as complementary DNA (cDNA), using a Full Spectrum global amplification kit (System Biosciences, Mountain View, CA) as per the manufacturer-recommended conditions. As control, we used 5 ng of total RNA from normal human pancreas and tissue samples adjacent to PDAC. cDNAs were diluted 1:50 (pre-let-7a-1) or 1:50,000 (18S rRNA) before real-time PCR was performed in duplicate with an ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems), SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems), and specific primers for let-7a precursor as described (Takamizawa *et al.*, 2004). Expression values were calculated according to the comparative C_T method as $2^{-\Delta C_T}$ [$\Delta C_T = C_T(\text{let-7a}) - C_T(18S)$] and arbitrarily multiplied by 10^2 .

MicroRNA detection in cell lines and tumors

Quantification of mature microRNA was conducted on 100–500 ng of total RNA extracted from cell lines and tumors, using the miScript PCR system (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. U6, U18, and 5S were used as controls. cDNA samples were diluted (1:10) before duplicate real-time PCR assays for microRNA (Qiagen) were performed with an ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems), with SYBR green PCR master mix (Qiagen). Expression values were calculated according to the comparative C_T method as $2^{-\Delta C_T}$ [$\Delta C_T = C_T(\text{let-7a}) - C_T(\text{geometric mean U6, 5S, U18})$] and arbitrarily multiplied by 10^2 .

Reverse transcription in situ PCR

The tissue microarray (TMA; Euromedex, Souffelweyersheim, France) comprises 70 PDAC sections (female, $n = 25$; male, $n = 45$; mean age, 56.6 ± 11 years) with 49 cases of stage I cancer, 13 cases of stage II, 5 cases of stage III, and 3 cases of stage IV according to the International Union against Cancer (UICC, Geneva, Switzerland) classification. All were proven PDAC (grade I/well differentiated, $n = 6$; grade II/moderately differentiated, $n = 38$; and grade III/poorly differentiated, $n = 20$; not determined in 6 cases). The TMA also contains nine sections of normal pancreas (female, $n = 5$; male, $n = 4$; mean age, 52.8 ± 12 years). The RT *in situ* PCR was conducted as previously described, with minor modifications (Cordelier *et al.*, 2003). Briefly, paraffin-embedded TMAs were deparaffinized in xylene and rehydrated in descending grades of ethanol. Tissues were digested with pepsin (Dako, Trappes, France), and incubated in 0.2 N HCl for 30 min at room temperature. Deacetylation was conducted in 100 mM triethanolamine (pH 8.0) for 10 min with gentle agitation, before treatment with 1 U of DNase I (Invitrogen). Slides were postfixed in 4% paraformaldehyde, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and dehydrated in ascending grades of ethanol. RNA was converted to cDNA on slides, using a single-step RT-PCR kit (Invitrogen), biotin-conjugated dUTP (Applied Biosystems), Self-Seal reagent (Bio-Rad), and 1.2 μ M concentrations of primers targeting pre-let-7a-1 RNA (Takamizawa *et al.*, 2004) in a TC-512 gradient thermal cycler with an *in situ* block (Thermo Scientific). In control slides, primers, RT/Platinum Taq polymerase mix (Invitrogen), and/or conjugated dUTPs were omitted. After incubation at 55°C for 30 min, slides were heated at 94°C for 2 min before performing 20 cycles consisting of 94°C for 30 sec, 55°C for 1 min, and 72°C for 2 min. A final extension was performed at 72°C for 10 min. Slides were incubated in 100% ethanol for 1 min and washed in $2 \times$ standard sodium chloride–sodium citrate (SSC: 3 M NaCl, 0.3 M trisodium citrate), $2 \times$ SSC – 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), $1 \times$ SSC – 0.5% SDS, and $0.2 \times$ SSC – 0.5% SDS at room temperature for 5 min each. Sections were treated with StreptABCComplex/HRP (horseradish peroxidase) reagent and AEC + high-sensitivity substrate (Dako), in accordance with the manufacturer's recommendations. After staining with Mayer's hematoxylin, slides were observed with an optical microscope, coupled to an image analyzer (VisioLab2000; Biocom, Les Ulis, France).

Western blotting analysis

Total proteins were extracted from Capan-1 cells and separated by SDS–10% polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Biotrace NT; Pall, Saint-Germain-en-Laye, France) as previously described (Sirach *et al.*, 2007). After saturation at room temperature for 1 hr, membranes were incubated with antibodies directed against either K-Ras (diluted 1:250; Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France) or phospho-specific p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France). Secondary anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated antibodies (diluted 1:10,000; Perbio Science, Brebières, France) were added. Membranes were incubated for 1 hr at room temperature before chemoluminescence detection (Immobilon; Millipore, Vandoeuvre, France). Glyceraldehyde-3-phosphate

FIG. 1. *let-7* microRNA expression in resected pancreatic cancer. **(A)** Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of *let-7* expression in total RNA from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tumors and corresponding adjacent tissues in 12 patients was performed as described in Materials and Methods. Results are expressed as $2^{-\Delta C_T}$ [$\Delta C_T = C_T(\text{microRNA}) - C_T(\text{geometric mean U6, U18, 5S})$] $\times 10^2$. MAT, matching adjacent tissue. **(B)** Relative expression of *let-7* in PDAC samples and matching adjacent tissues. $***p < 0.001$.

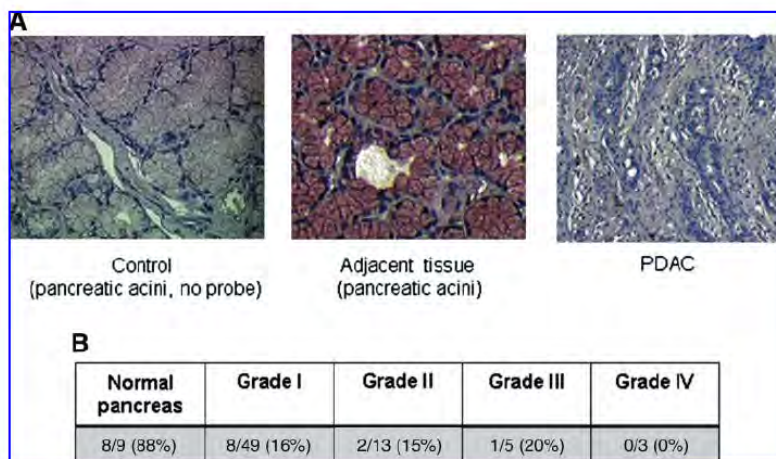
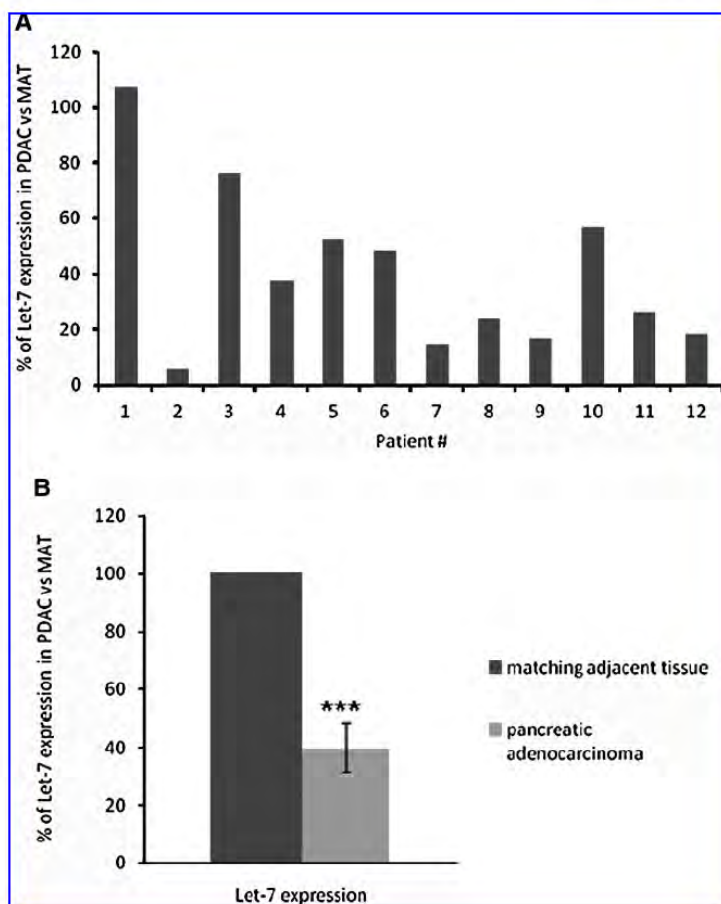
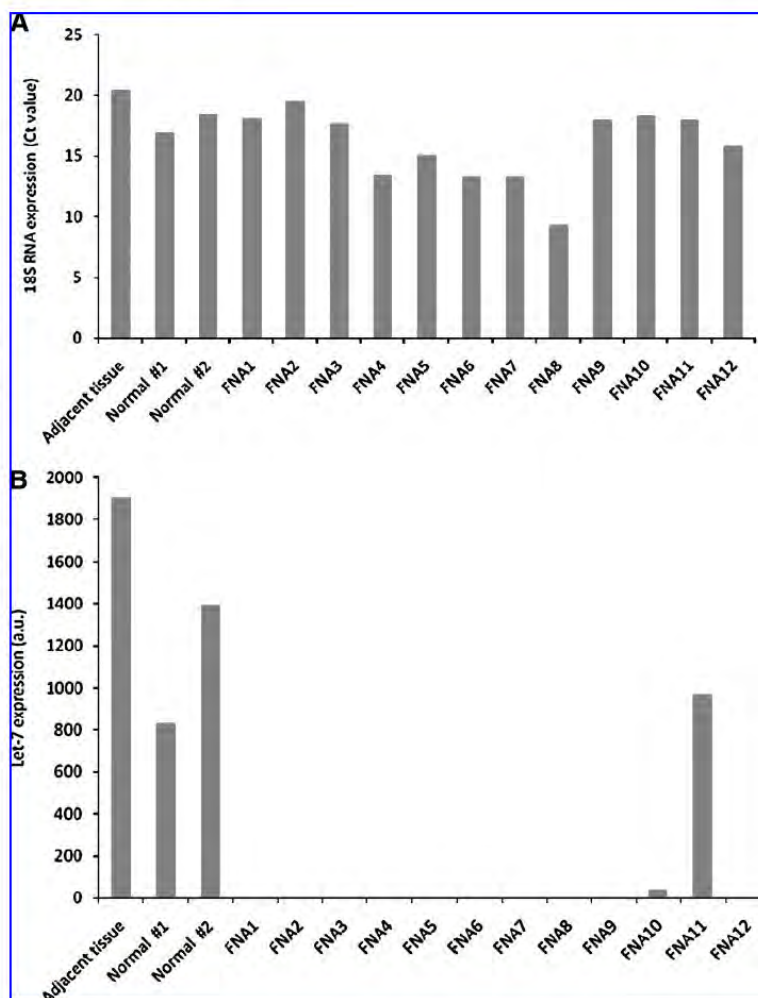


FIG. 2. *In situ* detection of *let-7* microRNA in pancreatic cancer. **(A)** Reverse transcription *in situ* PCR of *let-7* precursor expression was conducted in PDAC tumors as described in Materials and Methods. Representative fields of control sections, adjacent tissue, and PDAC (representative of 8 lesions, 15 fields per lesion; original magnification, $\times 200$). **(B)** Quantification of *let-7* expression in normal pancreas and grade I, II, III, and IV PDAC. Color images available online at www.liebertonline.com/hum.

FIG. 3. *let-7* detection in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) material from patients with pancreatic cancer. Total RNA was purified from normal pancreas, normal adjacent tissue, and EUS-FNA material before amplification as described in Materials and Methods. (A) 18S RNA was detected by qRT-PCR. Results are expressed as cycle threshold (C_T). (B) *let-7* precursor was quantified in the same samples by qRT-PCR as described in Materials and Methods. Results are expressed as $2^{-\Delta C_T} [\Delta C_T = C_T(\text{let-7}) - C_T(18S)] \times 10^2$.



dehydrogenase (GAPDH) protein was used as loading control (diluted 1:1000; Santa Cruz Biotechnology).

Generation of pancreatic cancer Capan-1 stable cell line overexpressing let-7 microRNA

Lentiviral particles were produced with pLenti4/TO/GFP-miR-Let-7 and pLenti4/TO/GFP-miR-Neg vectors and ViraPower lentiviral packaging mix (Invitrogen). Capan-1 cells were incubated with the lentiviral particles (multiplicity of infection, 1) for 24 hr and subsequently selected with Zeocin (Invivogen, Toulouse, France) at 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2 weeks.

Efficiency of viral infection and selection was estimated by measuring the percentage of GFP-expressing cells by flow cytometric analysis (see below). Overexpression of mature miR-Let-7 was quantified by RT real-time PCR (see above).

Flow cytometric analysis

Control and LV-miR-Let-7-transduced cells were harvested after trypsinization and collected by centrifugation at 1500 rpm for 5 min. Cells were washed once with PBS. The number of EGFP-positive cells was determined by flow cytometric analysis with a FACSCalibur system (Becton Dickinson France, Le Pont-De-Claix, France).

In vivo model of pancreatic cancer

An *in vivo* model of xenografted PDAC-derived cells into athymic mice has been extensively described (Carrere *et al.*, 2005). Briefly, 5×10^6 exponentially growing Capan-1 cells in 100 μl of PBS were subcutaneously inoculated into 8-week-old athymic female nude mice (Swiss nude/nude; Iffa-Credo, l'Abresle, France) bred and maintained under pathogen-free conditions. Fourteen days after xenografting, intratumoral

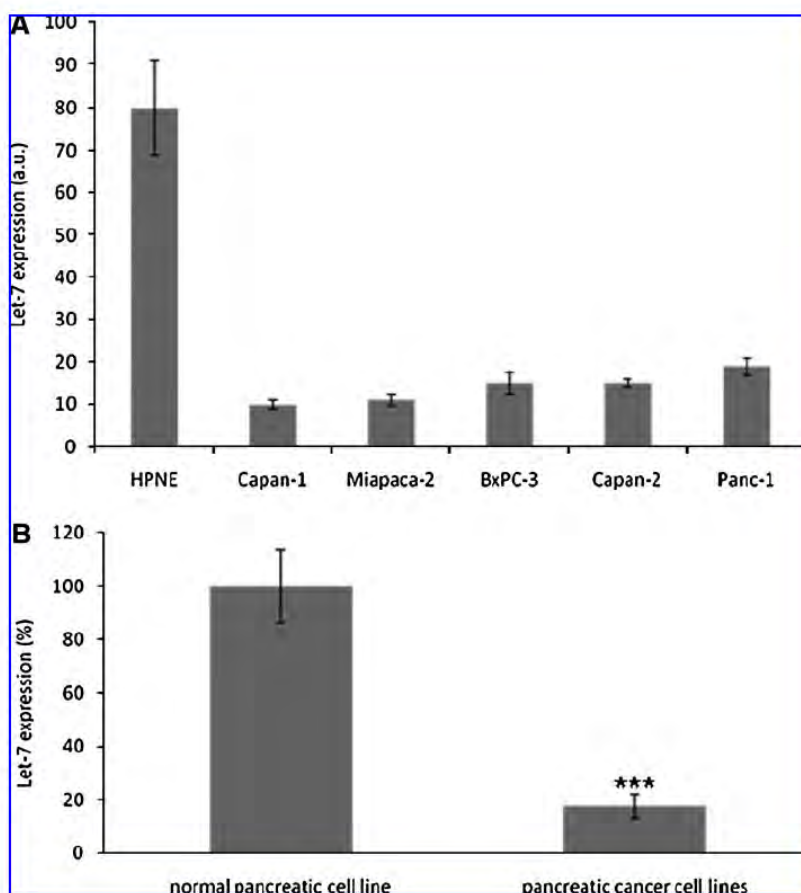


FIG. 4. *let-7* expression in pancreatic cancer-derived cells. (A) RT-PCR analysis of *let-7* expression in total RNA from a normal pancreatic HPNE cell line and PDAC-derived cell lines was performed as described in Materials and Methods. Results are expressed as $2^{-\Delta C_T}$ [$\Delta C_T = C_T(\text{microRNA}) - C_T(\text{geometric mean U6, U18, and 5S})$] $\times 10^2$. (B) Relative expression of *let-7* in a normal pancreatic HPNE cell line and PDAC-derived cell lines. *** $p < 0.001$.

in vivo gene transfer was performed with linear polymers of ethylenimine (polyethylenimine [PEI], 22 kDa, ExGen 500; Euromedex). PEI:DNA complexes were prepared at a PEI nitrogen-to-DNA phosphate (N:P) ratio of 9 in 5% (w/v) glucose. Ten micrograms of psiSTRIKE(Let-7) plasmid was injected into the tumors with a sterile 29-gauge lymphography catheter set with a sterile, 29-gauge insulin needle. Control animals received 10 μg of psiSTRIKE(Luc) plasmid. Alternatively, *in vivo* transfection of either random or *let-7* precursor microRNA (1 μM) was performed with siPort NeoFx reagent. Subcutaneous tumors were externally measured after gene transfer. Four to six mice were used per group.

LV-miR-Neg and LV-miR-Let-7 Capan-1 cells were subcutaneously injected into 8-week-old athymic mice (5×10^6 in 100 μl of PBS solution per animal). Three to five mice were used per group. Tumor volumes were externally measured from 7 days post-injection until day 27.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard error (SE). An unpaired Student *t* test calculated with Graphpad Instat software (Graphpad Software, La Jolla, CA) was used to compare data (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Reduced expression of *let-7* microRNA in PDAC samples

Let-7 expression was analyzed in PDAC samples after surgery (Table 1). As control, we used corresponding tissues adjacent to the tumors. Total RNA was extracted and subjected to *let-7* microRNA detection as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 1A, *let-7* expression is down-regulated in PDAC samples as compared with their adjacent counterpart in 11 of 12 patients (91%). Altogether, *let-7* expression was reduced by $59.9 \pm 8.5\%$ ($p < 0.001$) in PDAC samples (Fig. 1B).

To identify the cell population expressing *let-7* in normal and diseased pancreas, we performed reverse transcription *in situ* PCR (Fig. 2A). Whereas no specific signal is present in control slides, *let-7* was strongly expressed in pancreatic acini adjacent to PDAC but not in stromal or cancerous cells. Extending *let-7* detection to the PDAC tissue macroarray (TMA), we found that *let-7* was present in 88% of normal pancreatic samples (eight of nine). In contrast, *let-7* expression is inversely correlated with histological grade, that is, expression was weak in poorly differentiated samples (Fig. 2B). Taken together, these results demonstrated that *let-7* expres-

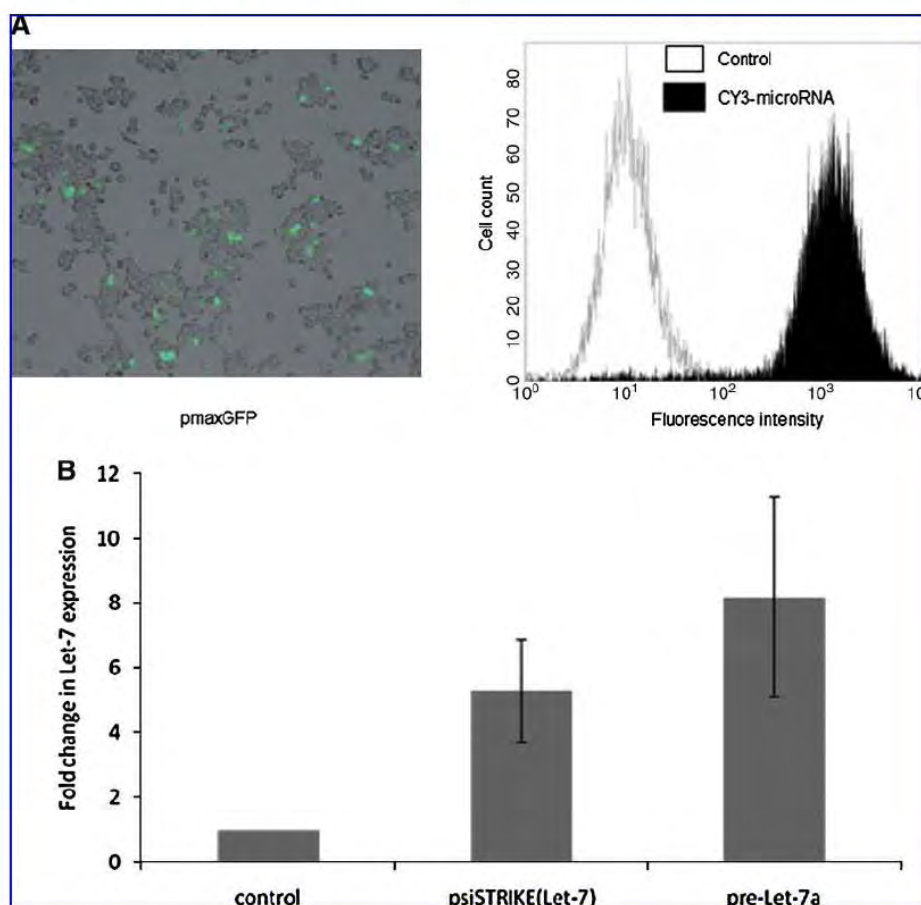


FIG. 5. *let-7* transfection in pancreatic cancer-derived cells. (A) Capan-1 cells were transfected for 48 hr after nucleofection with pmaxGFP encoding eGFP as described in Materials and Methods (left). Field is representative of three independent experiments. Capan-1 cells were transfected for 48 hr with a random microRNA conjugated to Cy3 as described in Materials and Methods (right). Transfection efficiency measured by FACS analysis is representative of three independent experiments. (B) Capan-1 cells were transfected for 48 hr with psiSTRIKE(Let-7), or with synthetic *let-7* precursors. As controls, cells were transfected with psiSTRIKE(Luc) or with synthetic random microRNAs. *let-7* expression was detected by qRT-PCR and expressed as fold change compared with untransfected control cells. Results are given as the mean \pm SEM of three independent experiments. Color images available online at www.liebertonline.com/hum.

sion is detected in normal pancreas, and in pancreatic acini adjacent to the tumor, whereas its expression is decreased in poorly differentiated PDAC samples.

Endoscopic ultrasound (EUS) has become an essential modality in diagnosis and management of pancreatic malignancies (Buscail *et al.*, 2006). We identified molecular markers for PDAC by gene expression analysis of EUS-guided fine needle aspiration (FNA) material (Laurell *et al.*, 2006). Because of the paucity of the collected material, a constant amount of total RNA (5 ng) was amplified to maintain representation of gene expression in the original sample (Steg *et al.*, 2006). However, because of their small size, mature microRNAs are excluded by this technique. Therefore, we quantified *let-7* precursors as previously described (Takamizawa *et al.*, 2004). 18S rRNA was selected as internal control because its expression is conserved in all the samples analyzed (Fig. 3A).

We observed that *let-7* precursors are expressed in tissue adjacent to the tumor and normal pancreas (Fig. 3B). Again, *let-7* precursors are strongly reduced in PDAC samples. *let-7* levels were extremely low (≤ 1) in 10 of 12 (83.3%), moderate (< 100) in 1 of 12 (8.3%), and high (> 100) in 1 of 12 (8.3%) EUS-FNA samples from patients diagnosed with PDAC. In conclusion, we demonstrated that *let-7* levels are strongly reduced in both resected PDAC tumors, and FNA material.

Overexpression of let-7 in PDAC-derived cell line strongly inhibits cell proliferation, K-ras expression, and MAPK activation

The data presented here describing the reduced expression of *let-7* in PDAC samples, together with its negative role in K-Ras protein expression, prompted us to explore the effect of

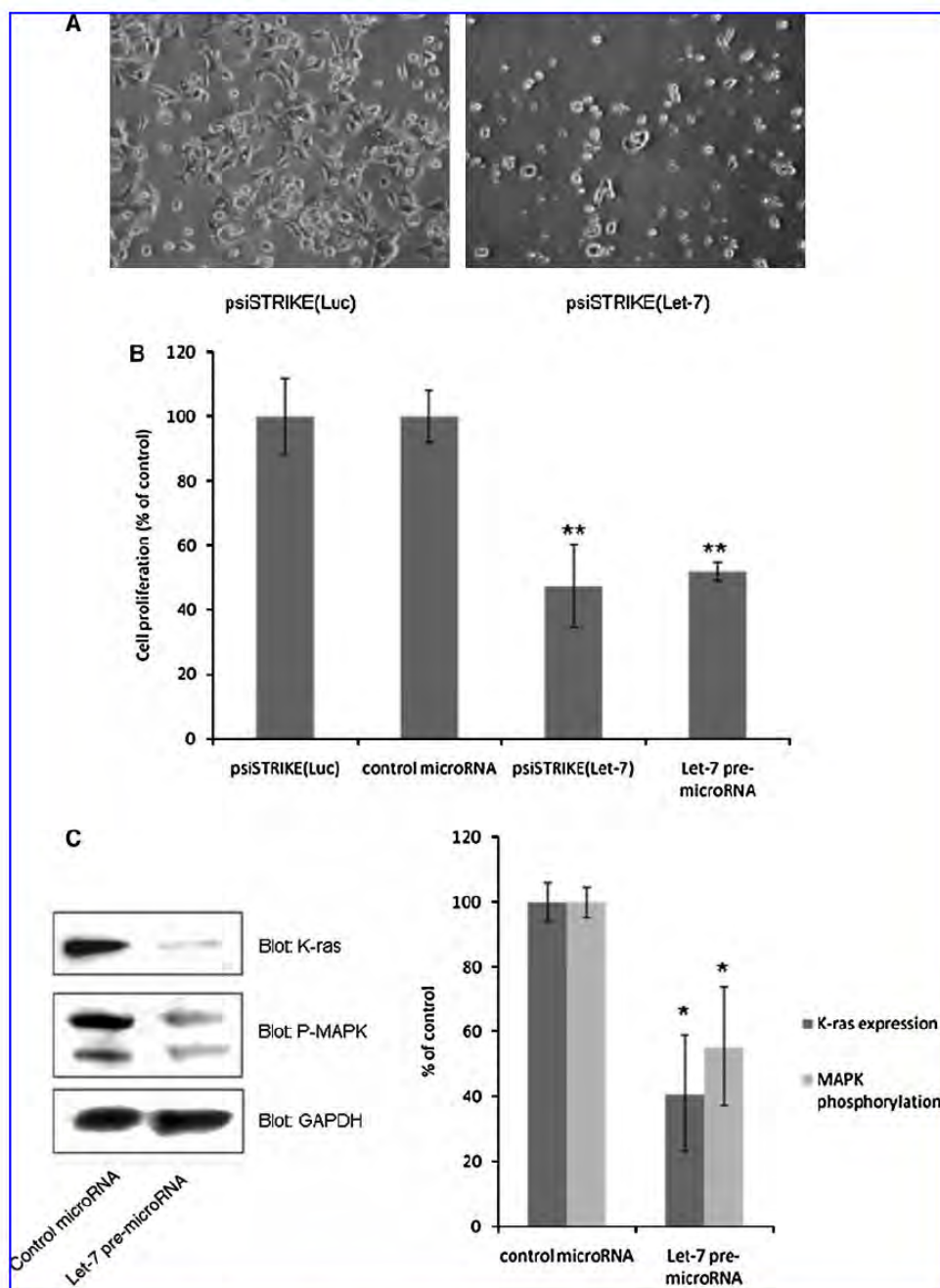


FIG. 6. *let-7* overexpression in pancreatic cancer-derived Capan-1 cells. **(A)** Capan-1 cells were transfected with psiSTRIKE(Let-7) for 48 hr. As control, cells were transfected with psiSTRIKE(Luc). Fields are representative of three independent experiments. **(B)** Capan-1 cells were transfected with psiSTRIKE(Let-7) or *let-7* precursors for 48 hr as described in Materials and Methods. As control, cells were transfected with psiSTRIKE(Luc) or scramble microRNA, respectively. Cell proliferation was measured by cell counting. Results are given as the mean \pm SEM of three independent experiments. ** $p < 0.01$. **(C)** *Left:* Western blot analysis for K-Ras expression and MAPK phosphorylation after transfection of *let-7* precursors in PDAC-derived cell lines. Results are representative of three independent experiments. *Right:* K-Ras expression and MAPK phosphorylation after Capan-1 cell transfection with *let-7* precursors. Data represent means \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$.

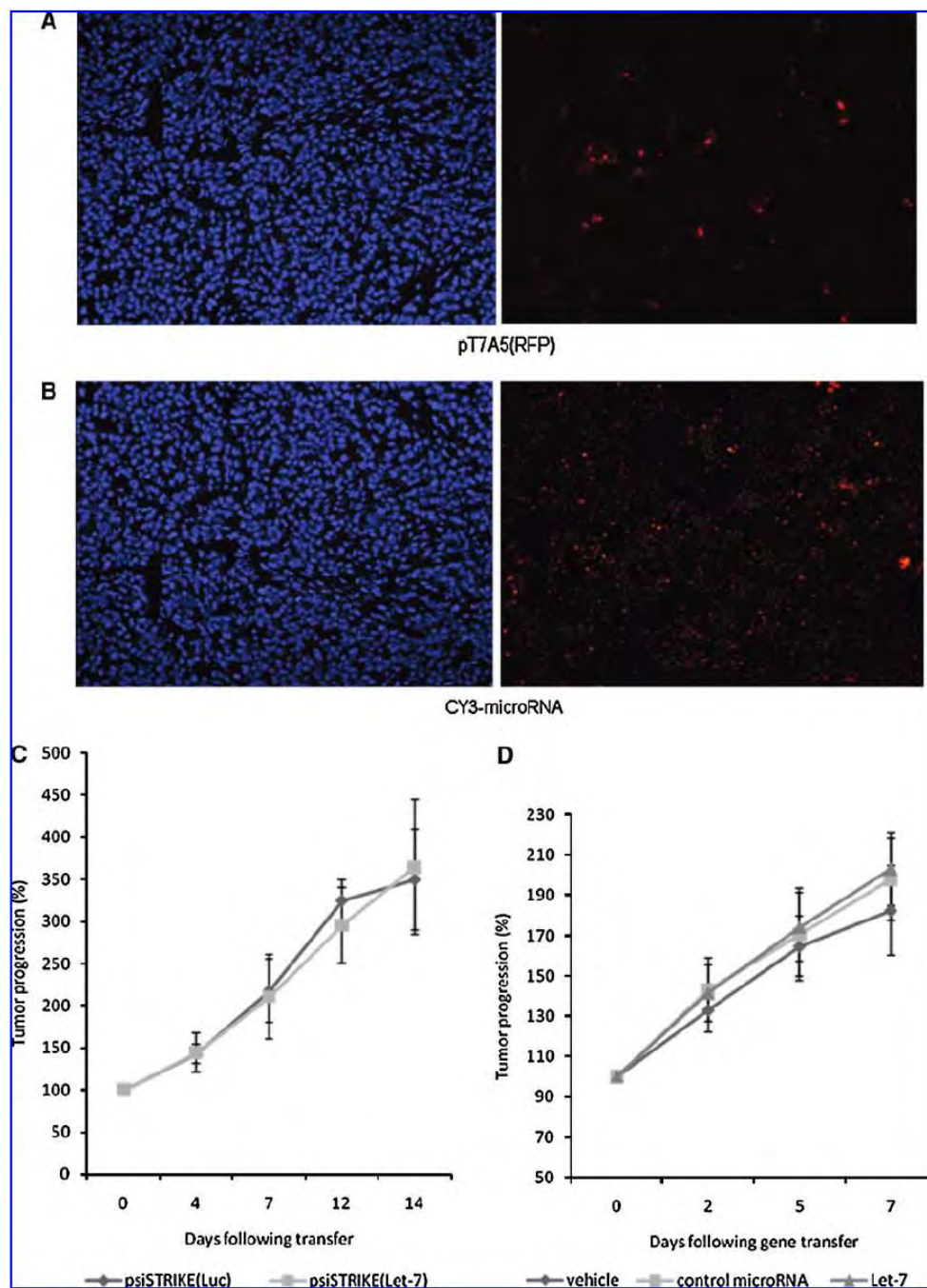


FIG. 7. *In vivo* *let-7* microRNA transfer into exponentially growing pancreatic tumors. Capan-1 tumors were established in athymic mice as described in Materials and Methods. Fourteen to 17 days later, pT7A5(RFP) plasmid encoding (A) red fluorescent protein (RFP) or (B) Cy3-labeled microRNA were transferred into growing tumors as described in Materials and Methods. Fields are representative of three independent experiments (left, 4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI] staining). Next, (C) 10 μ g of psiSTRIKE(Let-7) plasmid or (D) 1 μ M synthetic *let-7* microRNA precursors were injected into growing tumors as described in Materials and Methods. As controls, psiSTRIKE(Luc) or control microRNA was injected with vehicle into tumors. Results are expressed as the mean of tumor progression \pm SEM of four to six mice per group after gene transfer. Color images available online at www.liebertonline.com/hum.

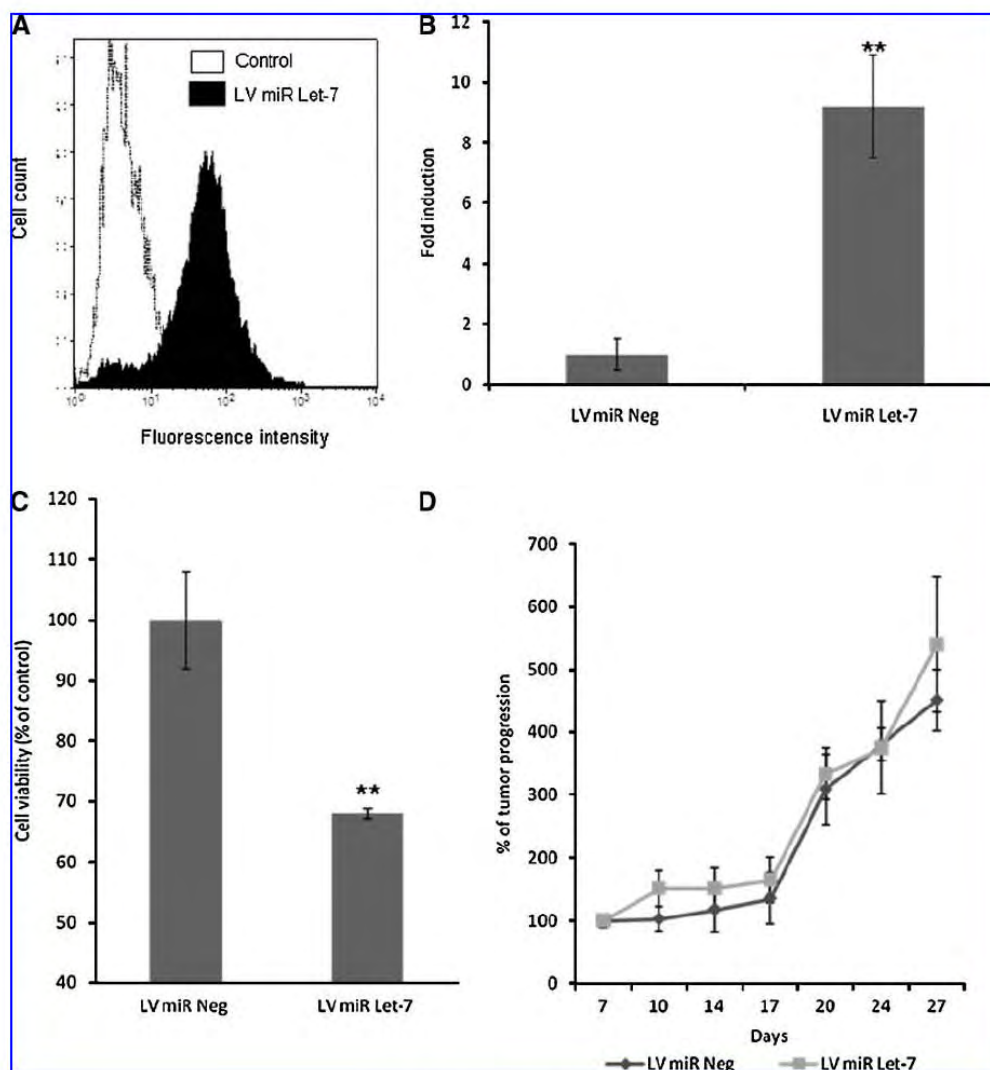


FIG. 8. (see next page).

let-7 overexpression on PDAC-derived cell proliferation. *Let-7* expression was quantified in cell lines derived from primary tumors or metastasis. Human primary HPNE cells, derived from pancreatic ducts, were used as control (Lee *et al.*, 2003). Whereas HPNE cells express high levels of *let-7*, PDAC-derived cell lines displayed low levels of *let-7*, similarly to PDAC samples (Fig. 4A). In summary, *let-7* expression is reduced by $82.5 \pm 4.5\%$ ($p < 0.001$) in PDAC-derived cells as compared with normal pancreatic cells (Fig. 4B).

Next, Capan-1 cells were used as a model of *K-ras*-mutated (verified by restriction fragment length polymorphism [RFLP] and sequencing; Costentin *et al.*, 2002), aggressive PDAC-derived cells (Carrere *et al.*, 2005). We first optimized the

transfection conditions for subsequent expression of both precursor and mature *let-7* microRNAs in these cells. Using nucleofection, Capan-1 cells were transfected to obtain detectable levels ($39 \pm 8\%$), with minimal toxicity (Fig. 5A, left). As expected, the use of synthetic microRNA precursors resulted in high levels of transfected cells ($93 \pm 5\%$), (Fig. 5A, right). We also transfected Capan-1 cells with plasmids encoding mature *let-7* microRNA [psiSTRIKE(Let-7)], or synthetic *let-7* microRNA precursors. As control, cells were transfected with an anti-luciferase siRNA-encoding plasmid or with a negative control microRNA precursor. By qRT-PCR, we measured 5.3 ± 1.6 -fold and 8.2 ± 3.1 -fold increases in *let-7* expression after transfection with psiSTRIKE(Let-7) and *let-7*

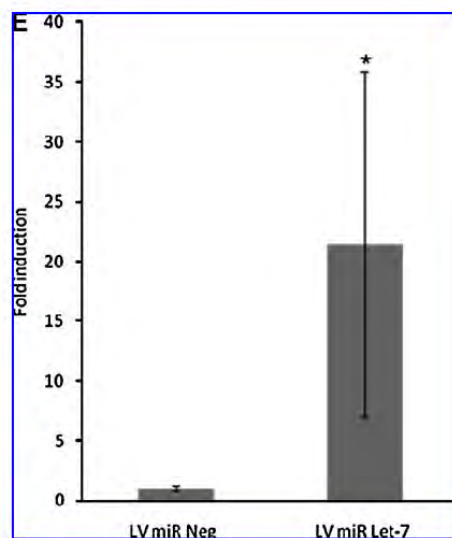


FIG. 8. *In vitro* and *in vivo* effect of stable Let-7 expression in Capan-1 cells. (A) Cytometric analysis of Capan-1 cells stably expressing GFP and *let-7* microRNA following transduction with lentiviral vectors. Results are representative of three independent analyses. (B) Relative expression of *let-7* in the stable Capan-1 cell line was measured by qRT-PCR as described in Materials and Methods. Results represent the mean of three different amplifications and are expressed as fold induction relative to *let-7* expression in the LV-miR-Neg cell line. $**p < 0.01$. (C) LV- miR-Neg and LV- miR-Let-7 Capan-1 cells were seeded at 6×10^3 cells per well in a 96-well dish. After 96 hr, cell viability was measured by MTS assay. The graphs represent the average of three different experiments performed in triplicate and are expressed as the percentage (\pm SEM) of viable cells compared with LV- miR-Neg cells (100%). $**p < 0.01$. (D) *let-7*-overexpressing Capan-1 cells (LV-miR-Let-7) were injected subcutaneously into athymic mice as described in Materials and Methods. As control, LV-miR-Neg cells were also injected. Seven days after injection, tumor growth was measured every 3–4 days until day 27. Results represent the mean of tumor progression \pm SEM (six mice per group) and are expressed as a percentage of tumor progression relative to LV-miR-Neg tumor on day 7 (100%). (E) Expression of *let-7* microRNA in LV-miR-Let-7 and LV-miR-Neg tumors was measured by qRT-PCR as described in Materials and Methods. Results represent the mean of three different tumors per group and are expressed as fold induction relative to *let-7* expression in LV-miR-Neg tumors. $*p < 0.05$.

precursors, respectively (Fig. 5B). Interestingly, *let-7* levels in transfected Capan-1 cells were similar to those in normal pancreatic cells.

We examined the transfected cells for alteration in cell proliferation. As shown in Fig. 6A, *let-7* expression in Capan-1 cells resulted in reduced *in vitro* cell confluence. We quantified the extent of the *let-7* antiproliferative effect. As shown in Fig. 6B, both plasmid-encoding and synthetic *let-7* microRNAs strongly inhibit Capan-1 cell proliferation, as compared with control-transfected cells ($-52.5 \pm 12.8\%$ and $-48 \pm 3\%$, respectively; $p < 0.001$). We further studied *let-7* function in PDAC-derived cells, by analyzing K-Ras protein expression, a canonical *let-7* target (Johnson *et al.*, 2005) (Fig. 6C). We found that K-Ras expression and MAPK phosphorylation, a downstream effector of K-Ras, are decreased in Capan-1 cells after *let-7* transfection ($-59 \pm 17\%$ and $-45 \pm 18\%$, respectively; $p < 0.05$). Thus, these data demonstrate that restoring *let-7* expression in PDAC-derived cell lines strongly inhibits cell proliferation, K-Ras expression, and MAPK activation.

Restoring *let-7* expression in PDAC tumors

We tested whether *let-7* transfection could inhibit *in vivo* PDAC tumor progression. Subcutaneous Capan-1 xenografts

were established in athymic mice as an ectopic model of PDAC (Carrere *et al.*, 2005; Cordelier *et al.*, 2007). Fourteen days after tumor engraftment, PEI-DNA complexes or synthetic microRNA precursors were *in vivo* transferred into subcutaneous Capan-1 pancreatic tumors. Tumor growth was measured every 2 to 5 days, up to 14 days after gene transfer. Tumor analyses demonstrated detectable *in vivo* plasmid-driven marker gene expression and Cy3-labeled synthetic control microRNA detection up to 7 days after transfer (Fig. 7A and B). Again, transfection efficiency was higher with synthetic microRNAs. However, neither psiSTRIKE(Let-7) (Fig. 7C) nor *let-7* precursor microRNA transfection (Fig. 7D) delayed tumor progression. In addition, no statistical difference in tumor weight or in tumor cell proliferation (assayed by Ki-67 labeling; data not shown) was found in response to *let-7* overexpression.

To ensure that the absence of effect of *let-7* overexpression was not due to low *in vivo* transfection efficiency, we generated a stable Capan-1 cell line overexpressing *let-7* microRNA (LV-miR-Let-7), using lentiviral transduction. As control, we also established a stable Capan-1 cell line overexpressing negative control microRNA (LV-miR-Neg). We determined by FACS analysis that more than 90% of the cell population was transduced (Fig. 8A). We also verified that

the LV-miR-Let-7 cell line overexpressed *let-7* microRNA (Fig. 8B). As expected, we observed that overexpression of *let-7* microRNA reduces the viability of the stable Capan-1 cell line (Fig. 8C).

Further, to determine the effect of stable overexpression of *let-7* microRNA on tumor progression, LV-miR-Let-7 and LV-miR-Neg Capan-1 cells were injected subcutaneously into athymic mice. Seven days after inoculation, tumor growth was measured every 3–4 days until day 27 (Fig. 8D). These measurements revealed that *let-7* overexpression did not delay *in vivo* tumor progression, although overexpression of *let-7* microRNA is still present in tumors 27 days after inoculation (Fig. 8E).

Altogether, these results demonstrate that whereas *let-7* microRNA potentially inhibits pancreatic cancer cell proliferation *in vitro*, *let-7* microRNA gene transfer or stable overexpression fails to impede *in vivo* tumor growth.

Discussion

MicroRNA alterations have been linked to the initiation and progression of cancer (Bandres *et al.*, 2007). MicroRNA expression was further associated with diagnosis, staging, prognosis, and response to treatment (Cummins and Velculescu, 2006). Pioneering studies described *let-7* as a negative regulator of the oncogenic family of Ras guanosine triphosphatases in both *Caenorhabditis elegans* and human tumor cell lines (Johnson *et al.*, 2005). Later, deregulation of *let-7* expression was reported in several cancers, suggesting that *let-7* may act as a tumor suppressor (Torrison *et al.*, 2007). The broad changes in microRNA profiles at late stages of PDAC have been reported by several independent groups (Bloomston *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Szafranska *et al.*, 2007). Hahn and colleagues found that the ratio of miR-196 and miR-217 expression provides a reliable index to identify diseased pancreatic tissues (Szafranska *et al.*, 2007, 2008). Moreover, Bloomston and colleagues demonstrated that few microRNAs can differentiate PDAC from chronic pancreatitis or predict poor survival (Bloomston *et al.*, 2007).

We focused on *let-7* because this microRNA targets *K-ras* (Johnson *et al.*, 2005), a key oncogene in PDAC carcinogenesis (Costentin *et al.*, 2002). Using quantitative RT-PCR (qRT-PCR), we found that *let-7* expression is strongly inhibited in PDAC samples as compared with adjacent tissue to the tumor. These findings are comforted by two independent studies, which reported a significant downregulation of *let-7* microRNA in PDAC as determined by microarray analyses (Bloomston *et al.*, 2007; Szafranska *et al.*, 2007). However, in these studies, *let-7* microRNA was not one of the most differentially expressed microRNAs between PDAC, chronic pancreatitis, and normal cancer. Therefore, its expression was not further studied by qRT-PCR.

However, we provide here for the first time a comprehensive examination of the molecular anatomy of cells in tissue sections expressing *let-7*. Because conventional *in situ* hybridization was not sensitive enough to detect *let-7* in our samples (data not shown), we devised a new reverse transcription *in situ* PCR-based approach for *let-7* detection in tissue sections. We confirmed that *let-7* is less abundant in cancer and stromal cells, when pancreatic acini adjacent to the tumor expressed high levels of this microRNA. We measured

let-7 expression in 70 sections of proven, resected PDAC from stage I to IV. We found that *let-7* expression negatively correlates with pathology, differentiation, and stage disease. We also quantified *let-7* expression in EUS-FNA material. We confirmed *let-7* loss of expression in PDAC, and demonstrated the feasibility of using microRNAs as potential molecular markers in routine clinical practice for the diagnosis of patients ineligible for surgery. During the redaction of this manuscript, Szafranska and colleagues demonstrated that FNA material permitted microRNA detection (Szafranska *et al.*, 2008). Because of its invasive nature, FNA is not likely to be used for PDAC detection. However, screening high-risk individuals, establishing a prognosis, and predicting the response to treatment in the numerous cases in which the tumor is not operable may be achieved by such a procedure. Because we found that *let-7* expression is lost in poorly differentiated late-stage disease, detectable *let-7* microRNA expression in EUS-FNA material may be of potential interest to select patients amenable for further management.

Reasons for the loss of *let-7* expression in PDAC samples remain unknown. MicroRNAs are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers (Calin *et al.*, 2004). The *let-7a* gene is hosted by chromosome 9q12, which is not frequently lost in PDAC (Kern, 2000) or in the PDAC-derived cell lines used in this study (data not shown). MicroRNA expression can be controlled by epigenetic alterations such as DNA hypermethylation and histone modification in human cancer cells (Weber *et al.*, 2007). *let-7a-3*, a member of the *let-7* microRNA family, is slightly methylated in normal human tissues but hypomethylated in some lung adenocarcinomas (Brueckner *et al.*, 2007). Studies are underway to elucidate whether epigenetic modifications are responsible for *let-7* repression in PDAC samples.

Previous work demonstrated that *let-7* may directly control lung cancer and liver cancer-derived cell proliferation by negatively regulating the human *K-ras* gene (Johnson *et al.*, 2005, 2007). Because activated *K-ras* is a key oncogene in PDAC, these previous findings strongly suggest that *let-7* could be a candidate to inhibit PDAC proliferation. In this work, we demonstrate that restoring *let-7* expression strongly affects the proliferation of a PDAC-derived cell line. This effect is independent of apoptosis induction, as previously demonstrated (our personal observation; and see Johnson *et al.*, 2007). In addition, *let-7* expression does not alter cell cycle progression of PDAC-derived cells (data not shown). We demonstrated here for the first time that *let-7* targets *K-ras* in PDAC-derived cell lines. Consequently, MAPK activation was strongly impaired in PDAC-derived cells expressing *let-7*. These experiments strongly suggest that *let-7* could be a valuable tool to impair PDAC progression. Efforts have been made to target *K-ras* as a therapeutic option to treat cancer, using either ribozymes, RNA interference (RNAi), or farnesyltransferase inhibitors such as R115777 (Fleming *et al.*, 2005; Cengel *et al.*, 2006). However, R115777 was demonstrated to be ineffective as monotherapy in advanced PDAC in a phase 2 trial (Macdonald *et al.*, 2005).

Considering the data presented herein, we believe that restoring endogenous molecules known to regulate multiple oncogenic pathways, such as *let-7* microRNA, will be a valuable tool in interventions aimed at treating PDAC. We demonstrated that delivering either plasmid-driven genes or

synthetic oligonucleotides into tumors successfully inhibited PDAC progression *in vivo*, despite a low transfection efficiency (Carrere *et al.*, 2005). Unfortunately, we failed to antagonize *in vivo* pancreatic tumor growth by the same approach used to deliver *let-7*. Such a discrepancy may be due, at least in part, to the molecule itself, and/or to the delivery method. *In vitro*, we found that *let-7* slows cancer cell proliferation without affecting cell cycle progression or inducing cell death by apoptosis. The lack of therapeutic efficacy in the intratumoral administration of *let-7* may reflect the absence of apoptosis induction and, consequently, of a strong antitumoral bystander effect essential for the inhibition of pancreatic tumor progression. In contrast, the use of microRNAs as potentially novel therapeutic targets *in vivo* remains trivial. Numerous groups have demonstrated the inhibition of microRNA function through antisense and microRNAs sponges ("antagomiRs"; Marquez and McCaffrey, 2008). However, efficient and specific delivery of these molecules either systemically or locally still limits the application of antagomiRs. Manipulation of microRNA levels still has therapeutic benefits to fight cancer. Si and colleagues demonstrated that the proliferation of breast cancer-derived cells treated *ex vivo* with oligonucleotide complementary to miR-21 was inhibited after injection into mammary pads of female nude mice (Si *et al.*, 2007). In the same *ex vivo* settings, miR-29 was used to normalize the epigenetic status of non-small-cell lung cancer (NSCLC), and to alter tumor progression *in vivo* (Fabbri *et al.*, 2007). *Let-7g*, introduced *in vitro* into cancer cells by lentiviral vectors, was demonstrated to inhibit NSCLC tumor initiation and development (Kumar *et al.*, 2008). Although these models are fairly artificial, these reports demonstrate that modulation of microRNA can inhibit tumor growth.

Progress has been made for the delivery of microRNA into tumors in preclinical settings. MiR-34a transiently inhibits human colon cancer tumor progression when administered with atelocollagen for drug delivery (Tazawa *et al.*, 2007). Using an established orthotopic mouse lung cancer model, Esquela-Kerscher and colleagues showed that intranasal *let-7* administration reduces tumor formation *in vivo* in the lungs of animals expressing a G12D activating mutation for the *K-ras* oncogene (Esquela-Kerscher *et al.*, 2008). We demonstrated that viral vectors, such as simian virus 40 (SV40) (Cordelier *et al.*, 2007), are efficient for *in vivo* gene delivery into PDAC tumors. Clearly, these well-characterized vectors, together with lentiviral vectors, could be used in future to introduce mature microRNAs into PDAC-derived cells, to inhibit exponential *in vitro* and *in vivo* cell proliferation.

Acknowledgments

The authors thank Jean-José Maoret (molecular biology facility, IFR105, Toulouse, France) for expertise in RNA detection and quantification, and the BSL-3 facility for vector production (BiVIC platform, IFR150, Toulouse, France). Tumor samples were obtained through the Department of Pathology and the Tumor Banks of CHU de Bordeaux, CHU de Toulouse and Cancéropôle Grand Sud-Ouest (France). This work was supported by grants from INSERM, Région Midi-Pyrénées, the Association pour la Recherche contre le Cancer, and Cancéropôle Grand Sud-Ouest. J.T. was funded by the Institut National du Cancer and the Ligue Nationale contre le Cancer.

Author Disclosure Statement

The authors declare no competing interests.

References

- Bandres, E., Agirre, X., Ramirez, N., Zarate, R., and Garcia-Foncillas, J. (2007). MicroRNAs as cancer players: Potential clinical and biological effects. *DNA Cell Biol.* 26, 273–282.
- Bloomston, M., Frankel, W.L., Petrocca, F., Volinia, S., Alder, H., Hagan, J.P., Liu, C.G., Bhatt, D., Taccioli, C., and Croce, C.M. (2007). MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 297, 1901–1908.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H., and Lyko, F. (2007). The human *let-7a-3* locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res.* 67, 1419–1423.
- Buscail, L., Cambillau, C., Seva, C., Scemama, J.L., de Neef, P., Robberecht, P., Christophe, J., Susini, C., and Vaysse, N. (1992). Stimulation of rat pancreatic tumoral AR4-2J cell proliferation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *Gastroenterology* 103, 1002–1008.
- Buscail, L., Faure, P., Bournet, B., Selves, J., and Escourrou, J. (2006). Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic diseases. *Pancreatolgy* 6, 7–16.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C.M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2999–3004.
- Carrere, N., Vernejoul, F., Souque, A., Asnacios, A., Vaysse, N., Pradayrol, L., Susini, C., Buscail, L., and Cordelier, P. (2005). Characterization of the bystander effect of somatostatin receptor sst2 after *in vivo* gene transfer into human pancreatic cancer cells. *Hum. Gene Ther.* 16, 1175–1193.
- Cengel, K.A., Deutsch, E., Stephens, T.C., Voong, K.R., Kao, G.D., and Bernhard, E.J. (2006). Radiosensitizing effects of the prenyltransferase inhibitor AZD3409 against RAS mutated cell lines. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1206–1210.
- Cordelier, P., Morse, B., and Strayer, D.S. (2003). Targeting CCR5 with siRNAs: Using recombinant SV40-derived vectors to protect macrophages and microglia from R5-tropic HIV. *Oligonucleotides* 13, 281–294.
- Cordelier, P., Bienvenu, C., Lulka, H., Marrache, F., Bouisson, M., Openheim, A., Strayer, D.S., Vaysse, N., Pradayrol, L., and Buscail, L. (2007). Replication-deficient rSV40 mediate pancreatic gene transfer and long-term inhibition of tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 14, 19–29.
- Costentin, L., Pages, P., Bouisson, M., Berthelemy, P., Buscail, L., Escourrou, J., Pradayrol, L., and Vaysse, N. (2002). Frequent deletions of tumor suppressor genes in pure pancreatic juice from patients with tumoral or nontumoral pancreatic diseases. *Pancreatolgy* 2, 17–25.
- Cummins, J.M., and Velculescu, V.E. (2006). Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 25, 6220–6227.
- Engels, B.M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163–6169.
- Esquela-Kerscher, A., Trang, P., Wiggins, J.F., Patrawala, L., Cheng, A., Ford, L., Weidhaas, J.B., Brown, D., Bader, A.G., and Slack, F.J. (2008). The *let-7* microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 7, 759–764.

- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C.D., Chan, K.K., Marcucci, G., Calin, G.A., Huebner, K., and Croce, C.M. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15805–15810.
- Fleming, J.B., Shen, G.L., Holloway, S.E., Davis, M., and Brekken, R.A. (2005). Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: Justification for K-ras-directed therapy. *Mol. Cancer Res.* 3, 413–423.
- Gregory, R.I., and Shiekhattar, R. (2005). MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* 65, 3509–3512.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M.J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* 57, 43–66.
- Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., and Slack, F.J. (2007). The *let-7* microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 67, 7713–7722.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* 120, 635–647.
- Kern, S.E. (2000). Molecular genetic alterations in ductal pancreatic adenocarcinomas. *Med Clin North Am* 84, 691–695, xi.
- Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the *let-7* microRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3903–3908.
- Laurell, H., Bouisson, M., Berthelemy, P., Rochaix, P., Dejean, S., Besse, P., Susini, C., Pradayrol, L., Vaysse, N., and Buscail, L. (2006). Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol* 12, 3344–3351.
- Lee, E.J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G.J., Lemer, M.R., Frankel, W.L., Morgan, D.L., Postier, R.G., Brackett, D.J., and Schmittgen, T.D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120, 1046–1054.
- Lee, K.M., Nguyen, C., Ulrich, A.B., Pour, P.M., and Ouellette, M.M. (2003). Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1038–1044.
- Lee, Y.S., and Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA *let-7* represses the *HMG2* oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025–1030.
- Macdonald, J.S., McCoy, S., Whitehead, R.P., Iqbal, S., Wade, J.L., III, Giguere, J.K., and Abbruzzese, J.L. (2005). A phase II study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in pancreatic cancer: A Southwest Oncology Group (SWOG 9924) study. *Invest. New Drugs* 23, 485–487.
- Marquez, R.T., and McCaffrey, A.P. (2008). Advances in microRNAs: Implications for gene therapists. *Hum. Gene Ther.* 19, 27–38.
- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between *let-7* and *Hmga2* enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576–1579.
- Morris, J.P.T., and McManus, M.T. (2005). Slowing down the Ras lane: miRNAs as tumor suppressors? *Sci STKE* 2005, pe41.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA *let-7a* down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 67, 9762–9770.
- Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, Y.Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26, 2799–2803.
- Sirach, E., Bureau, C., Peron, J.M., Pradayrol, L., Vinel, J.P., Buscail, L., and Cordelier, P. (2007). KLF6 transcription factor protects hepatocellular carcinoma-derived cells from apoptosis. *Cell Death Differ.* 14, 1202–1210.
- Steg, A., Wang, W., Blanquicett, C., Grunda, J.M., Eltoun, I.A., Wang, K., Buchsbaum, D.J., Vickers, S.M., Russo, S., Diasio, R.B., Frost, A.R., Lobuglio, A.F., Grizzle, W.E., and Johnson, M.R. (2006). Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array: Application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *J. Mol. Diagn.* 8, 76–83.
- Szafarska, A.E., Davison, T.S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., and Hahn, S.A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26, 4442–4452.
- Szafarska, A.E., Doleshal, M., Edmunds, H.S., Gordon, S., Luttes, J., Munding, J.B., Barth, R.J., Jr., Gutmann, E.J., Suriawinata, A.A., Pipas, J.M., Tannapfel, A., Korc, M., Hahn, S.A., Labourier, E., and Tsongalis, G.J. (2008). Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin. Chem.* 54, 1716–1724.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 64, 3753–3756.
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., and Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15472–15477.
- Torrisani, J., Bouisson, M., Puente, E., Capella, G., Laurent-Puig, P., Berger, A., Vaysse, N., Susini, C., and Buscail, L. (2001). Transcription of *SST2* somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology* 120, 200–209.
- Torrisani, J., Parmentier, L., Buscail, L., and Cordelier, P. (2007). Enjoy the silence: The story of *let-7* microRNA and cancer. *Curr. Genomics* 8, 229–233.
- Weber, B., Stresmann, C., Brueckner, B., and Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 6, 1001–1005.

Address correspondence to:
Dr. Pierre Cordelier
INSERM U1858, I2MR
CHU Rangueil
1, avenue Jean Poulhès
BP 84225
31432 Toulouse Cedex 04, France

E-mail: pierre.cordelier@inserm.fr

Received for publication August 25, 2008;
accepted after revision March 26, 2009.

Published online: May 26, 2009.

II. ANNEXE ARTICLE 2

LETTER TO THE EDITOR

KRAS Mutations and Their Correlation With Survival of Patients With Advanced Pancreatic Cancer

AQ1

To the Editor:

Herein, we describe our previously unpublished data that could strengthen the results presented within a recent original article written by Oliveira-Cunha et al¹ and published in *Pancreas*. In this interesting article, the authors report the molecular analysis of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (exons 18, 19, 20, and 21) and *KRAS* (codons 12, 13, and 61) gene mutations in pancreatic cancer tissues taken from 100 patients, which included 43 ductal adenocarcinomas and 22 ampullary adenocarcinomas. They concluded that *EGFR* somatic mutations are rare in pancreaticobiliary malignancies. They also concluded that *KRAS* mutations did not influence or correlate with patient survival, whatever the status of the tumor (ie, resectable or locally advanced/metastatic).¹

AQ2

We investigated the role of *KRAS* mutations, sampled by fine-needle aspiration using endoscopic ultrasound, for the differential diagnosis of pancreatic cancer. Codons 12 and 13 *KRAS* mutations were analyzed (RFLP and sequencing) in 129 patients (68 men, 61 women; mean [SD] age, 66.1 [16] years) with histologically proven pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).² The patients were categorized as either having locally advanced (n = 50) or metastatic tumors (n = 79). These 2 groups were comparable in terms of sex, age, and tumor localization. After histological confirmation of PDAC and analysis of *KRAS* mutations, the patients were routinely managed according to standard care and the French national guidelines for digestive cancers. Patients were then allocated to best supportive care (BSC) (n = 31) or to first-line gemcitabine-based chemotherapy (n = 98), either gemcitabine alone (76%) or gemcitabine plus other drugs such as oxaliplatin or erlotinib (24%). Second- or third-line chemotherapy protocols were given to, respectively, 17 and 5 patients. All patients were followed up monthly until death. After statistical analyses, no difference was found in terms of 1-year and overall median survival times when *KRAS* status was assessed between the 2 subgroups (locally advanced vs metastatic). Overall, survival rates of patients

treated with chemotherapy or BSC were also not influenced by *KRAS* status (Table 1).

Because the RAS-mediated signaling pathway links downstream growth factors, especially epidermal growth factor (EGF), studies conducted on colon and lung cancers show that *KRAS* mutations and *EGFR* expression can indicate a poor prognosis. However, because of the specific problems encountered with PDAC, these results are ambivalent for this disorder. Two recent studies have reported *KRAS* mutations in advanced PDAC, although no correlation was found between *KRAS* mutations and patient survival.^{3,4} Conversely, 3 other published studies (1 that included patients with resected PDAC and 2 that included mixed populations with resected and locally advanced/metastatic PDAC) suggest that the presence of *KRAS* mutations in tumor tissues has a significant adverse impact on median survival time.^{5,6,7}

The purpose of this letter is not to provide a comprehensive meta-analysis but to report the major differences between these reports. Overall, (1) the number of patients ranged from 50 to 129; (2) the rate of *KRAS* mutations found in samples varied between 42% and 67% (which is less than generally reported); and (3) the populations included mixed populations of resected and nonresectable advanced

and/or metastatic PDAC. Therefore, it is still difficult to conclude that the presence of *KRAS* mutations influences or does not influence the prognosis of advanced PDAC. To gain further insights and to obtain a definitive conclusion, investigations on a larger cohort of similar patients (to allow strong multivariate analysis) are needed.

In addition, our results show that activation of *KRAS* intracellular pathways by mutations did not influence the results of the gemcitabine-based treatments. Two recent articles reported similar results for patients receiving first-line gemcitabine treatment.^{3,5} However, Kim et al⁵ demonstrated that wild-type *KRAS* status was a marker that could predict improved survival in advanced PDAC patients who had received erlotinib plus gemcitabine as a first-line treatment. Besides the possible (but not proven) role of *KRAS* mutation analysis to provide a prognosis for PDAC, we and others suggest that detection of *KRAS* gene mutations might be useful in supplementing histocytology when there is an inconclusive or indeterminate endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy.

The presence of *KRAS* mutations is evocative of malignancy. Conversely, wild-type *KRAS* status could be evocative of a benign lesion, especially when there

TABLE 1. *KRAS* Status and Survival of Patients With Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer Who Received Either First-Line Chemotherapy With Gemcitabine or BSC

Patients	KRAS Status	n (%)	Overall 1-Year Survival Rates, %	Median Survival Time (Months)	P
Whole population	Whole	129			
	Mutated	86 (67)	27.4	7	0.75
	Wild-type	43 (33)	20	9	
Locally-advanced	Whole	50 (39)			
	Mutated	33 (67)	31.3	9	0.07
	Wild-type	17 (33)	6.3	7	
Metastatic	Whole	79 (61)			
	Mutated	52 (66)	25.5	5	0.6
	Wild-type	27 (34)	28.6	9	
Chemotherapy	Whole	98 (76)			
	Mutated	63 (64)	32.3	10	0.76
	Wild-type	35 (36)	25	9	
BSC	Whole	31 (24)			
	Mutated	22 (71)	13.6	3	0.55
	Wild-type	9 (19)	0	3	

Overall 1-year and median survival rates were analyzed by χ^2 , Fisher exact, and log-rank tests.

is clinical and radiological presentation of pseudotumoral chronic pancreatitis or autoimmune pancreatitis.^{2,8,9,10} Because *KRAS* analysis is now widely available, owing to its use as a predictive marker for anti-EGFR therapy in colon cancer, this diagnostic tool could also be applied to help clinicians manage solid pancreatic masses.

ACKNOWLEDGMENT

The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

AQ3

Barbara Bournet, MD

Department of Gastroenterology
and INSERM U1037
University Hospital Center Rangueil-Larrey
CHU of Toulouse
University Paul Sabatier
Toulouse, France

Fabrice Muscari, MD

Department of Digestive Surgery
University Hospital Center Rangueil-Larrey
CHU of Toulouse
University Paul Sabatier
Toulouse, France

Rosine Guimbaud, MD

Department of Oncology
University Hospital Center Rangueil-Larrey
CHU of Toulouse
University Paul Sabatier
Toulouse, France

Pierre Cordelier, PhD

INSERM U1037
University Hospital Center Rangueil-Larrey
University Paul Sabatier
Toulouse, France

Louis Buscail, MD, PhD

Department of Gastroenterology
and INSERM U1037
University Hospital Center Rangueil-Larrey
CHU of Toulouse
University Paul Sabatier
Toulouse, France
Buscail.L@chu-toulouse.fr

REFERENCES

- Oliveira-Cunha M, Hadfield KD, Siriwardena AK, et al. EGFR and KRAS mutational analysis and their correlation to survival in pancreatic and periampullary cancer. *Pancreas*. 2012;41:428–434.
- Bournet B, Souque A, Senesse P, et al. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy*. 2009;41:552–557.
- da Cunha Santos G, Dhani N, Tu D, et al. Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3. *Cancer*. 2010;116:5599–5607.
- Kullmann F, Hartmann A, Stöhr R, et al. KRAS mutation in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: results of a multicenter phase II study evaluating efficacy of cetuximab plus gemcitabine/oxaliplatin (GEMOX CET) in first-line therapy. *Oncology*. 2011;81:3–8.
- Kim ST, Lim do H, Jang KT, et al. Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2011;10:1993–1999.
- Franko J, Krasinskas AM, Nikiforova MN, et al. Loss of heterozygosity predicts poor survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2008;12:1664–1673.
- Lee J, Jang KT, Ki CS, et al. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, *EGFR* gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 2007;109:1561–1568.
- Salek C, Minarikova P, Benesova L, et al. Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 2009;29:1803–1810.
- Wang X, Gao J, Ren Y, et al. Detection of *KRAS* gene mutations in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for improving pancreatic cancer diagnosis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:2104–2111.
- Khalid A, Dewitt J, Ohori NP, et al. EUS-FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol*. 2011;11:482–486.

Evaluation of molecular markers for pancreatic adenocarcinoma and chronic calcifying pancreatitis

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer death. In 85% of cases tumors are diagnosed as a locally advanced or a metastatic stage. Consequently, patients are treated in a palliative way with chemotherapy or best supportive cares. In this context, the endoscopic ultrasound (EUS) with fine needle aspiration biopsy (EUS-FNAB) appears as a clinical improvement for the diagnosis and the staging of pancreatic cancer.

Aims of this study were to validate the possibility of DNA and RNA extraction and analysis within samples of pancreatic tissues obtained during EUS-FNAB. To distinguish between pancreatic cancer and chronic pancreatitis we use low-density array technique to evaluate simultaneously expression of 23 genes of interest (chosen from our previous published works or from literature). Moreover, we applied restriction fragment length polymorphism (RFLP) and direct sequencing to analyze *KRAS* mutation within the EUS-FNAB samples.

We included 178 patients with solid pancreatic masses in a French prospective multicenter study. The final diagnosis were pancreatic cancer n=129, chronic pancreatitis n=27, other neoplasms n=16 and benign lesions n=6.

We first demonstrated that the expression of the 18S housekeeping gene is stable and comparable in normal pancreas and pancreatic cancer tissues. Next, we found that eight genes (*S100P*, *PLAT*, *MSLN*, *PLAU*, *MMP11*, *MMP7*, *KRT7* and *KRT17*) were significantly over expressed in pancreatic cancer samples when compared to pseudotumoral chronic pancreatitis (p value ranging from 0.0007 to 0.0215). Linear discriminative analysis identified *S100P*, *PLAT*, *MSLN*, *MMP7*, *KRT7* as highly explicative variables. The analysis of area under the receiver operating curves (values ranging from 0.69 to 0.76) reflected the clinical interest of these markers. In addition, combination of *S100P* and *KRT7* gave better diagnosis performances (area under receiver operating curve 0.81 with sensitivity 81% and specificity 77%) (B. Bournet et al. *Pancreatology*. 2012;12:27-34).

KRAS status analysis was successful in all EUS-FNAB samples. Codon 12 *KRAS* point mutation was found in 66% of pancreatic cancer samples. No case of chronic pancreatitis displayed *KRAS* mutation. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and all overall accuracy of cytopathology alone for diagnosis of pancreatic carcinoma versus chronic pancreatitis were of 83%, 100%, 100%, 56% and 86% respectively. When *KRAS* mutation analysis was combined with cytopathology, these values increased to 88%, 100%, 100%, 63% and 90% respectively (Bournet et al. *Endoscopy* 2009;41:552-57).

In conclusion, we developed during this thesis a potential molecular signature of pancreatic cancer and molecular tools to distinguish to chronic pancreatitis. Thus in the current clinical practice, thanks to technological transfer, we are currently using *KRAS* mutation analysis (allelic discrimination) to improve the diagnosis of pancreatic cancer by EUS-FNAB. Moreover, we also are setting up the determination of *S100P* expression in EUS-FNAB for diagnosis of solid pancreatic masses

AUTEUR : Barbara BOURNET

TITRE : Contribution à l'étude des marqueurs moléculaires de l'adénocarcinome pancréatique et de la pancréatite chronique calcifiante.

DIRECTEUR DE THESE : Pr Louis BUSCAIL

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse le 4 juillet 2013

RESUME :

Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer. Dans 85% des cas les patients porteurs d'un cancer du pancréas ne sont pas opérables. Une confirmation histologique est alors nécessaire. L'échoendoscopie permet alors de réaliser un prélèvement biopsique pour obtenir une preuve anatomopathologique. Cette preuve est apportée dans près de 80% de cas. Néanmoins 20% des prélèvements restent non contributifs. Le but de ce travail était de rechercher la mutation de l'oncogène *KRAS* sur le matériel biopsique prélevé sous échoendoscopie (RFLP suivi de séquençage) pour différencier, en cas de syndrome de masse pancréatique, un cancer du pancréas (mutation *KRAS*, codon 12) d'une pancréatite chronique pseudo tumorale (*KRAS* sauvage). Nous avons pu établir que la présence de la mutation de *KRAS* au sein des masses pancréatiques était hautement évocatrice de malignité. En cas de pancréatite chronique la présence d'un *KRAS* sauvage est hautement évocatrice de bénignité. Le deuxième objectif était d'évaluer, la faisabilité et l'utilité clinique de la technique de TaqMan low-density array pour aider au diagnostic de cancer du pancréas par la détermination de la surexpression ou non de gènes cibles. Nous avons pu établir une signature moléculaire de l'adénocarcinome pancréatique (gènes codant des protéines de l'invasion: *MMP11*, *MMP7*, *S100P*, *S100A4*, *PLAU*, *PLAT*) permettant de le différencier de la pancréatite chronique pseudo tumorale. Suite à ce travail, la recherche de la mutation de l'oncogène *KRAS* est réalisée en pratique clinique chez patients porteurs d'un syndrome masse pancréatique afin d'améliorer le diagnostic positif et différentiel du cancer du pancréas

MOTS-CLES : adénocarcinome pancréatique, pancréatite chronique calcifiante, mutation de l'oncogène *KRAS*, bio marqueurs moléculaires, transcriptomique, échoendoscopie avec cytoponction.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : physiopathologie humaine

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : INSERM U1037 CRCT (centre de recherche du cancer de Toulouse) équipe 10, bâtiment L3, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4