



HAL
open science

La médecine de précision dans le cancer du pancréas

Alice Boilève

► **To cite this version:**

Alice Boilève. La médecine de précision dans le cancer du pancréas. Cancer. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASL013 . tel-04504990

HAL Id: tel-04504990

<https://theses.hal.science/tel-04504990>

Submitted on 14 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

La médecine de précision dans le cancer du pancréas

Precision medicine in pancreatic cancer

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, Cancérologie : biologie – médecine – santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Sciences du Cancer
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Dynamique des Cellules Tumorales**,
(Université Paris-Saclay, Inserm, Institut Gustave Roussy),
sous la direction de **Fanny JAULIN**, directrice de recherche, et la co-direction de
Michel DUCREUX, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 01 mars 2024, par

Alice BOILÈVE

Composition du Jury

(avec voix délibérative)

Pierre LAURENT-PUIG PU-PH, Directeur de recherche, Université Paris Cité (Paris)	Président
Nelson DUSETTI Directeur de recherche, Centre de recherche en Cancérologie (Marseille)	Rapporteur & Examineur
Julien EDELIN PU-PH, Oncologie médicale, Centre Eugène Marquis (Rennes)	Rapporteur & Examineur
Cindy NEUZILLET PU-PH, Gastro-entérologie, Institut Curie (Saint-Cloud)	Examinatrice
Christelle DE LA FOUCHARDIERE Praticienne spécialiste des centres de lutttes contre le cancer, Institut Paoli Calmette (Marseille)	Examinatrice
Audrey VINCENT Chargée de recherche, OncoLILLE (Lille)	Examinatrice

(sans voix délibérative)

Fanny JAULIN Directrice de recherche, Gustave Roussy (Villejuif)	Directrice de thèse
Michel DUCREUX PU-PH, Oncologie médicale, Gustave Roussy (Villejuif)	Co-directeur de thèse

Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles.

Marie Curie

Remerciements

Tout d'abord, un très grand merci à Fanny pour m'avoir acceptée au sein de son équipe, et de m'avoir donné l'opportunité de ce beau projet qui me passionne et me motive. Cette thèse, à l'interface entre la recherche fondamentale, translationnelle et clinique était faite sur mesure : un alignement des planètes ! Merci également à M. Ducreux de m'avoir soutenue en tant que co-directeur de thèse, mais également en tant que mentor depuis plusieurs années. J'espère me montrer digne de votre soutien à tous les deux !

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de participer à l'aboutissement de ce travail. Je vous remercie toutes et tous d'avoir pris le temps de venir juger mon travail et j'espère que nous pourrons collaborer dans le futur pour d'autres projets.

Je remercie également Jacques Mathieu, coordinateur scientifique du laboratoire qui a toujours été d'une aide pertinente, pragmatique, et sympathique. Un merci tout particulier à Jérôme et Sabrina, membres fondateurs de la « team organoïdes », qui m'ont reformée à la culture des organoïdes (même si « c'est comme le vélo, ça ne s'oublie pas ») et qui m'ont aidée dans tous les moments compliqués, toujours avec bonne humeur et humour. Merci également à Negaar, qui m'a rejoint sur le projet pancréas, et a permis que cette cohorte voie le jour si rapidement, avec le même sentiment « maternel » envers « nos » organoïdes... Un merci plein d'affection aux autres membres de l'équipe avec qui j'ai pu partager de beaux moments : Emilie, Clémence, Joël, Emmanuel, Aurore, Nicolas, Max, Diane-Laure, Elise, Florent, Raphaël, Ali, JB et aussi aux membres de l'équipe Montagnac, Khaled et Schauer bien-sûr.

Je remercie aussi tous les oncologues du comité digestif de Gustave Roussy, sans qui le recrutement des patients et le projet n'aurait pas été possible : Cristina, Antoine, Valérie, Marine, Antony, Thomas notamment, et aussi Max, Elena, Simona et tous les autres. Merci aux « anapath », Mohamed et Peggy pour leur aide et leur expertise, et pour m'avoir accueillie lors de mon dernier semestre d'internat (et d'avoir eu la patience de me faire découvrir leur spécialité). Merci à Claudio, Maud, et à toute leur super équipe de la médecine de précision pour leur aide dans l'organisation des biopsies. Merci aux « Ristes » pour leur implication (car sans tissu, pas d'organoïdes...).

Merci à tous mes amis « de médecine » que je n'ai pas cités avant : Marc, Adrien, Natacha, Matthieu, Marina, etc. Je remercie aussi mes amies de longue date, Hermine, Jeanne, Sabine et Améthyste, pour leur amitié sans faille qui dure depuis la prépa.

Enfin, merci à mes parents pour leur soutien de toujours : enfin, la « vraie » thèse ! et à mes frères et sœur Victor, Félix et Juliette, ainsi qu'à leurs conjoint-e-s Laëtitia, Claire et Antoine.

Et pour conclure cette trop longue page de remerciements, merci à toi Mathieu pour ta présence et ton soutien au quotidien. Tu n'aimes pas les remerciements, mais j'espère que tu iras jusqu'au bout de cette page pour le lire !

Table des matières

INTRODUCTION	17
I. Du physiologique au pathologique	18
A. Le pancréas physiologique	18
1. Anatomie et organisation du pancréas	18
i) Anatomie du pancréas	18
ii) Organisation tissulaire du pancréas	19
iii) Organisation de la muqueuse des canaux pancréatiques	20
(1) Définition d'un épithélium.....	20
(2) Epithélium des canaux pancréatiques	21
2. Fonctions du pancréas	22
i) Le pancréas endocrine	22
ii) Le pancréas exocrine	22
B. Physiopathologie du cancer du pancréas	23
1. Epidémiologie des cancers du pancréas	23
i) Incidence et prévalence	23
ii) Facteurs de risque	26
2. Lésions précancéreuses du pancréas	27
i) Néoplasies pancréatiques intra-épithéliales	28
ii) Tumeurs intra-canales papillaires et mucineuses du pancréas.....	29
iii) Cystadénome mucineux	30
3. Caractérisation histologique des cancers du pancréas	31
i) Adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC)	31
ii) Marqueurs immunohistochimiques du PDAC	33
iii) Autres sous-types de PDAC plus rares.....	34
(1) Carcinome adénosquameux	34
(2) Carcinome anaplasique ou indifférencié	34
(3) Carcinome mucineux non kystique.....	34
iv) Caractéristiques du stroma	35
4. Méta-classification moléculaire des PDAC	36
C. Dissémination métastatique du PDAC	39
1. Stadification clinique des PDAC.....	39
i) Critères NCCN	39
ii) TNM	40
2. Intermédiaires tumoraux et stratégies de dissémination	41
i) Dissémination de cellules isolées	41
(1) La transition Epithélio-Mésenchymateuse	41
(2) Migration de cellules isolées	43
ii) Modes de migration collectifs	43
iii) Un nouveau mode de dissémination collective : les TSIP.....	44
II. Stratégies thérapeutiques	47
A. Caractéristiques cliniques des patients	47
1. Mode de découverte	47
1. Facteurs pronostics	48
B. Traitements standards des patients avec un PDAC	49
1. Traitements systémiques : chimiothérapies	49
i) Les molécules	49

ii) Les protocoles	51
2. Prise en charge aux stades localisés.....	52
3. Stades borderline et localement avancés	53
4. Stades métastatiques.....	54
i) Première ligne	54
ii) Maintenance	55
iii) Lignes ultérieures	56
5. Thérapies ciblées.....	57
C. Des molécules d'avenir, les inhibiteurs de KRAS.....	59
1. KRAS dans le cancer du pancréas.....	59
i) La voie RAS	59
ii) Type de mutation KRAS.....	61
2. Inhibition de KRAS en clinique	62
i) Les inhibiteurs de KRAS _{G12C} , une révolution dans le paysage thérapeutique.....	62
ii) Résultats en clinique	63
iii) Combinaisons de thérapies	65
iv) Mécanismes de résistance aux anti-KRAS _{G12C}	66
3. Autres stratégies d'inhibition de KRAS.....	67
i) Le MRTX1133, un inhibiteur spécifique de KRAS _{G12D}	67
(1) Préclinique	67
(2) Perspectives de combinaison	68
ii) Autres classes thérapeutiques anti-KRAS.....	70
(1) Inhibiteurs pan-KRAS	71
(2) Inhibition indirecte	74
III. Les organoïdes, des avatars de la tumeur.....	76
A. Mise au point des organoïdes	76
1. Développement d'organoïdes dérivés de tumeur	76
i) Les organoïdes, définition et principes du modèle	76
ii) Type de tumeurs cultivables en organoïdes.....	78
iii) Organoïdes de PDAC.....	79
2. Corrélation phénotypique et moléculaire des organoïdes avec leur tumeur d'origine.....	80
i) Corrélation phénotypique	80
ii) Génomique.....	81
iii) Transcriptomique	82
iv) Applications des organoïdes.....	82
3. Limites du modèle.....	83
i) Intégration du stroma	83
ii) Interaction avec cellules immunitaires.....	84
iii) Interaction avec le microbiote	84
B. Médecine fonctionnelle et organoïdes	85
1. Principes de la médecine de précision fonctionnelle.....	85
i) Premières approches de médecine de précision fonctionnelle	86
ii) Méthodologie des cribles pharmacologiques	87
2. Corrélation des organoïdes avec la clinique.....	88
i) Dans le PDAC	88
ii) Dans les autres types de tumeurs	89
C. La médecine de précision fonctionnelle en pratique.....	91
1. Essais prospectifs	91
2. ORGANOTREAT-01	91
3. Enjeux et difficultés de la MPF dans le PDAC.....	93
Objectifs de la thèse	94
RESULTATS.....	97

I.	Organoïdes et médecine de précision fonctionnelle dans le cancer du pancréas	98
II.	Les organoïdes en pré-clinique	140
III.	Médecine de précision pour les cancers du pancréas KRAS sauvage	144
IV.	Impact des sous-types de mutation KRAS	155
V.	Etude du phénotype invasif des PDAC	166
	DISCUSSION	197
I.	Etude du phénotype invasif des PDAC	198
II.	Médecine de précision fonctionnelle et cancer du pancréas.....	201
A.	Organoïdes et médecine de précision.....	201
1.	Challenges et critères essentiels pour la MPF.....	203
a)	Origine du matériel tumoral.....	203
b)	Délai d'obtention du chimiogramme	204
c)	Nombre de traitements testés	205
d)	Une méthodologie robuste et standardisée	206
2.	Limites de la médecine de précision fonctionnelle	208
a)	Accès aux médicaments et à la technique	208
b)	Hétérogénéité du PDAC et résistance	210
c)	Challenge du traitement des patients	210
B.	Signatures de sensibilité à l'aide d'organoïdes	212
C.	Perspectives.....	214
1.	Dériver des organoïdes de cellules tumorales circulantes	214
2.	Améliorer le système de score.....	214
3.	Intégrer le stroma aux organoïdes	215
4.	Proposer un essai contrôlé randomisé.....	216
5.	Comparer les tumeurs établies en organoïdes aux non-établies.....	218
II.	Médecine de précision moléculaire et cancer du pancréas.....	220
A.	NGS pour tous dans le PDAC, une évolution nécessaire ?	220
1.	Impact thérapeutique : cibles actionnables	220
2.	Importance du statut KRAS	223
3.	Importance de la RCP moléculaire	224
4.	Vers la biopsie liquide ?.....	225
B.	Challenges et limites du NGS pour tous dans le PDAC.....	226
1.	Bénéfice limité de la médecine de précision dans la vie réelle.....	226
2.	La médecine de précision est-elle possible en France ?.....	227
	Conclusion.....	229
	Bibliographie.....	233

Liste des abbréviations

5-FU : 5-Fluorouracile

ADN : Acide desoxyribonucléique

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ALI : interface air-liquide

AMM : autorisation de mise sur le marché

AUC : aire sous la courbe de réponse aux médicaments

CRC : cancer colorectal

CTB: chemogram tumor board

DDR : DNA damage repair

DPC : duodéno pancréatectomie céphalique

EGF: Epidermal Growth Factor,

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ERRFI1 : ERBB receptor feedback inhibitor 1

ESCAT : ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets

FDA : Food and drug administration

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR: fibroblast growth factor receptors

GATA6 : GATA binding protein 6

GDP : guanosine biphosphate

GMI : growth modulator index

GTP : guanosine triphosphate

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

IC : intervalle de confiance

LDH : lactate deshydrogénase

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MDR : multi-drug resistance

MET: Mesenchymal and Epithelial Transition Factor

MMP : métalloprotéinases matricielles

MMR : MisMatch Repair

MMT: molecularly-matched treatment

MPF : médecine fonctionnelle de précision

MSI : instabilité des microsatellites

NA : non atteint

NTRK: récepteur kinase A de la tropomyosine

PARP : poly-ADP-ribose-polymérase-1

PCR : *polymerase chain reaction*

PD : progression tumorale

PDO : Organoïdes dérivés de patients

PDX : xénogreffes de tumeurs

PROTAC : proteolysis-targeting chimeras

PSC : cellules souches pluripotentes

RAF : rapidly accelerated fibrosarcoma

Score OMS/ECOG : Echelle de l'Organisation Mondiale de la Santé

SG : Survie globale

SHP2 ou *PTPN11*: Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11

SOS1/SOS2 : Salt Overly Sensitive 1/2

SPG : spléno pancréatectomie gauche

SSP : survie sans progression

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TGF β : transforming growth factor β

TIL : lymphocytes infiltrant la tumeur

TNM : système de classification des tumeurs solides

TSIP : Tumor Spheres with Inverted Polarity » ou Sphères Tumorales à Polarité Inversée

Index des figures

- Figure 1: Anatomie du pancréas
- Figure 2: Organisation tissulaire du pancréas sain
- Figure 3: Organisation de l'épithélium des canaux pancréatiques
- Figure 4: Incidence et mortalité des dix principaux types de cancers par sexe, États-Unis, 2023
- Figure 5: Incidence et de la mortalité du PDAC aux Etats-Unis de 2001 à 2020
- Figure 6: Représentation du nombre de nouveaux patients estimés atteints de PDAC
- Figure 7: Poids respectifs des principaux facteurs de risques du PDAC
- Figure 8: Modélisation de la progression histologico-génétique des PDAC
- Figure 9: Coupes histologiques des lésions précancéreuses du PDAC
- Figure 10: Différents aspects histopathologiques de PDAC
- Figure 11: Sous-types moléculaires décrits dans le PDAC
- Figure 12: La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) ou mesenchymato-épithéliale
- Figure 13 : Représentation de la libération d'une TSIP par bourgeonnement
- Figure 14 : Schéma des modes de migration cellulaire
- Figure 15: Stades au diagnostic (A) et survie relative à 5 ans (B) des patients nouvellement diagnostiqué d'un cancer du pancréas aux USA
- Figure 16: Prise en charge du PDAC localisé ou locorégional
- Figure 17: Prise en charge des PDAC au stade métastatique
- Figure 18: Principales évolutions thérapeutiques du PDAC depuis 1994
- Figure 19: Voies de signalisations oncogéniques en aval de *KRAS* et rétrocontrôles
- Figure 20: Domaines du gène et de la protéine *KRAS*
- Figure 21: Pourcentage d'altérations *KRAS* (tumeurs avec prévalence >10%)
- Figure 22: Nombre de patients/prévalence des altérations de *KRAS*
- Figure 23: Mécanismes de contournement des inhibiteurs de *KRAS* via l'activation des formes sauvages (WT) de RAS (*NRAS* et *HRAS*)
- Figure 24: Mécanisme proposé de résistance primaire au MRTX1133
- Figure 25: Avantages et inconvénients des différentes stratégies d'inhibition de *KRAS*
- Figure 26: Culture des organoïdes
- Figure 27: Principales tumeurs digestives cultivables en organoïdes
- Figure 28: Différents modèles de cultures d'organoïdes
- Figure 29: Résultats de la méta-analyse présentant sensibilité et spécificité des organoïdes en corrélation à la clinique
- Figure 30: Principe de l'essai ORGANOTREAT-01
- Figure 31: Principe du test d'inactivation de *KRAS*
- Figure 32 : Expérience de Knock-out de différentes formes de *KRAS*
- Figure 33: Biogenèse des TSIP dans les cancers colorectaux
- Figure 34: Principe des puces avec des canaux adhérents ou non pour étudier la migration collective des cellules
- Figure 35: Miniaturisation du chimiogramme en utilisant des micro-puces
- Figure 36: Principe de l'étude ORGANOTREAT-02P
- Figure 37: Forces et faiblesses des organoïdes pour la MPF
- Figure 38: Courbes de Kaplan-Meier de l'étude de Pishvaian
- Figure 39: Altérations moléculaires actionnables et pourcentages selon le statut *KRAS*
- Figure 40: Principe de la médecine de précision

Index des tableaux

Tableau 1: Critères de résecabilité du PDAC

Tableau 2: Classification TNM selon la 8ème édition de l'AJCC

Tableau 3: Principaux facteurs pronostics dans le PDAC

Tableau 4: données d'efficacité et de tolérance des inhibiteurs de *KRAS*_{G12C} dans le PDAC

Tableau 5: Résultats de combinaison d'inhibiteurs de *KRAS* G12C et d'EGFR dans le cancer colorectal

Tableau 6: Principaux inhibiteurs de *KRAS* en développement (mi-2023)

Tableau 7: Principales études corrélant la réponse des PDO avec la clinique pour le CRC et le PDAC

Tableau 8: Classification ESCAT (2023) dans le cancer du pancréas

INTRODUCTION

I. DU PHYSIOLOGIQUE AU PATHOLOGIQUE

A. LE PANCREAS PHYSIOLOGIQUE

1. Anatomie et organisation du pancréas

i) Anatomie du pancréas

Le pancréas est un organe profond situé à l'arrière de l'estomac en situation rétro-péritonéale, en avant des gros vaisseaux (1–4). Il mesure environ 15 cm de long et est divisé en 4 sections principales: la tête, l'isthme, le corps et la queue (Figure 1). La tête, partie la plus volumineuse, est située à l'intérieur du cadre duodénal. Elle se prolonge à sa partie inférieure pour donner le crochet. L'isthme sépare la tête du corps et est situé en avant de l'axe veineux mésentérico-porte. Le corps est oblique vers le haut et épouse la concavité rachidienne. Enfin la queue continue la direction du corps jusqu'à devenir sous-splénique. D'un point de vue embryologique, le pancréas résulte de la fusion de l'ébauche dorsale (d'où proviennent la partie haute de la tête, le corps et la queue), et de l'ébauche ventrale (qui donne la partie basse de la tête et le crochet) (1–4).

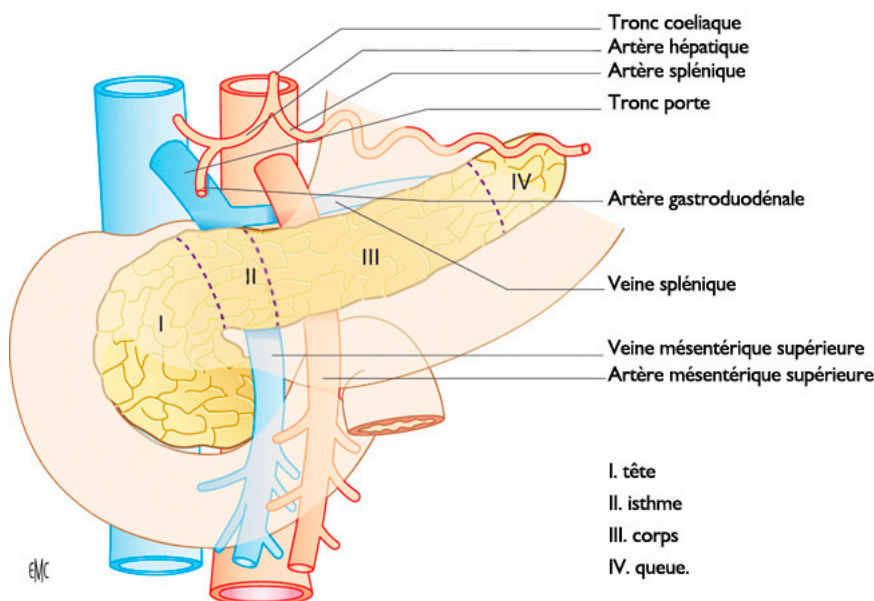


Figure 1: Anatomie du pancréas ((1) et N. Parent, Université de Tours)

Le canal pancréatique principal (canal de Wirsung) mesure environ 3 mm de diamètre, et parcourt toute la longueur du pancréas en recevant des canaux secondaires qui s'abouchent perpendiculairement. Il rejoint le canal cholédoque au niveau de la tête pour former un

sphincter commun, le sphincter d'Oddi qui se termine dans le bord interne du 2^{ème} duodenum (1–4) (Figure 1).

La vascularisation artérielle du pancréas provient de l'artère mésentérique supérieure, l'artère gastro-duodénale et l'artère splénique (1–4). Le retour veineux est assuré par les veines pancréatico-duodénales et la veine splénique. Le drainage lymphatique de la région céphalique est assuré par les ganglions périoduodéno-pancréatiques, rétrocholédociens, mésentériques supérieurs et hépatiques communs. Le drainage corporéocaudal s'effectue via des ganglions du hile splénique. Enfin, les ganglions situés près du tronc coelique et de l'artère mésentérique supérieure ou dans la région inter-aorticocave assurent le drainage de l'ensemble du pancréas.

Le pancréas est innervé par le système sympathique (douleur) via les nerfs splanchniques et par le système parasympathique via le nerf vague (X) (1–4). Le système parasympathique, via les fibres cholinergiques, contribue à la commande de la sécrétion exocrine.

ii) Organisation tissulaire du pancréas

Le tissu pancréatique est structuré en lobules séparés par des septa fibreux (5). Ces lobules contiennent principalement des acini et des canaux d'excrétion (Figure 2). Les îlots de Langerhans sont répartis à travers les lobules pancréatiques. Les cellules acineuses, qui forment les acini, sont des cellules épithéliales polarisées. Leur partie inférieure contient le noyau et un réticulum endoplasmique rugueux développé. À l'intérieur de l'acinus pancréatique, on trouve des cellules souches multipotentes appelées cellules centro-acineuses, qui ont la capacité de se différencier en cellules acineuses, en cellules canalaire et même en cellules endocrines. Les sécrétions enzymatiques sont évacuées par des canaux d'excrétion, à savoir les canaux intralobulaires, puis interlobulaires, et enfin les canaux collecteurs. Les parois des canaux sont formées par des cellules épithéliales cubiques ou cylindriques.

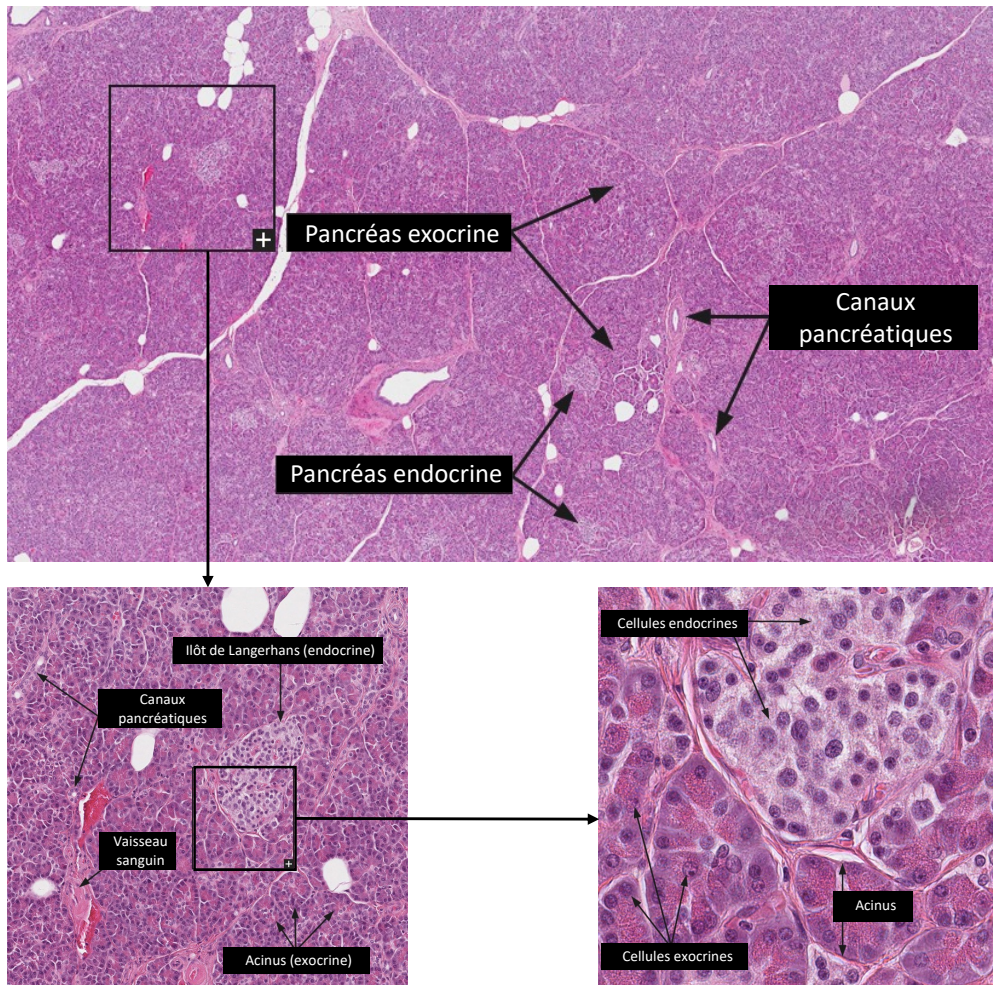


Figure 2: Organisation tissulaire du pancréas sain, d'après The Human Protein Atlas

iii) Organisation de la muqueuse des canaux pancréatiques

(1) Définition d'un épithélium

Un épithélium est un tissu situé à l'interface avec le milieu extérieur de l'organisme, avec une double fonction de barrière (et protection) et d'échanges avec le milieu extérieur. Cette double fonction se traduit par une haute spécialisation de l'architecture tissulaire et cellulaire et des structures cellulaires. Notamment, l'architecture tissulaire est spécifique avec formation d'un plan cellulaire entre l'environnement et le milieu intérieur (6). Par ailleurs, les cellules sont elles-mêmes hautement spécialisées, avec une polarité apico-basolatérale qui correspond à la polarisation de la membrane et du cytosol en trois pôles : le pôle apical, le pôle latéral et le pôle basal (ces deux derniers étant souvent regroupés en une seule entité basolatérale). Le pôle basolatéral est donc en contact avec les autres cellules de l'épithélium sur ses côtés latéraux (via de nombreuses jonctions) et avec le milieu intérieur et plus

précisément avec le tissu de soutien (tissu conjonctif, lame basale) par son côté basal (via différentes structures d'adhésion et d'excrétion).

Les jonctions latérales sont de divers types, et jouent un rôle de maintien de l'architecture cellulaire ainsi que d'échanges mécaniques et chimiques au sein de l'épithélium. On note ainsi les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes, que nous ne détaillerons pas ici.

(2) *Epithélium des canaux pancréatiques*

Les canaux intercalaires issus directement des acini, sont bordés par un épithélium cubique simple (Figure 3).

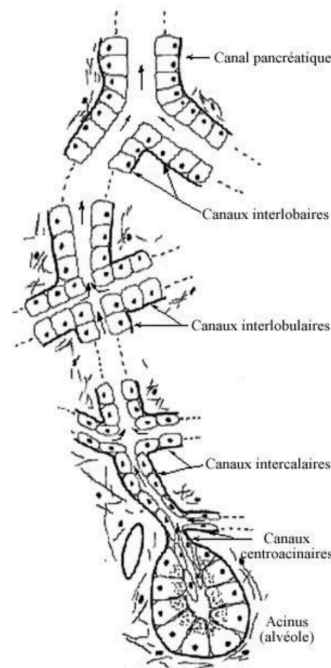


Figure 3: Organisation de l'épithélium des canaux pancréatiques. D'après [mapageweb/umontreal.ca/cabanat/](http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/)

Les canaux intercalaires fusionnent et constituent des canaux de calibre plus important, intralobulaires puis interlobulaires, dont les cellules sont prismatiques. Les grands canaux interlobulaires sont bordés par un épithélium cylindrique simple, présentent une lumière plus grande, et se jettent dans le Wirsung. Le Wirsung est constitué d'un épithélium bi ou pluristratifié, entouré d'une couche conjonctive riche en fibres élastiques.

2. Fonctions du pancréas

Le pancréas est un organe complexe et essentiel dont les parties exocrine et endocrine sont étroitement liées et jouent un rôle fondamental dans la digestion et le métabolisme (7,8).

i) Le pancréas endocrine

Le pancréas endocrine est responsable de la production d'hormones essentielles, comme l'insuline et le glucagon, qui contrôlent le niveau de glucose sanguin. Il sécrète également de nombreuses autres hormones qui contrôlent la croissance, le métabolisme des lipides et la balance des électrolytes. Les cellules endocrines du pancréas constituent 2% du volume du pancréas total et sont regroupées en unités fonctionnelles appelées îlots de Langerhans (5,7,8).

Ces îlots comportent 4 types cellulaires :

- les cellules alpha (sécrétion de glucagon)
- les cellules bêta (sécrétion de l'insuline, du *nerve growth factor* ou VGF impliqué dans la régulation de la balance énergétique, de l'oxérine (qui régule de façon autocrine la sécrétion d'insuline), de la leptine, de la ghréline et de l'obestatine (impliquées dans la régulation de l'appétit))
- les cellules delta (sécrétion de somatostatine)
- les cellules PP (sécrétion du popyptide pancréatique qui inhibe module la sécrétion gastrique acide et inhibe la sécrétion exocrine, la contraction vésiculaire, la motilité gastro-intestinale) (9).

ii) Le pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est composé de petites unités fonctionnelles appelées acini, qui regroupent des cellules acineuses (majoritaires), des cellules centro-acineuses, des cellules canalaire et des cellules stellaires (fibroblastes). Le pancréas exocrine est responsable de la production et de la sécrétion des enzymes digestives, qui sont nécessaires pour digérer les aliments et absorber les nutriments (7,8). Le pancréas exocrine produit également le bicarbonate, qui aide à neutraliser l'acidité de l'estomac.

Le pancréas sécrète 0,4 à 4L /jour de « suc » translucide légèrement visqueux au pH basique (7,8 à 8,8). Ce suc dépend d'une sécrétion acineuse (enzymes et protéines non

enzymatiques) et d'une sécrétion canalaire (principalement eau et bicarbonate). La sécrétion acineuse contient des lipolytiques (lipase, phospholipase, carboxyesterhydrolase), des amylolytiques (amylase), ou des protéolytiques (endopeptidases, exopeptidases) qui permettent la digestion. Ces enzymes sont sécrétées sous forme inactive (grain de zymogène) (10).

B. PHYSIOPATHOLOGIE DU CANCER DU PANCREAS

1. Epidémiologie des cancers du pancréas

L'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC pour *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) représente 90 à 95% des tumeurs primitives du pancréas (5). Les autres sous-types moins fréquents sont les carcinomes acineux, le cystadénome et le cystadénocarcinome séreux, le cystadénome et cystadénocarcinome mucineux, le pancréatoblastome, etc (5). Nous ne traiterons que de l'adénocarcinome canalaire du pancréas (ou PDAC) dans cette thèse.

i) Incidence et prévalence

Le PDAC est la quatrième cause de mortalité par cancer (Figure 4) et devrait devenir la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe et aux Etats-Unis en 2030-2040 (11–13). Ce cancer représente véritablement un problème de santé publique mondial en raison de son incidence croissante et de son pronostic défavorable (12,14,15), avec un taux de survie globale à 5 ans de seulement 7% à 8% pour tous les stades confondus (12).

Le cancer du pancréas est classé au 12e rang en termes d'incidence et de prévalence dans le monde. En 2020, on estime qu'il y a eu environ 495 773 nouveaux cas enregistrés de cancer du pancréas dans le monde, avec une prévalence à 1 an estimée à 214 471 cas (16). La mortalité était de 466 003 cas tous sexes confondus (16). Les taux d'incidence et de prévalence les plus élevés se trouvent en Europe, en Amérique du Nord, au Japon, en Australie et en Nouvelle-Zélande. L'incidence du cancer du pancréas est légèrement plus élevée chez les hommes que chez les femmes, avec respectivement 5,5 cas pour 100 000 hommes et 4 cas pour 100 000 femmes.



Figure 4: Incidence et mortalité des dix principaux types de cancers par sexe, États-Unis, 2023 (12)

En France, le cancer du pancréas est également un problème majeur de santé publique. En 2018, on estime qu'il y a eu environ 7301 nouveaux cas chez les hommes et 6 883 chez les femmes (17). Le cancer du pancréas est classé au 9e rang en termes d'incidence en France, avec un taux supérieur à la moyenne européenne. Il représente environ 3% des nouveaux cas de cancers diagnostiqués annuellement en France. Entre 1990 et 2018, l'incidence du cancer du pancréas a augmenté de manière significative en France, avec une augmentation annuelle moyenne de 2,7% chez les hommes et de 3,8% chez les femmes (17).

Par ailleurs, l'incidence du PDAC augmente de façon inquiétante notamment chez les patients de moins de 50 ans (Figure 5). Le PDAC est traditionnellement associé à des groupes d'âge plus élevés avec une médiane d'âge au diagnostic comprise entre 65 et 70 ans (16,17). Cependant, des études récentes ont montré une augmentation notable du nombre de personnes plus jeunes chez lesquelles un PDAC est diagnostiqué, avec un diagnostic plus fréquent à un stade avancé et un pronostic sombre (18,19). Selon les projections, l'incidence mondiale du cancer du pancréas devrait augmenter de 77,7% entre 2018 et 2040, avec une augmentation estimée à 29% en Europe (13,20) (Figure 6).

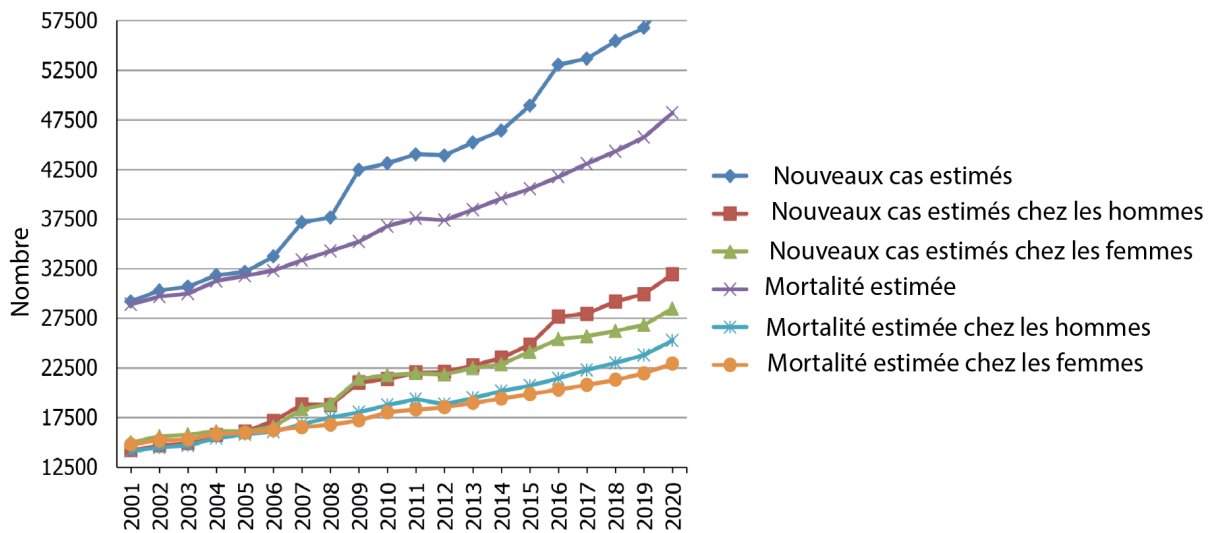


Figure 5: Incidence et de la mortalité du PDAC aux Etats-Unis de 2001 à 2020, d'après (21)

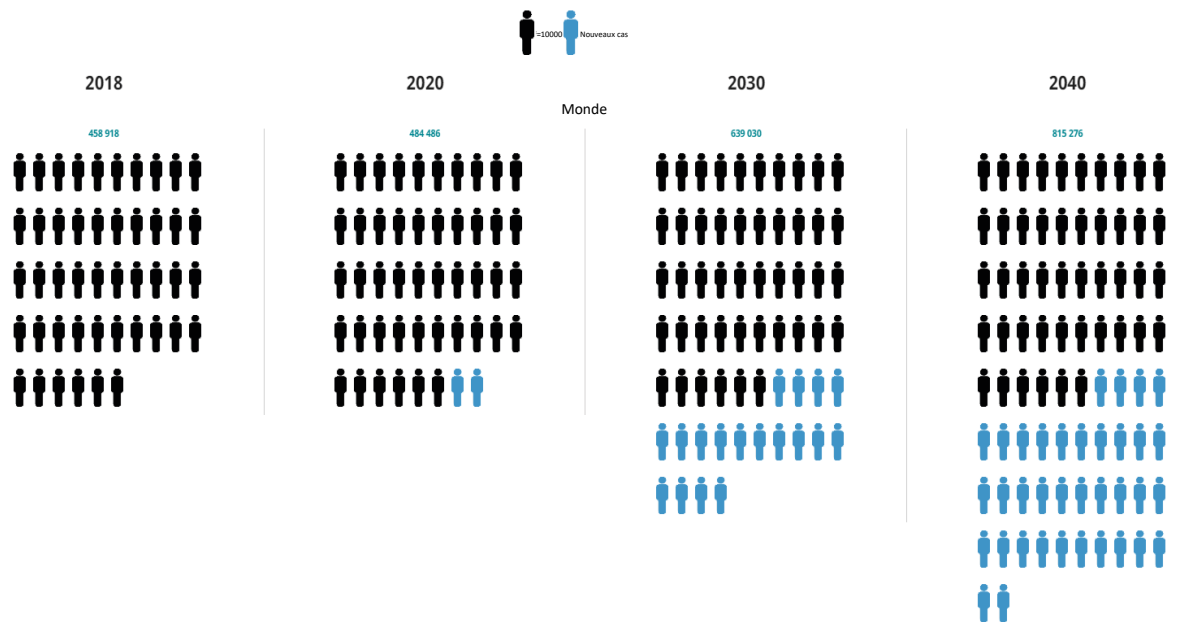


Figure 6: Représentation du nombre de nouveaux patients estimés atteints de PDAC dans le monde, d'après Globocan 2018, International Agency for Research on Cancer

Plusieurs facteurs contribuant à cette augmentation d'incidence sont suspectés, notamment des facteurs environnementaux liés au mode de vie qui sont connus comme étant des facteurs de risque du PDAC.

ii) Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque du cancer du pancréas ont été identifiés (Figure 7). Parmi eux :

1. Tabagisme : Le tabagisme est le principal facteur de risque environnemental associé au cancer du pancréas (22,23). Une méta-analyse a évalué le risque relatif à 1,74, et ce risque semble augmenter avec la durée et la sévérité de la consommation de tabac (22).
2. Obésité : Plusieurs études suggèrent que l'obésité est associée à un risque accru de cancer du pancréas (24–26). Des lésions précancéreuses ont été observées chez des patients obèses, suggérant que l'insulinorésistance et l'inflammation chronique causées par la graisse viscérale jouent un rôle dans la carcinogenèse pancréatique (26,27).
3. Diabète : Le diabète est également associé à un risque plus élevé de cancer du pancréas (28). Certains auteurs supposent que le diabète pourrait être la manifestation d'une condition précancéreuse ou d'un cancer du pancréas asymptomatique (29,30). Environ 10% des cas de cancer du pancréas ont été attribués au diabète dans une étude italienne (31).
4. Pancréatite chronique : La pancréatite chronique est considérée comme un facteur de risque de cancer du pancréas (32,33). Cependant, le risque absolu reste relativement faible, avec environ 1,8% des patients développant un cancer du pancréas après 10 ans d'évolution de la pancréatite chronique (33). Le risque est néanmoins majoré avec les pancréatites chroniques héréditaires (mutation de *PRSS1*, *CFTR*, *SPINK1*, etc) avec un risque multiplié par 50 à 60 par rapport à la population générale (34).
5. Prédisposition génétique : Environ 10% des cancers du pancréas sont liés à des prédispositions génétiques s'intégrant dans différents syndromes génétiques : cancers du sein et de l'ovaire héréditaires (*BRCA2* principalement, *BRCA1* plus rarement), syndrome de Peutz-Jeghers (*STK11*), cancer du sein génétique (*PALB2*), pancréatite chronique héréditaire (*PRSS1* notamment), syndrome de Lynch (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), syndrome FAMMM (*familial atypical multiple mole melanoma*) (*CDKN2A*), mutation d'*ATM* et polypose adénomateuse familiale (*APC*) (35,36).

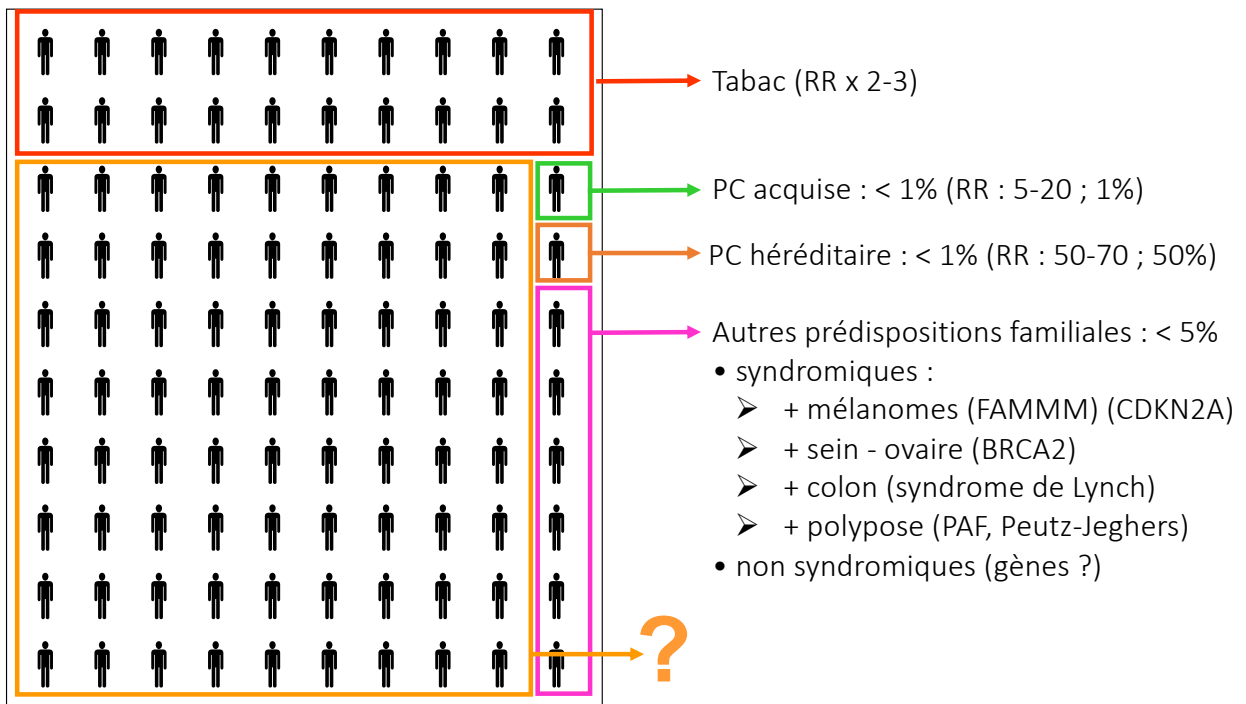


Figure 7: Poids respectifs des principaux facteurs de risques du PDAC (PAF : Polypose adénomateuse familiale, FAMMM : Mélanomes atypiques multiples familiaux, PC : pancréatite chronique, RR : risque relatif), d'après le DU de carcinologie clinique GR 2022. ?: pas de facteur de risque identifié.

D'autres facteurs de risque ont été décrits dans la littérature, notamment l'infection à *Helicobacter pylori*, les groupes sanguins A et B, et l'ethnie afro-américaine. Néanmoins, la majorité des cancers du pancréas reste sporadique, sans étiologie retrouvée.

2. Lésions précancéreuses du pancréas

Les lésions précancéreuses du pancréas sont des anomalies canalaire intraépithéliales qui évoluent progressivement vers le cancer. Leur progression est similaire au processus de carcinogénèse observé dans le cancer du côlon, passant par différents stades de dysplasie (bas grade, moyen grade et haut grade), puis par le stade de carcinome in situ avant d'aboutir au stade de carcinome infiltrant (5). Trois principaux types de lésions précancéreuses ont été identifiés, chacun présentant des caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires distinctes.

i) Néoplasies pancréatiques intra-épithéliales

Les PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia), représentent les lésions précancéreuses les plus fréquentes du pancréas et se développent sur de petits canaux pancréatiques, sans signe d'invasion tumorale (5,37,38) (Figure 8).

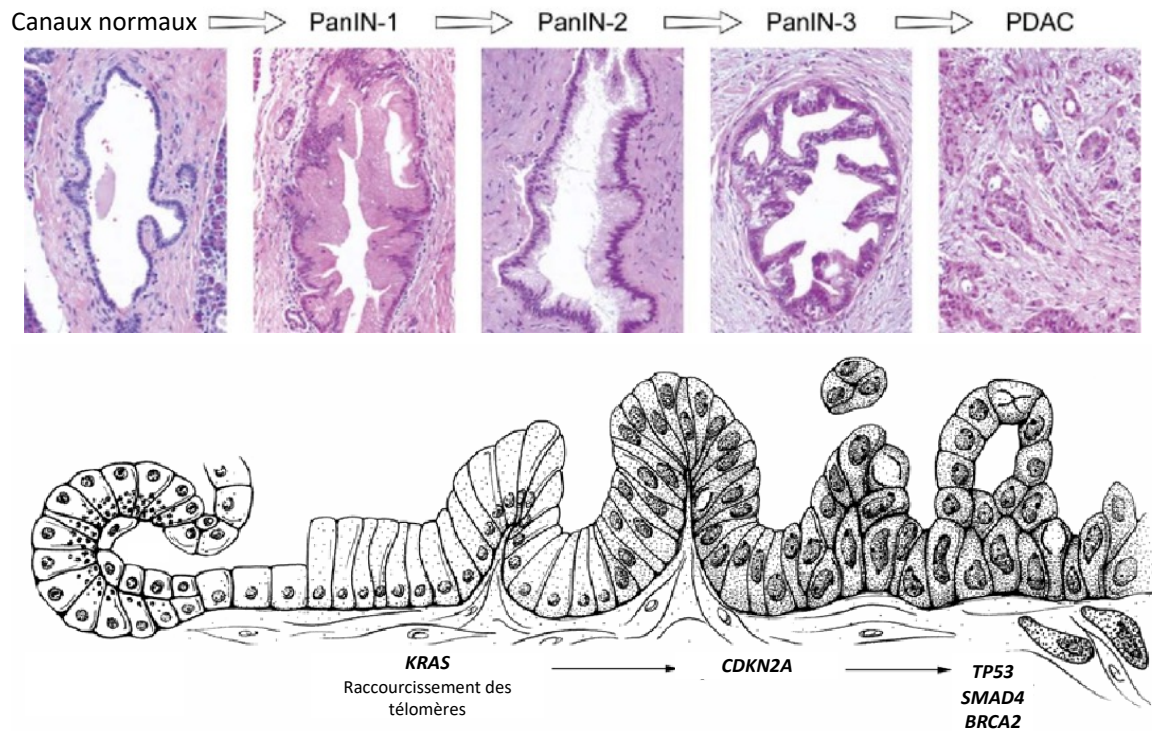


Figure 8: Modélisation de la progression histologico-génétique des PDAC, d'après (39,40)

Les PanIN sont historiquement classées en plusieurs catégories en fonction de leurs caractéristiques cytologiques et architecturales (5,37,38) (Figure 9) :

- PanIN 1A : Il s'agit de lésions plates où les cellules sont organisées en colonnes avec des noyaux situés près de la membrane basale avec une accumulation importante de mucine intra-cytoplasmique.
- PanIN 1B : Les PanIN 1B sont des lésions papillaires, par ailleurs similaires aux PanIN 1A.
- PanIN 2 : Les cellules épithéliales des PanIN 2, qu'elles soient plates ou papillaires, présentent des anomalies nucléaires telles que la perte de polarité cellulaire, des noyaux dilatés et une hyperchromatie. Les mitoses sont généralement rares sans atypie notable, et le cytoplasme est normal.

- PanIN 3 : Les PanIN 3, le plus souvent de nature papillaire, sont considérées comme des carcinomes in situ. Elles présentent des anomalies cyto-nucléaires marquées, telles que la présence de clusters de cellules épithéliales obstruant la lumière du canal et des signes de nécrose canalaire.

Récemment, la classification OMS a reclassifié les PanIN en bas grade et haut grade et a remplacé la classification historique en 3 catégories. Logiquement, la progression des lésions de PanIN s'accompagne d'anomalies moléculaires correspondant à celles observées dans le cancer du pancréas constitué. Ces altérations moléculaires jouent un rôle essentiel dans le développement et la progression des lésions de PanIN. Les lésions de bas grade présentent des mutations *KRAS* et des raccourcissements des télomères. La mutation du gène *KRAS* se produit très tôt dans les lésions de PanIN, et la mutation spécifique du codon 12 (G12D) a été retrouvée dans 36% des PanIN 1, 44% des PanIN 2 et 87% des PanIN (41). Les lésions de haut grade présentent fréquemment une inactivation de *CDKN2A* et des altérations du nombre de copie de gènes. Les mutations de *TP53* (42) sont plutôt rares ainsi que les délétions homozygotes de *SMAD4* (43) qui sont retrouvées surtout dans les PDAC et rarement voire jamais dans les PanIN de haut grade.

ii) Tumeurs intra-canaliaires papillaires et mucineuses du pancréas

Les tumeurs intraductales papillaires mucineuses du pancréas (TIPMP) sont des lésions mucineuses qui se développent à partir des canaux principaux et/ou secondaires du pancréas. Les TIPMP se caractérisent par une sécrétion abondante de mucus et une communication avec les canaux pancréatiques (37,44). Ces lésions sont souvent asymptomatiques et leur diagnostic est souvent découvert de manière fortuite ou lors d'une poussée de pancréatite aiguë. Selon leur phénotype, les TIPMP sont classées en types histologiques distincts :

- Phénotype gastrique : Ce phénotype est le plus fréquent (70% des cas) et présente des similitudes avec la muqueuse gastrique au niveau morphologique et phénotypique. Il est associé à une faible agressivité et à un meilleur pronostic. Il caractérise généralement les TIPMP des canaux secondaires. La dégénérescence de ce type histologique conduit le plus souvent à un adénocarcinome tubulaire (similaire à un PDAC).

- Phénotype intestinal : Ce phénotype présente une morphologie très similaire aux adénomes coliques et évolue rapidement vers un cancer invasif de type colloïde. Il caractérise principalement les TIPMP du canal principal ou mixte.
- Phénotype bilio-pancréatique : C'est le type histologique avec le pronostic le plus sombre, avec une fréquente dégénérescence en adénocarcinome tubulaire.

En cas d'atteinte des canaux pancréatiques secondaires, le risque de dégénérescence en carcinome est estimé de 3 % à 18 % à 5 ans et jusqu'à 50 % à 5 ans en cas d'atteinte du canal pancréatique principal (45). Selon le type de TIPMP, il existe aussi un risque de dysplasie de bas ou haut grade. Les altérations génétiques observées dans les TIPMP sont relativement similaires à celles observées dans l'adénocarcinome pancréatique. Ces anomalies affectent fréquemment les gènes *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* voire *SMAD4* (associé à l'invasion) (37,46). La plupart des TIPMP présentent également une mutation de *GNAS*, qui code pour une G-protéine (47,48). Cette mutation spécifique de *GNAS* est responsable d'une activation de la prolifération cellulaire et n'est pas retrouvée dans les adénocarcinomes pancréatiques. Le gène suppresseur de tumeur *RNF43* est également fréquemment muté dans les TIPMP (14 à 38%). De plus, la prévalence des mutations *KRAS* et *GNAS* est directement liée au degré de dysplasie et au type histologique (47). Par exemple, la mutation de la protéine *GNAS* est souvent retrouvée dans le phénotype intestinal, tandis que le sous-type bilio-pancréatique présente souvent une mutation de *KRAS* (46).

iii) Cystadénome mucineux

Le cystadénome mucineux est une lésion kystique pancréatique précancéreuse ayant un revêtement épithélial sécrétant de la mucine et un stroma de type ovarien (37). Bien que les cystadénomes mucineux soient généralement considérés comme bénins, ils peuvent évoluer vers une maladie maligne, en particulier le cystadénocarcinome mucineux. Les cystadénomes mucineux sont souvent identifiés de manière fortuite lors d'examens d'imagerie ou d'examens abdominaux (37). Ces lésions se présentent généralement sous la forme de masses kystiques bien définies à l'intérieur du pancréas et peuvent être de taille variable. Au microscope, elles se caractérisent par la présence de cellules épithéliales cylindriques productrices de mucine, qui tapissent les kystes et présentent des atypies cellulaires plus ou moins marquées. La présence d'atypies cellulaires ou de dysplasie de haut degré au sein de l'épithélium

est considérée comme un précurseur de la transformation maligne. La probabilité de dégénérescence des cystadénomes mucineux serait de 10% à 30% (49).

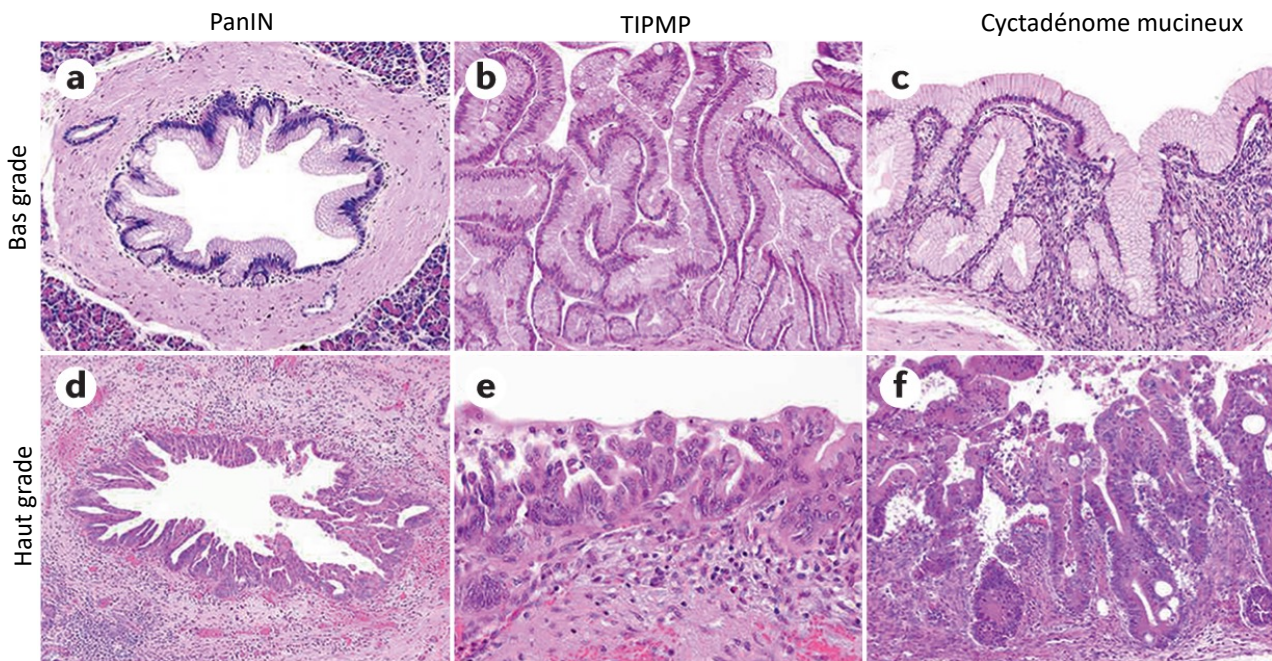


Figure 9: Coupes histologiques des lésions précancéreuses du PDAC. D'après (50)

3. Caractérisation histologique des cancers du pancréas

i) Adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC)

Les caractéristiques histologiques des PDAC (« sans autre indication » ou NOS (*non-otherwise specified* en anglais), les plus fréquents) comprennent les éléments suivants (5) :

1. Architecture tumorale : Les PDAC se caractérisent par une architecture anarchique par rapport à l'architecture du tissu normal. On peut retrouver des structures glandulaires ou tubaires bien formées dans les formes les plus différenciées et une architecture plus désorganisée dans les formes les moins différenciées. Dans ces dernières, l'architecture pourrait être massive voire trabéculaires ou en cellules isolées.
2. Atypie cellulaire : Les cellules tumorales présentent des atypies cellulaires. Les cellules sont de forme et de taille variable. Les noyaux sont de plus grande taille par rapport

aux cellules des canaux normaux. Les noyaux sont augmentés de taille, hyperchromatiques. Les membranes nucléaires sont irrégulières avec présence de nucléoles proéminents.

3. Infiltration stromale : Les PDAC s'accompagnent d'une réaction stromale importante. Un stroma fibreux dense composé de collagène, de glycoprotéines non collagéniques, d'élastine et de protéoglycanes est présent autour des cellules tumorales. Ce stroma peut contribuer à la rigidité de la tumeur et à sa résistance aux traitements.
4. Production de mucine : Certains PDAC présentent une production de mucine, ce qui signifie qu'ils sont mucineux. Ces tumeurs sont appelées adénocarcinomes mucineux. La présence de mucine peut être détectée lors d'une évaluation histologique et peut avoir des implications pronostiques.
5. Index mitotique élevé : Les PDAC ont généralement un index mitotique élevé associé une croissance rapide de la tumeur et à un pronostic défavorable.
6. Différenciation et grade : les PDAC peuvent présenter des grades de différenciation variés, de bas grade à haut grade, correspondant à des tumeurs de bien à peu différenciées.
7. Infiltration périnerveuse : L'une des caractéristiques des PDAC est l'infiltration périnerveuse. Parfois, dans les cas les plus différenciés il s'agit du seul argument pour affirmer la malignité.

Il est important de noter que les caractéristiques histologiques peuvent varier d'un adénocarcinome pancréatique à l'autre (Figure 10)-)àç !)^^)à^=.

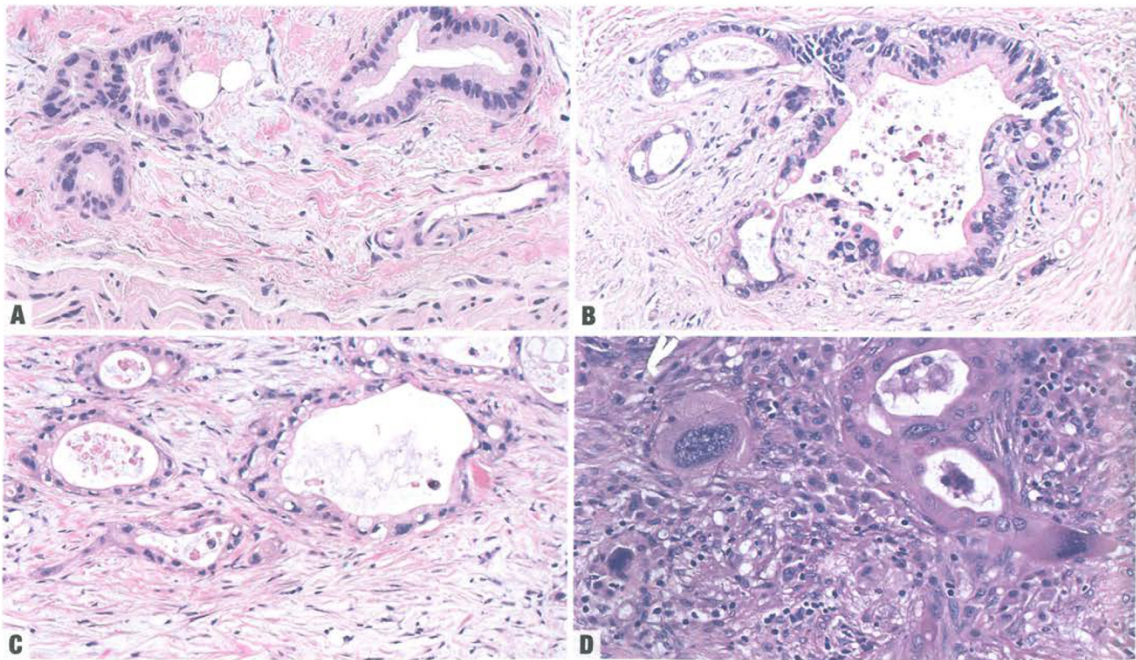


Figure 10: Différents aspects histopathologiques de PDAC. A : Bien à moyennement différencié, B : Modérément différencié avec stroma desmoplastique, C : Modérément différencié, D : Peu différencié avec cellules géantes. D'après (5)

ii) Marqueurs immunohistochimiques du PDAC

Bien qu'il n'y ait pas de marqueur histochimique spécifique des PDAC, certaines spécificités moléculaires peuvent être utilisées pour le différencier des autres adénocarcinomes (5) :

- Cytokératines : Le PDAC exprime les mêmes cytokératines que le pancréas normal (7, 8, 18 et 19). Environ 50% des PDAC expriment la cytokératine 4, mais elles restent généralement négatives pour la cytokératine 20. De plus, les PDAC n'expriment pas la vimentine ni les marqueurs endocriniens.
- Mucines : La majorité des PDAC expriment les mucines MUC1, MUC3, MUC5AC, MUC6 et MUC17. La mucine MUC4 présente la particularité de ne pas être exprimée dans le pancréas sain, mais uniquement dans les lésions précancéreuses pancréatiques et dans le PDAC (51).

- CA 19-9 (Antigène Carbohydre 19-9) : Il s'agit d'un ganglioside contenant un radical sialylacto-N-fucopentose, et il fait partie des antigènes du groupe sanguin Lewis. Il est synthétisé par le pancréas normal, mais également par plusieurs autres tissus (colique, biliaire, œsophagien, gastrique, etc.) (52). Il est exprimé à la surface des cellules épithéliales et sert de ligand pour les monocytes et les macrophages.
- ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) : Il s'agit d'une glycoprotéine de surface impliquée dans les fonctions d'adhésion cellulaire dans les tissus épithéliaux, dont le taux s'effondre physiologiquement à la naissance. Son taux est élevé chez 30 à 60% des patients atteints d'un cancer du pancréas (53).

Ces marqueurs moléculaires peuvent être utilisés en conjonction avec l'évaluation histologique pour aider à différencier le cancer du pancréas des autres types d'adénocarcinomes et contribuer au diagnostic précis de la tumeur.

iii) Autres sous-types de PDAC plus rares

(1) Carcinome adénosquameux

Le carcinome adénosquameux est une tumeur rare caractérisée par la présence de cellules glandulaires productrices de mucines ainsi qu'une composante épidermoïde. Son incidence est de 0,5 à 2% (5). Une tumeur est considérée comme adénosquameuse quand le contingent épidermoïde représente plus de 30% de la tumeur (5).

(2) Carcinome anaplasique ou indifférencié

Les carcinomes anaplasiques ou indifférenciés sont des tumeurs rares et très agressives qui représentent de 0,8 à 5,7% des tumeurs malignes du pancréas (5). Plusieurs entités ont été décrites (carcinome sarcomatoïde, carcinome à cellules géantes ou pléomorphes, carcinome à cellules ostéoclastiques, etc.)

(3) Carcinome mucineux non kystique

Le carcinome mucineux non kystique, également appelé carcinome colloïde ou gélatineux, se caractérise par une forte expression des mucines d'où une grande quantité de mucus dans lequel sont dispersées des cellules malignes. Généralement associés à des TIPMP ou à

des adénomes tubuleux ou tubulo-villeux endocanalaire, il représente environ 1 à 3% des tumeurs malignes du pancréas (5).

iv) Caractéristiques du stroma

L'épithélium néoplasique existe au sein d'un stroma dense, qui est reconnu comme un médiateur essentiel de la progression de la maladie par des effets directs sur les cellules cancéreuses et des effets indirects sur le microenvironnement immunitaire de la tumeur (54). Les entités dominantes dans le stroma du PDAC sont la matrice extracellulaire (MEC), la vascularisation, les fibroblastes associés au cancer (CAF) et les cellules immunitaires.

La MEC extracellulaire peut constituer une barrière à l'administration efficace de médicaments auprès des cellules cancéreuses (54). Elle forme un réseau dense de protéines structurales, de protéines adaptatrices, de protéoglycanes et d'enzymes que l'on trouve dans tous les tissus, où elle fournit un soutien biochimique et structurel à l'homéostasie tissulaire (55).

La vascularisation tumorale est un système complexe et le stroma du PDAC est dit hypovasculaire (56). Néanmoins, il existe une forte hétérogénéité de vascularisation entre les tumeurs, et une vascularisation réduite est associée à une faible survie (57). Aucun agent anti-angiogénique n'a été prouvé efficace dans le PDAC à ce jour.

Les CAF participent à un dialogue actif avec les cellules cancéreuses dans le microenvironnement de la tumeur. Les fibroblastes sont à la base des cellules de soutien d'origine mésenchymateuse présentes en quantités importantes dans presque tous les organes solides. Ces fibroblastes sont essentiels aux mécanismes homéostatiques de l'épithélium en fournissant un soutien structurel et en sécrétant des facteurs solubles et des protéines de la MEC (58). Dans le cadre du cancer, les CAF ne sont pas de simples spectateurs mais des acteurs actifs au cours du processus d'initiation, de progression et de métastase du cancer (59,60). L'existence d'une hétérogénéité intratumorale des CAF a été également montrée (61,62), avec des sous-types de CAF myofibroblastiques et inflammatoires qui contribuent probablement de manière distincte à la progression de la PDAC.

Enfin, la MEC renferme plusieurs populations de cellules immunitaires (63) malgré l'hypoxie et le développement d'un stroma desmoplastique. Aux stades précoces, les cellules

effectrices telles que les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules T CD8+ et les cellules T CD4+ peuvent être présentes et activées. Néanmoins, avec l'acquisition de cellules tumorales résistantes et le développement de mécanismes d'échappement, le microenvironnement tumoral du PDAC induit le recrutement de monocytes et de neutrophiles, qui ont alors acquis un phénotype anti-inflammatoire (64). La transformation du microenvironnement de pro-inflammatoire à anti-inflammatoire contribue à augmenter la croissance tumorale et l'angiogenèse et est corrélée à une faible survie, ainsi qu'à l'immunosuppression systémique et à la malnutrition chez les patients (65).

4. Méta-classification moléculaire des PDAC

De nombreuses études ont contribué à l'acquisition des connaissances actuelles sur les sous-types moléculaires du PDAC, proposant une classification tumorale qui reflète les différences biologiques et pronostiques entre les patients. Nous nous concentrons ici sur les quatre études transcriptomiques et génomiques les plus fréquemment discutées dans la littérature pour la stratification du PDAC en différents groupes. Les définitions des sous-types moléculaires du cancer du pancréas ont été proposées par Collisson et al. (66) en 2011, Moffitt et al. (67) en 2015, Bailey et al. (68) en 2016, qui sont fréquemment considérées comme la référence en matière de sous-typage moléculaire du PDAC, et Puleo et al. (69) en 2018, une étude plus récente réalisée sur des échantillons inclus en paraffine (FFPE).

Collisson et al. (66) ont réalisé une analyse non supervisée en utilisant deux ensembles de données d'expression géniques, l'un provenant d'échantillons de tumeurs primaires micro-disséquées (où l'épithélium était dépourvu de stroma) et l'autre d'échantillons de tumeurs entières. Les auteurs ont identifié une signature de 62 gènes permettant de distinguer les tumeurs et ont proposé trois sous-types : classique, quasi-mésenchymateux et exocrine. Pour valider ces sous-types, des lignées cellulaires ont été testées pour leur réponse thérapeutique *in vitro*. Les sous-types classiques semblaient bénéficier davantage d'un inhibiteur d'EGFR (erlotinib), contrairement au quasi-mésenchymateux où la chimiothérapie par gemcitabine était plus bénéfique. Cependant, lors d'une validation des 62 gènes par une analyse sur des lignées cellulaires humaines et murines, le sous-type exocrine n'a pas été observé. De plus, la repro-

duction des sous-types dans des jeux de données transcriptomiques disponibles publiquement a conduit à des clusters différents, suggérant qu'une reproduction indépendante des sous-types dans différents ensembles de données était difficile.

Moffitt et al. (67) ont réalisé une microdissection virtuelle sur plusieurs types de données (tumeurs primaires et métastatiques, lignées cellulaires, pancréas normal et échantillons péri-tumoraux). Les transcrits ont été répartis en catégories liées à chaque phénotype initial, et les transcrits associés à la tumeur et au stroma ont été utilisés pour définir deux approches de sous-types distincts. Les sous-types spécifiques à la tumeur reposaient sur 50 gènes liés à la tumeur stratifiant les patients en sous-types classique et *basal-like*, tandis que 48 gènes liés au stroma ont été utilisés pour distinguer les sous-types de stroma normal et activé. D'après cette étude, le sous-type exocrine précédent (Collisson et al) serait une contamination des échantillons par du tissu sain.

Bailey et al. (68) ont utilisé des données de RNA-Seq provenant d'échantillons de cancer du pancréas ayant une tumeur avec une cellularité tumorale supérieure à 40%. Ils ont identifié quatre groupes de sous-types : squameux, immunogène, progéniteur pancréatique et exocrine différencié de façon aberrante (ADEX), qui présentaient des différences de pronostic significatives. Pour élucider d'autres caractéristiques biologiquement pertinentes des sous-types, les auteurs ont intégré l'analyse transcriptomique à une analyse génomique comprenant le séquençage complet du génome (WGS), le séquençage des exomes (WES) et la variation du nombre de copies de gènes (CNV). Dans une cohorte de validation plus large et sans évaluation de la cellularité tumorale, les mêmes sous-classes tumorales ont été retrouvées.

Enfin, Puleo et al. (69) ont collecté des profils d'expression issus de tumeurs primaires réséquées incluses en paraffine (FFPE). Cette étude a révélé cinq sous-types grâce à une signature de 403 gènes : classique pur, classique immunitaire, desmoplastique, stroma activé et basal-like pur. Les sous-types différaient par leur composition immunitaire et stromale ainsi que par leur microenvironnement tumoral. Les sous-types desmoplastique et classique immunitaire étaient les sous-types présentant la plus forte infiltration immunitaire, avec une différence pour le desmoplastique qui présente en plus des cellules fibroblastiques et endothéliales élevées et des caractéristiques stromales inflammatoires. Comme le desmoplastique, le

sous-type stroma activé présentait une teneur élevée en stroma. Les tumeurs classiques purs et basal-like purs étaient, respectivement, bien et peu différenciées et présentaient toutes deux une faible infiltration immunitaire. Dans l'analyse de survie, les sous-types à faible infiltration immunitaire (basal-like pur et stroma activé) étaient associés à un mauvais pronostic, comme précédemment rapporté par Moffitt et al (67). Cette dernière étude a permis de valider les phénotypes classique/basal, la classification du stroma différent quelque peu selon les études (Figure 11).

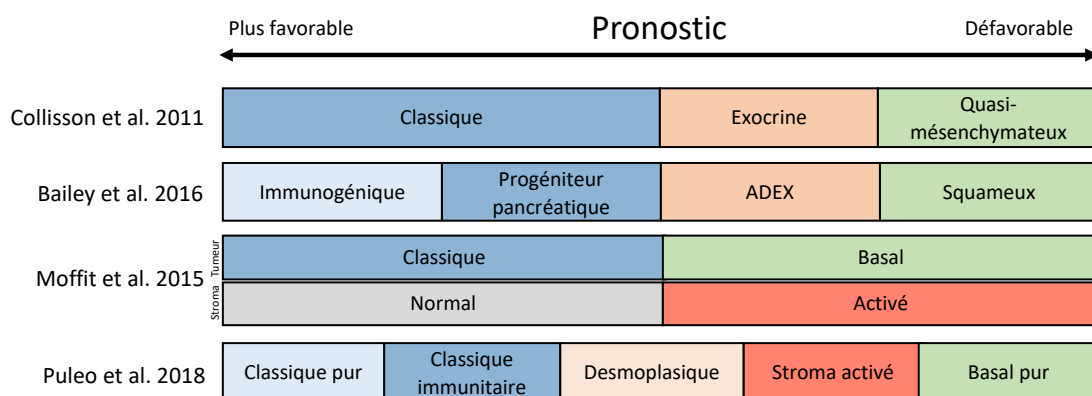


Figure 11: Sous-types moléculaires décrits dans le PDAC, d'après (70)

Ces classifications moléculaires ont permis de mieux comprendre la diversité du cancer du pancréas et de fournir des informations sur les caractéristiques spécifiques de chaque sous-type, ce qui pourrait avoir des implications importantes pour le pronostic et le développement de thérapies ciblées. Néanmoins, la stratification des tumeurs à l'aide de profils moléculaires à l'échelle du génome complet, bien qu'utile, est limitée à cause de la difficulté d'obtenir des séries fiables d'échantillons de PDAC (71,72). L'utilisation d'échantillons chirurgicaux entraîne immédiatement l'exclusion de 85 % des patients dont les tumeurs ne sont pas résecables. Deuxièmement, la présence d'une proportion variable (entre 15 et 90%) de cellules stromales infiltrant la tumeur, induit une contamination par des cellules saines et compliquent l'interprétation des études. Troisièmement, la quantité de matériel biologique est en général limitée et ne permet pas d'entreprendre des analyses simultanées moléculaires et fonctionnelles sur une même tumeur.

L'essai COMPASS, prospectif et visant à étudier la faisabilité de réaliser un séquençage génomique et transcriptomique dans un délai cliniquement pertinent, a fourni la première preuve que les taux de réponse à la chimiothérapie diffèrent entre les patients atteints de PDAC à un stade avancé en fonction du profil transcriptomique (73). Il a permis de montrer prospectivement que les phénotypes squameux et basaux partagent plusieurs aspects importants, notamment un grade tumoral élevé, une maladie métastatique, une chimiorésistance et un mauvais pronostic. Le sous-type "classique" a quant à lui une issue plus favorable (73).

C. DISSEMINATION METASTATIQUE DU PDAC

1. Stadification clinique des PDAC

i) Critères NCCN

L'évaluation de la résecabilité du cancer du pancréas repose sur une expertise radiologique à partir d'une tomodensitométrie de qualité (74). Cette évaluation permet de déterminer l'approche thérapeutique, qu'elle soit médicale ou chirurgicale. Différentes classifications ont été proposées pour définir la résecabilité du cancer du pancréas en se basant sur l'analyse du contact de la tumeur avec les structures vasculaires adjacentes. La classification du *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) est la plus couramment utilisée (75). Elle divise les tumeurs en trois catégories : résecables d'emblée, borderline ou localement avancées (Tableau 1). Cette évaluation est basée sur la présence ou l'absence d'un contact tumoral avec les vaisseaux mésentérico-porte et les artères mésentériques supérieures (AMS) ou tronc coeliaque (TC), ainsi que sur la quantification de ce contact.

Tableau 1: Critères de résecabilité du PDAC

Résecabilité	Atteinte artérielle	Atteinte veineuse
Résecable	Aucun contact artériel : <ul style="list-style-type: none"> - Artère mésentérique supérieure (AMS) - Tronc Coeliaque (TC) - Artère hépatique comune (AHC) 	Aucun contact veineux mésentérico-porte ou contact <180° sans irrégularité veineuse
Borderline	<ul style="list-style-type: none"> - Contact avec AHC sans extension au TC ou à la bifurcation de l'artère hépatique sans possibilité de reconstruction - Contact avec AMS <180° 	Contact avec la mésentérico-porte >180° ou contact <180° avec irrégularité veineuse ou thrombose veineuse avec possibilité de reconstruction

	- Contact avec TC<180° sans envahissement aortique ni de l'artère gastroduodénale	Contact avec la veine cave inférieure
Localement avancé	<u>Tête du pancréas :</u> - Contact avec AMS >180° - Contact avec TC >180° <u>Corps-Queue du pancréas :</u> - Contact avec AMS ou TC >180° - Envahissement aortique	Envahissement veineux mésentérico-porte sans possibilité de reconstruction

ii) **TNM**

La classification TNM du cancer du pancréas est utilisée pour caractériser les tumeurs en fonction de leur taille (T), de l'extension ganglionnaire locale et régionale (N) et de la présence de métastases (M). La 8e édition de cette classification a été publiée par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) et par l'Union for International Cancer Control (UICC) en 2017 (76,77). La détermination du stade peut être clinique (cTNM) en se basant sur les données pré-thérapeutiques (examen clinique, endoscopie, imagerie...) ou histopathologiques après l'analyse histologique de la pièce opératoire (pTNM). Elle permet également de classer les tumeurs en différents stades, ce qui guide la prise en charge thérapeutique. Toutefois, son utilisation en pratique clinique reste limitée car sans impact réel sur les décisions thérapeutiques.

Tableau 2: Classification TNM selon la 8ème édition de l'AJCC

T	N	M
T1 : Tumeur < 2 cm T1a : Tumeur < 0,5 cm T1b : Tumeur entre 0,5 et 1 cm T1b : Tumeur entre 1 et 2 cm	N0 : pas de métastases ganglionnaires	M0 : pas de métastase(s) à distance
T2 : Tumeur entre 2 et 4 cm	N1 : 1 à 3 ganglions régionaux métastatiques	M1 : métastase(s) à distance
T3 Tumeur > 4 cm	N2 : ≥ 4 ganglions régionaux métastatiques	
T4 : Tumeur envahissant le TC, l'AMS ou l'AHC, quelle que soit sa taille		

2. Intermédiaires tumoraux et stratégies de dissémination

La dissémination métastatique repose sur une séquence d'événements qui aboutit à la colonisation par les cellules cancéreuses d'un tissu à distance de la tumeur primaire. Différentes voies de dissémination métastatiques sont observées dans le PDAC (5). Tout d'abord, la voie périnerveuse, avec la présence d'engainements tumoraux périnerveux (dissémination le long des gaines des nerfs intra et péri-pancréatiques). Ceci explique la fréquence des récurrences et des extensions tumorales locales et intra-abdominales. Ensuite, une voie de diffusion liée à la prolifération tumorale au sein du tissu adipeux péri-pancréatique jusqu'à la séreuse péritonéale, ce qui explique la fréquence des lésions de carcinose péritonéale. Par ailleurs, les voies d'extension endolymphatique, avec des métastases ganglionnaires, et les extensions endoveineuses, diffusant au système porte, expliquent la survenue des métastases hépatiques, puis pulmonaires et viscérales, après passage dans la circulation systémique. Au stade localement avancé, il existe aussi une extension par contiguïté aux vaisseaux - veine et artère mésentérique, artère hépatique, tronc porte et tronc coeliaque - ainsi qu'aux organes de voisinage comme le duodénum, le haut cholédoque voire l'estomac.

Ainsi, différentes stratégies de dissémination cellulaire ont été identifiées pour les cellules cancéreuses qui quittent la tumeur primaire et migrent vers des sites distants. Ces stratégies peuvent être classées comme étant soit isolées, soit collectives.

i) Dissémination de cellules isolées

(1) La transition Epithélio-Mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus biologique qui se produit lors du développement embryonnaire normal, ainsi que dans diverses conditions pathologiques, notamment dans la progression du cancer. C'est un processus complexe par lequel les cellules épithéliales acquièrent des caractéristiques de cellules mésenchymateuses (78) (Figure 12).

Les cellules épithéliales sont généralement organisées en couches, avec des jonctions cellulaires étroites et des polarités cellulaires distinctes. Elles jouent un rôle crucial dans la formation des tissus et des organes. Les cellules mésenchymateuses, en revanche, sont plus

mobiles et moins spécialisées. Elles peuvent migrer individuellement et ont la capacité de se différencier en plusieurs types de cellules spécialisées (79). Lors de la TEM, les cellules épithéliales subissent des changements morphologiques et moléculaires qui les transforment en cellules mésenchymateuses (78). Les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales, telles que la polarité cellulaire et les jonctions cellulaires, et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses, telles que la mobilité accrue, la résistance au stress mécanique et la capacité d'envahir les tissus environnants.

Ce processus est régulé par plusieurs facteurs de transcription et voies de signalisation, tels que les facteurs de croissance, les cytokines et les protéines de la matrice extracellulaire (79,80). Ils modulent l'expression des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (81,82), notamment les protéines d'adhésion cellulaire (comme les cadhérines), les protéines de la matrice extracellulaire (comme le collagène et la fibronectine) et les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (comme les métalloprotéinases).

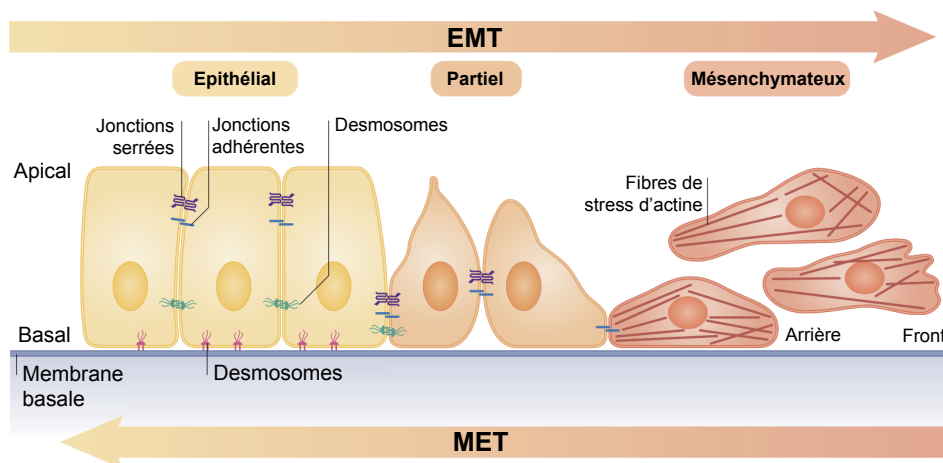


Figure 12: La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) ou mesenchymato-épithéliale (MET)), adapté par Jean-Baptiste Lopez d'après (81)

Dans le contexte du cancer, la transition épithélio-mésenchymateuse est souvent associée à une augmentation de la mobilité et de l'invasion des cellules tumorales (80). Elle leur permet de se détacher de la tumeur d'origine, de traverser les tissus environnants, d'envahir les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et finalement de former des métastases dans d'autres parties du corps (79). De plus, la transition épithélio-mésenchymateuse peut conférer aux cellules tumorales une résistance aux traitements anticancéreux, ce qui rend le cancer plus difficile à traiter (83,84).

(2) Migration de cellules isolées

Actuellement, on distingue au moins deux stratégies de dissémination cellulaire isolée. La première stratégie est connue sous le nom de stratégie mésenchymateuse. Elle implique un processus de TEM et se caractérise par une polarité cellulaire avant/arrière, avec une région protrusive à l'avant permettant l'adhésion au substrat, suivie d'une désadhésion et d'une contraction de la région arrière de la cellule (85). Cette stratégie est associée à une activation de la protéine Rac1 à l'avant protrusif de la cellule et de la protéine RhoA à l'arrière contractile. En répétant dynamiquement ce processus d'adhésion-traction, la cellule génère des forces suffisantes pour se déplacer de manière orientée vers l'avant à travers le stroma tout en remodelant son environnement pour faciliter son passage.

La deuxième stratégie est appelée stratégie amiboïde. Elle diffère de la stratégie mésenchymateuse car elle est indépendante des adhésions focales (86). Dans ce cas, la cellule dépend principalement de sa capacité à se déformer grâce à une modulation de la contractilité corticale de l'actomyosine par des protéines régulatrices appelées GTPases. Dans un environnement confiné, les variations de contractilité et de déformation permettent à la cellule d'exercer des forces de friction nécessaires à ses mouvements. Elle peut ainsi se déplacer en formant des protrusions non adhésives au sein du tissu. Cette stratégie repose moins sur la dégradation de la matrice extracellulaire et davantage sur la déformabilité de la cellule et l'application de forces mécaniques à son environnement. Il existe des modèles cellulaires capables de passer d'une stratégie mésenchymateuse à une stratégie amiboïde, et vice versa, en fonction du contexte environnemental.

Les modes de migration cellulaire peuvent varier d'un patient à l'autre et au sein de la même tumeur, en fonction de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. De plus, les cellules tumorales peuvent également utiliser des mécanismes de migration mixtes ou intermédiaires, combinant des caractéristiques de différents modes de migration et créant un continuum parmi les différents modes de migration.

ii) Modes de migration collectifs

Il existe des mécanismes de migration collectifs dans lesquels les cellules cancéreuses adoptent un mode mésenchymateux. Au lieu de quitter le tissu primaire individuellement, ces

cellules restent groupées, formant des cohortes plus ou moins organisées pour migrer ensemble. Ces modes de migration collective dépendent de la conservation partielle des adhésions intercellulaires, ce qui maintient la cohésion du groupe. On observe la présence de molécules d'adhésion telles que les cadhérines ou les immunoglobulines, qui permettent ces jonctions et suggèrent la présence de processus de transition épithélio-mésenchymateuse partiels (87).

Le premier type de migration collective est appelé "*multicellular streaming*" ou migration en file indienne (87). Il s'agit d'une file de cellules presque isolées qui se suivent, avec peu de contacts entre elles. Chaque cellule utilise indépendamment son cytosquelette pour exercer des forces sur le substrat (adhésion-traction), mais les cellules établissent également des jonctions transitoires pour transmettre des informations et migrer ensemble de manière coordonnée.

On observe également des migrations collectives dans lesquelles des cohortes multicellulaires sont coordonnées par des jonctions intercellulaires stables et durables (87,88). Dans ce cas, la structure dans son ensemble est polarisée, avec un front migratoire protrusif et adhérent au substrat qui remodèle l'environnement et applique des forces grâce aux protrusions des cellules "*leaders*" ou guides. Les cellules "*followers*" ou suiveuses à l'arrière jouent un rôle dans la rétractation contractile. Cette organisation rappelle celle des cellules individuelles, mais ici, c'est la polarisation du groupe et l'organisation supra-cellulaire qui permettent le mouvement. La coordination du groupe est assurée par les jonctions intercellulaires et leur liaison avec le cytosquelette de chaque cellule.

iii) Un nouveau mode de dissémination collective : les TSIP

Dans la littérature scientifique, il n'avait jusqu'à présent jamais été décrit de mode de migration collectif qui ne dépende pas d'une transdifférenciation partielle de type TEM, où les cellules perdent certaines de leurs caractéristiques épithéliales pour établir une nouvelle polarisation collective, avec une partie des cellules agissant en tant que guides et d'autres en tant que suiveuses et une polarisation avant/arrière.

En 2018, notre laboratoire montré que chez les patients atteints de cancers colorectaux mucineux, la dissémination tumorale était principalement due à la présence de cohortes

tumorales collectives sphériques présentant une forte identité épithéliale (89). Ces structures, appelées TSIP (« Tumor Spheres with Inverted Polarity » ou Sphères Tumorales à Polarité Inversée), ont été principalement retrouvées dans les effusions péritonéales chez les patients présentant une carcinose péritonéale, avec un pronostic défavorable. Ces intermédiaires tumoraux collectifs présentent une identité épithéliale marquée, avec une absence de marqueurs mésenchymateux, et une cohésion élevée assurée par des jonctions typiques des cellules épithéliales organisées. Ils présentaient également une polarité apico-basolatérale caractéristique, mais à l'échelle du groupe sphérique, cette polarité est inversée, avec le pôle apical faisant face à l'environnement externe plutôt que de former un lumen interne comme dans l'architecture glandulaire classique (Figure 13). Cette propriété, conservée lors du processus de dissémination, pourrait conférer des avantages en termes de survie ou de résistance aux traitements (90).

Ces TSIP, qui dépendent du mode collectif, ont démontré des capacités d'invasion et de métastases lorsqu'elles étaient réinjectées chez la souris, ce qui les caractérise comme des intermédiaires tumoraux malins. De plus, l'étude de leurs propriétés migratoires a révélé une migration indépendante du système d'adhésion-traction, reposant sur un nouveau mode de migration collective de type amiboïde dans un environnement confiné, tout en conservant leur identité (91).

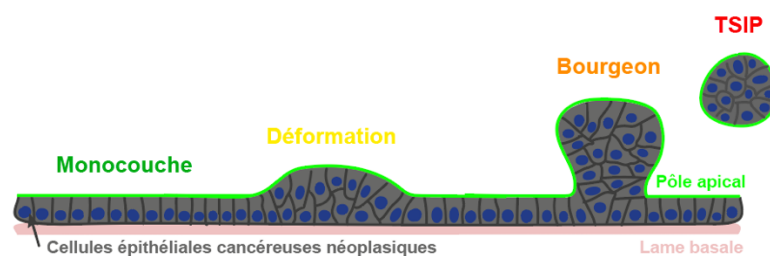


Figure 13 : Représentation de la libération d'une TSIP par bourgeonnement (Figure JB Lopez)

Il est intéressant de noter que la présence des TSIP n'est pas systématique dans tous les carcinomes colorectaux, mais plutôt spécifique aux carcinomes mucineux associés à une signature moléculaire positive et exprimant des gènes caractéristiques des précurseurs festonnés. L'analyse histologique a montré la présence de TSIP dans la tumeur primitive, les ganglions lymphatiques et les métastases à distance. Il a également été observé que les lésions

festonnées génèrent des bourgeons orientés vers la cavité lumineuse des tumeurs, ce qui pourrait être à l'origine de la formation des TSIP par bourgeonnement collectif (Figure 13).

Dans le PDAC spécifiquement, des modes de migration collectifs ont aussi été décrits. Ainsi, en utilisant des modèles d'organoïdes de PDAC, une équipe a montré que l'inactivation de *SMAD4* permettait un programme d'invasion collective dans du collagène, tandis que les organoïdes avec *SMAD4* sauvage envahissaient avec un phénotype mésenchymateux (92,93). *SMAD4* codant pour un composant essentiel de la voie de signalisation du TGF β , cela rappelle l'importance de la signalisation TGF β dans l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses dans les cancers épithéliaux. Ces différences phénotypiques se retrouvaient également au niveau transcriptomique (93).

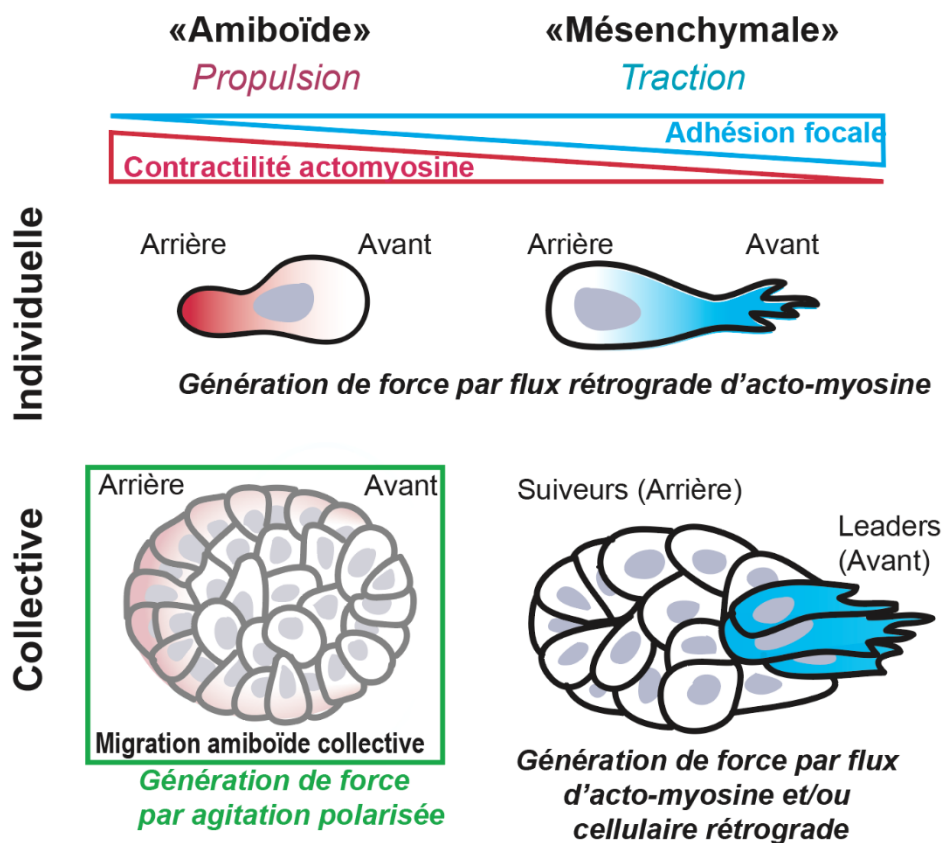


Figure 14 : Schéma des modes de migration cellulaire. Représentation schématique des différents modes de migration cellulaire basée sur la capacité des cellules à s'adhérer les unes aux autres (migration individuelle versus migration collective) et à leur environnement (mésenchymateuse versus amiboïde). Ceci entraîne une locomotion basée sur la traction ou la propulsion. La migration amiboïde de cellules individuelles et la migration adhésive collective sont entraînées par des flux rétrogrades de la cellule et/ou les acto-myosines, tandis que la migration collective amiboïde est entraînée par des mouvements polarisés (d'après DL Pagès).

II. STRATEGIES THERAPEUTIQUES

A. CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS

1. Mode de découverte

Le cancer du pancréas est souvent diagnostiqué à des stades avancés, avec environ 80% des patients présentant une tumeur non résécable ou métastatique au moment du diagnostic (12) (Figure 15).

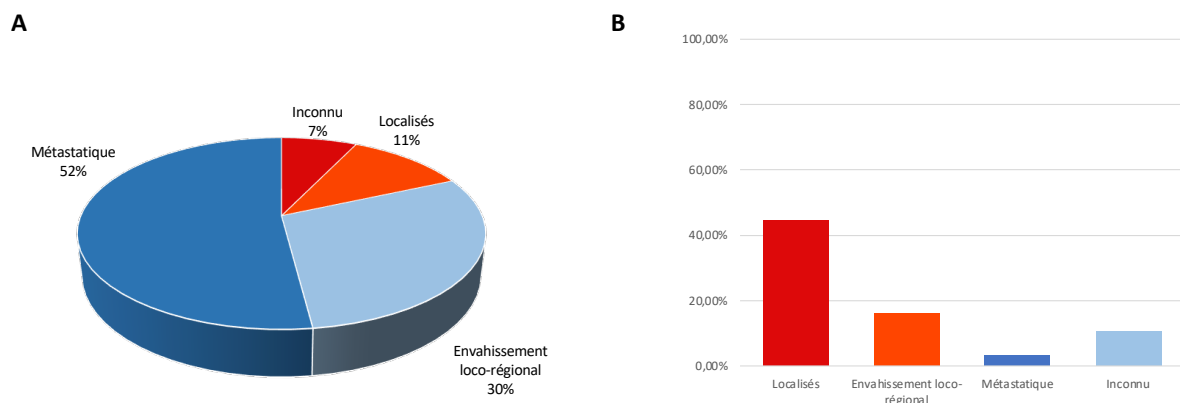


Figure 15: Stades au diagnostic (A) et survie relative à 5 ans (B) des patients nouvellement diagnostiqué d'un cancer du pancréas aux USA (D'après SEER 22 2013–2019)

Les symptômes cliniques sont généralement non spécifiques et sont principalement caractérisés par une altération de l'état général. Ils varient en fonction de la localisation de la tumeur dans le pancréas et de son stade (94). L'ictère, causé par une obstruction des voies biliaires, est un symptôme précoce courant dans les cancers de la tête du pancréas, tandis que les cancers du corps et de la queue sont souvent diagnostiqués à un stade avancé. Dans le cas des cancers de la tête du pancréas, il peut également y avoir une présence de stéatorrhée en raison de l'insuffisance pancréatique exocrine causée par l'obstruction du canal de Wirsung. D'autres symptômes tels que la découverte ou l'aggravation d'un diabète, des douleurs abdominales ou une pancréatite aiguë peuvent également être des signes révélateurs d'un cancer du pancréas.

1. Facteurs pronostics

Plusieurs facteurs pronostiques ont été identifiés comme prédictifs de la survie des patients atteints de cancer du pancréas (95,96) (Tableau 3).

1. Stade de la maladie et résecabilité (75): Le stade du cancer du pancréas est l'un des facteurs les plus importants pour évaluer le pronostic. Les stades plus précoces ont généralement de meilleures perspectives de survie. La possibilité de retirer chirurgicalement la tumeur est aussi un facteur crucial. Les tumeurs résecables, c'est-à-dire celles qui peuvent être complètement enlevées, ont généralement de meilleures perspectives de survie.
2. Facteurs histologiques : Le grade histologique du cancer du pancréas fait référence à l'apparence des cellules cancéreuses au microscope et à leur degré de différenciation. Un grade élevé indique des cellules plus anormales et souvent une agressivité accrue de la tumeur. De plus, l'atteinte ganglionnaire (N+) est un autre facteur pronostique important notamment le ratio ganglions envahis/ganglions prélevés (5,97). Enfin, la résection en marge positive (R1) et l'envahissement périnerveux (Pn+) et les embolies vasculaires ou lymphatiques (V+) sont associées à une réduction significative de la survie (5,97,98).
3. État général de santé (*Performans status*): L'état général de santé du patient, y compris son état nutritionnel et sa capacité à tolérer les traitements, peut également avoir un impact sur le pronostic (99).
4. Âge : Bien que l'âge lui-même ne détermine pas directement le pronostic, il peut influencer la capacité à tolérer certains traitements et les complications associées à la chirurgie (16).
5. CA19-9 (100): Le taux préopératoire de CA19-9 est associé à la survie des patients ayant subi une résection chirurgicale du cancer du pancréas, et un taux de plus de 100-200 UI/mL est considéré comme révélateur d'une maladie micrométastatique. Chez les patients dont la tumeur est non résecable, le taux de CA19-9 est également un facteur prédictif de survie.

Tableau 3: Principaux facteurs pronostics dans le PDAC

Cliniques	Biologiques	Histologiques	Moléculaires	Thérapeutiques
<ul style="list-style-type: none"> - Etat général (score OMS) - Dénutrition - Mode de présentation (ictère, douleur, diabète) 	<ul style="list-style-type: none"> - CA19-9 - CRP - Plaquettes - Ratio lymphocytes/neutrophiles - LDH 	<ul style="list-style-type: none"> - Stade TNM - Différenciation et grade - Envahissement ganglionnaire - Marges de résection envahies - Embols lymphovasculaires - Engainements périnerveux 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutation <i>KRAS</i> - Mutation <i>SMAD4</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Résécabilité - Chimiothérapie adjuvante - Traitement par thérapie ciblée sur une altération actionnable

B. TRAITEMENTS STANDARDS DES PATIENTS AVEC UN PDAC

1. Traitements systémiques : chimiothérapies

Plusieurs molécules de chimiothérapie sont utilisées à différents stades de la maladie. Ces molécules peuvent être administrées en situation adjuvante (après la chirurgie pour diminuer le risque de récurrence), en situation néoadjuvante/d'induction (pour réduire la taille de la tumeur notamment), ou en situation palliative pour soulager les symptômes et ralentir la progression de la maladie. L'objectif de ces traitements est de détruire ou de diminuer la multiplication des cellules tumorales.

i) Les molécules

- 5-Fluorouracile (5-FU) (101)

Le 5-FU est une molécule de la famille des antimétabolites. Son mécanisme d'action consiste à bloquer la méthylation de l'uracile en thymine, inhibant ainsi l'activité de la thymidilate synthétase et entraînant une inhibition de la synthèse de l'ADN. Il peut être administré par voie intraveineuse ou orale, cette dernière sous forme d'un précurseur appelé capécitabine.

- Gemcitabine (101)

La gemcitabine est un médicament de la classe des antimétabolites. Après son entrée dans les cellules tumorales par le biais de transporteurs membranaires, la gemcitabine est

métabolisée par des kinases nucléosidiques en nucléotides di- et tri-phosphate alors incorporés dans l'ADN, ce qui inhibe l'élongation de l'ADN. Ils bloquent également la synthèse des désoxyribonucléotides en inhibant la ribonucléase réductase. Les résultats du premier essai évaluant l'efficacité de la gemcitabine dans le traitement du cancer du pancréas ont été publiés en 1997. Burris et al. (102) ont comparé les bénéfices cliniques et la survie des patients atteints d'un cancer du pancréas localement avancé ou métastatique traités par gemcitabine ou 5-FU. Les auteurs ont démontré une amélioration significative du bénéfice clinique (23% vs 5%, $p=0,0022$) et de la médiane de survie (5,6 mois vs 4,4 mois, $p=0,0025$) en faveur de la gemcitabine.

- Irinotecan (101)

L'irinotecan appartient à la classe des inhibiteurs de la topoisomérase I. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de l'enzyme topoisomérase I, impliquée dans le processus de réplication et de transcription de l'ADN. Lorsqu'il est administré, l'irinotecan est métabolisé dans le foie en une forme active appelée SN-38. Le SN-38 se lie à l'ADN et empêche la topoisomérase I de dérouler correctement l'ADN lors de la réplication. Cela entraîne des cassures dans la double hélice de l'ADN et interfère avec la division cellulaire, conduisant à la mort des cellules cancéreuses.

- Oxaliplatine (101)

L'oxaliplatine appartient à la classe des agents alkylants. Lorsqu'il est administré, l'oxaliplatine est converti en forme active dans l'organisme. Cette forme active se lie à l'ADN et provoque des lésions de l'ADN, notamment des liaisons covalentes entre les brins d'ADN. Ces liaisons covalentes de l'ADN interfèrent avec le processus de réplication de l'ADN et inhibent la synthèse de l'ARN, empêchant ainsi les cellules cancéreuses de se diviser. Les lésions de l'ADN induites par l'oxaliplatine activent également des mécanismes de réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne un stress cellulaire et finalement la mort des cellules cancéreuses.

- Nab-paclitaxel (101,103)

Le nab-paclitaxel (abraxane®), appartient à la famille des médicaments appelés taxanes, qui sont des agents cytotoxiques utilisés dans le traitement du cancer. Les taxanes agissent en perturbant le fuseau mitotique, qui est essentiel pour la division cellulaire. Le mécanisme d'action du nab-paclitaxel repose sur sa capacité à cibler et à stabiliser les microtubules, qui sont des composants importants du fuseau mitotique. En facilitant l'assemblage des microtubules et en inhibant leur démontage, le nab-paclitaxel empêche les cellules cancéreuses de se diviser normalement et conduit à leur mort.

La caractéristique du nab-paclitaxel est sa formulation sous forme de nanoparticules d'albumine. Ces nanoparticules améliorent la solubilité du paclitaxel et augmentent sa biodisponibilité, éliminant ainsi le besoin d'utiliser des solvants. Les protéines d'albumine jouent un rôle clé dans cette formulation en facilitant la transcytose du paclitaxel à travers les cellules endothéliales tumorales via le récepteur gp60. Ce récepteur, présent à la surface des cellules endothéliales, permet au nab-paclitaxel d'atteindre la région tumorale en utilisant des cavéoles.

ii) Les protocoles

Le FOLFIRINOX, qui comprend l'administration de 5-FU, leucovorin, oxaliplatine et irinotécan est administré toutes les deux semaines sur deux jours selon différents protocoles :

- Oxaliplatine 85 mg/m² + irinotécan 180 mg/m² + acide folinique 400 mg/m² + 5-FU bolus 400 mg/m² + 5-FU 2400 mg/m² en perfusion continue (104)
- Oxaliplatine 85 mg/m² + irinotécan 150 mg/m² + acide folinique 400 mg/m² + 5-FU 2400 mg/m² en perfusion continue (FOLFIRINOX modifié ou mFOLFIRINOX) (105)

Le schéma Gemcitabine/Nab-paclitaxel est administré une fois par semaine pendant 3 semaines suivies d'une semaine de pause (106) :

- Gemcitabine 1000 mg/m²
- Nab-paclitaxel : 125 mg/m²

Le 5-FU administré seul (schéma LV5FU2) comporte acide folinique 400 mg/m² + 5-FU bolus 400 mg/m² + 5-FU 2400 mg/m² en perfusion continue.

2. Prise en charge aux stades localisés

La prise en charge chirurgicale du cancer du pancréas est souvent limitée en raison du diagnostic tardif de la maladie, avec environ 80% des patients étant diagnostiqués à un stade avancé ou métastatique. La chirurgie pancréatique est une procédure complexe qui requiert une expertise technique et oncologique. Le taux de mortalité associé à cette intervention varie considérablement en fonction du volume du centre où elle est pratiquée (107). Cependant, la résection chirurgicale associée à une chimiothérapie adjuvante offre les meilleures chances de survie, surtout lorsque la résection est complète (105).

Différents types de résections chirurgicales sont réalisées en fonction de la localisation de la tumeur. La duodéno pancréatectomie céphalique (DPC) est la résection la plus couramment réalisée pour les tumeurs de la tête et de l'isthme du pancréas. Elle consiste en l'ablation de la tête du pancréas, du duodénum, de l'estomac, de la première anse jéjunale, de la vésicule biliaire et du canal cholédoque. Cette intervention est suivie d'un curage ganglionnaire, et la résection complète des marges artérielle et veineuse est cruciale pour le pronostic (108,109). La spléno pancréatectomie gauche (SPG) est réalisée pour les tumeurs du corps et de la queue du pancréas, emportant également la rate. Ce type de chirurgie est moins fréquent que la DPC (du fait du caractère tardif de découverte de ces tumeurs).

Il est important de souligner que la chirurgie du cancer du pancréas n'est bénéfique que si la résection est complète (R0) sur le plan microscopique. En cas de résection microscopiquement (R1) ou macroscopiquement (R2) incomplète, la survie est généralement faible (110). La décision d'effectuer une chirurgie dépend de l'extension locale de la maladie, évaluée selon la classification NCCN (75). Au vu de la morbi-mortalité de la chirurgie pancréatique, le geste chirurgical n'est envisagé que si une résection complète (R0) peut être obtenue.

Une chimiothérapie adjuvante pendant une durée de 6 mois est recommandée pour tous les patients après une résection d'un adénocarcinome pancréatique, indépendamment de leur statut T (extension tumorale), N (envahissement ganglionnaire) et R (qualité de la résection). Le schéma de chimiothérapie utilisé est le FOLFIRINOX modifié avec irinotecan à une dose de 150 mg/m² (105). Toutefois, si un patient n'est pas éligible à ce traitement, d'autres options peuvent être envisagées, telles que la gemcitabine, le 5-FU ou une combinaison de gemcitabine et capécitabine. Le choix du traitement est évalué au cas par cas,

en prenant en compte les caractéristiques individuelles du patient. Il est recommandé de débiter la chimiothérapie adjuvante dans les 3 mois suivant la chirurgie, si possible. La stratégie thérapeutique est détaillée dans la Figure 16.

3. Stades borderline et localement avancés

Pour les tumeurs borderlines et localement avancées, la chirurgie initiale n'est pas recommandée en raison du risque élevé de résection incomplète. Un traitement d'induction comprenant une chimiothérapie (par FOLFIRINOX modifié), éventuellement associée à une radiochimiothérapie complémentaire, peut augmenter les chances de réaliser une résection complète ultérieure, et des résultats prometteurs ont été obtenus avec cette approche (74,75).

L'essai PANDAS est actuellement en cours, essai randomisé multicentrique de phase II, qui vise à évaluer l'efficacité d'une chimiothérapie néoadjuvante par FOLFIRINOX modifié, suivie ou non d'une radiochimiothérapie concomitante avant chirurgie d'un adénocarcinome du pancréas borderline.

Dans le cadre d'un adénocarcinome localement avancé, le standard est une chimiothérapie première. Une chirurgie secondaire est possible seulement en cas de très bonne réponse (clinique, imagerie, CA19-9), en l'absence d'apparition de métastases. Une autre option est la réalisation d'une chimioradiothérapie avec capécitabine après au moins 4 mois de contrôle tumoral par chimiothérapie systémique. Le FOLFIRINOX est principalement utilisé en 1^{ère} ligne des PDAC en pratique clinique, et l'essai de phase III NEOPAN a apporté de nouveaux arguments pour son utilisation, de par l'efficacité sur la survie sans progression, mais également un profil de tolérance qui reste favorable (111). Bien qu'étant un critère secondaire, l'étude n'a malheureusement pas montré de différence significative sur la survie globale. En France, le FOLFIRINOX est à présent le standard pour les PDAC localement avancés. La stratégie thérapeutique est détaillée dans la Figure 16.

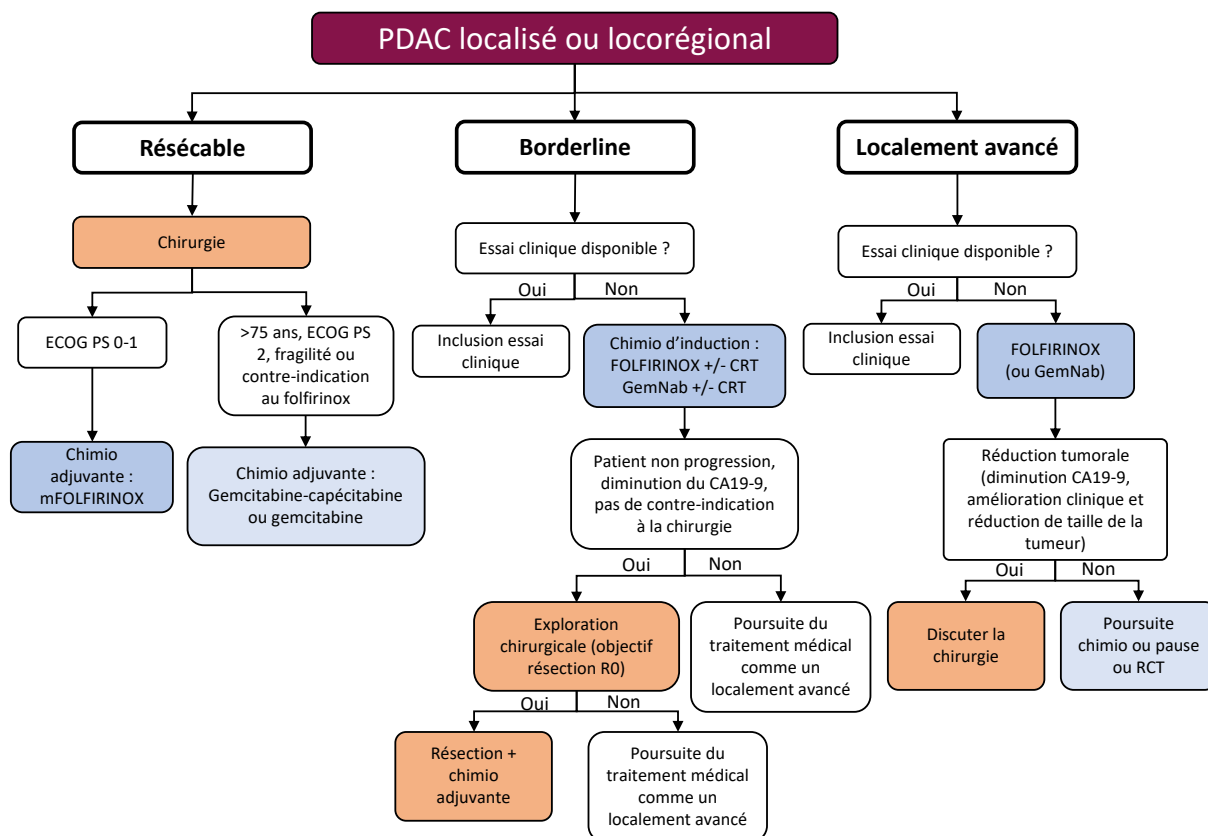


Figure 16: Prise en charge du PDAC localisé ou locorégional, d'après les recommandations ESMO (112) (RCT : radiochimiothérapie. GemNab : gemcitabine nabpaclitaxel).

4. Stades métastatiques

i) Première ligne

En première ligne au stade métastatique, deux standards sont validés, les protocoles FOLFIRINOX et gemcitabine-Nab-paclitaxel (Figure 17).

Le FOLFIRINOX a été montré supérieur à la gemcitabine seule en 2011 dans l'essai PRODIGE 4 (104). Le traitement à base de FOLFIRINOX a démontré une amélioration significative de la survie globale (11,1 mois contre 6,8 mois), de la survie sans progression (6,4 mois contre 3,3 mois) et du taux de réponse (31,6 % contre 9,4 %) par rapport au traitement standard (gemcitabine). Dans le groupe traité avec le FOLFIRINOX, plus de patients ont eu une toxicité de grade 3-4 par rapport au groupe traité à la gemcitabine, avec plus de neutropénie (45,7 % vs 21 %), de neutropénie fébrile (5,4 % de vs 1,2%), de thrombopénie (9,1 % vs 3,6 %), de neuropathie (9 % vs 0 %) et de diarrhées (12,7 % vs 1,8 %). Néanmoins, il n'y avait pas de différence en termes de qualité de vie entre les deux groupes. Ainsi, cette étude a établi

un nouveau standard de traitement pour les patients atteints de PDAC métastatique et en bon état général (OMS 0-1) avec une fonction hépatique adéquate (taux de bilirubine inférieur à 1,5 la normale) (74).

Par ailleurs, l'efficacité du Nab-Paclitaxel associé à la gemcitabine chez les patients atteints de PDAC métastatique en première ligne, avec un stade OMS 0-1 a été comparé à la gemcitabine seule (106). La combinaison Nab-Paclitaxel a permis une amélioration significative de la survie globale (8,5 mois contre 6,7 mois), de la survie sans progression (5,5 mois contre 3,7 mois) et du taux de réponse (29 % contre 8 %) par rapport à la gemcitabine en monothérapie.

A l'heure actuelle, aucune autre étude de phase 3 n'a pu se positionner face à la gemcitabine, hormis la combinaison gemcitabine erlotinib (113), qui montrait un allongement significatif de la médiane de survie globale par rapport à la gemcitabine seule (6,7 mois vs 5,91 mois, $p = 0,025$). Néanmoins, compte tenu du très faible bénéfice de survie (15 jours) et de la supériorité du FOLFIRINOX, cette combinaison thérapeutique n'a jamais obtenu le remboursement en France.

Récemment, le schéma à base de 5-FU, oxaliplatine et NALIRI (irinotecan liposomal), nommé NALIRIFOX, a montré sa supériorité à la gemcitabine nabpaclitaxel (114). La survie globale médiane était de 11,1 mois dans le groupe NALIFIROX contre 9,2 mois dans le groupe Gem+Nabpaclitaxel; la survie sans progression était également significativement améliorée (7,4 mois contre 5,6 mois). En l'absence de remboursement du NALIRI et en l'absence de comparaison avec le FOLFIRINOX, le standard français reste le FOLFIRINOX en 1^{ère} ligne.

ii) Maintenance

Les stratégies de maintenance (allègement du FOLFIRINOX pour améliorer la tolérance du traitement et diminuer/contrôler les toxicités notamment la neuropathie cumulative de l'oxaliplatine) après une période de contrôle tumoral, restent à préciser. L'arrêt de l'oxaliplatine est dans tous les cas indispensable en cas de neuropathie et cet arrêt se fait en général après 8 à 12 cures d'oxaliplatine (74).

La maintenance post-FOLFIRINOX dépend également de la présence ou non d'une altération de *BRCA1/2*. En cas de mutation germinale de *BRCA1/2*, il est à présent

recommandé de donner de l'olaparib (inhibiteur de PARP). En effet, l'essai POLO (115), étude randomisée en double aveugle contre placebo de phase III, a comparé l'efficacité de l'olaparib en traitement d'entretien, chez des patients mutés *BRCA1* ou *2*, dans le cancer du pancréas métastatique, sans progression durant la première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine (au moins 16 semaines). Cet essai a montré la supériorité de l'olaparib sur la survie sans progression (7,4 vs. 3,8 mois) et permis l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM).

En l'absence de mutation de *BRCA1/2*, les résultats de l'étude de phase II randomisée Panoptimox suggèrent qu'une maintenance par LV5FU2 après 4 mois de chimiothérapie d'induction par FOLFIRINOX pourrait être une option (116).

iii) Lignes ultérieures

Après une première ligne par FOLFIRINOX, il est classiquement utilisé le schéma gemcitabine-(Nab)paclitaxel. Il n'existe pas de standard au-delà, et les chimiothérapies utilisées sont variées (paclitaxel seul, carboplatine 5-FU, gemcitabine-capécitabine, FOLFOX, FOLFIRI etc). Le choix des traitements de deuxième ligne dépend de divers facteurs, notamment de l'état de santé général du patient, des traitements antérieurs reçus et des caractéristiques génétiques spécifiques de la tumeur (Figure 17). Quelques options de traitement de deuxième ligne sont :

- Essais cliniques : La participation à des essais cliniques portant sur de nouvelles options thérapeutiques est une possibilité de traitement de deuxième intention. Ces essais peuvent porter sur des médicaments expérimentaux, des immunothérapies ou d'autres approches thérapeutiques émergentes (thérapies ciblées, etc).
- Gemcitabine plus paclitaxel (GEMPAX) (117): l'association de la gemcitabine au paclitaxel est une alternative validée récemment dans l'essai GEMPAX présenté à l'ESMO 2022, essai pragmatique au vu du non remboursement du Nab-paclitaxel en France. L'étude est négative pour le critère de jugement principal (survie globale), mais le schéma GEMPAX a amélioré de manière significative la survie sans progression et le taux de réponse. Un déséquilibre dans les thérapies de 3ème ligne, et notamment l'utilisation de taxanes dans le groupe gemcitabine seule, pourrait expliquer le manque de bénéfice en termes de survie globale dans cette étude.

- 5-Fluorouracile + oxaliplatine (FOLFOX) (118,119): son efficacité dans le traitement de deuxième intention du cancer du pancréas métastatique a été démontrée, certaines études faisant état d'une amélioration de la survie globale et des taux de contrôle de la maladie, notamment après une chimiothérapie de première ligne à base de gemcitabine.
- Gemcitabine + nab-paclitaxel : L'association de gemcitabine et de nab-paclitaxel, précédemment utilisée comme traitement de première intention, peut également être envisagée en deuxième intention notamment après le FOLFIRINOX (74).
- Irinotécan nanoliposomal (nal-IRI) + 5-FU/leucovorine (120) : Cette association a permis d'améliorer la survie globale et la survie sans progression par rapport au fluorouracile seul lors d'essais cliniques, mais n'est actuellement pas remboursée en France.
- Immunothérapie : Les essais n'ont pas montré de bénéfice des inhibiteurs de checkpoint immunitaires pour la prise en charge des patients atteints d'un PDAC. Néanmoins, en cas de tumeur porteuse d'une instabilité des microsatellites (MSI), l'immunothérapie est une option à proposer (121).

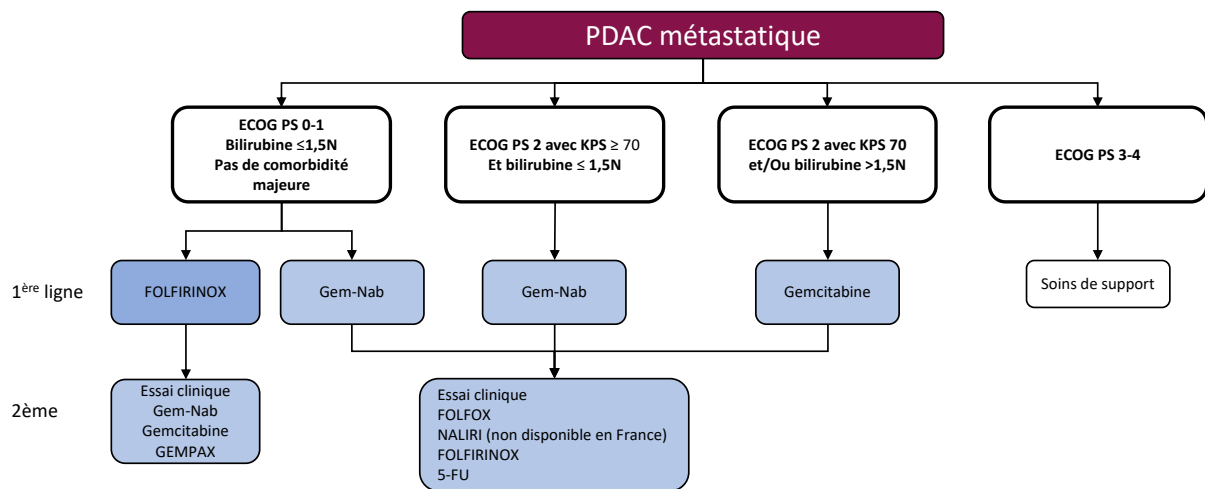


Figure 17: Prise en charge des PDAC au stade métastatique, d'après les recommandations ESMO (112)

5. Thérapies ciblées

Ces dernières années, plusieurs études prospectives ont été menées pour évaluer la faisabilité et l'efficacité de la médecine de précision par séquençage de nouvelle génération (NGS) chez les patients atteints de différents cancers solides (122–127). Il convient de noter que seulement 10% à 25% des patients dans ces études ont reçu une thérapie spécifique basée sur le profilage moléculaire, et que peu de patients ont donc réellement bénéficié d'un point

de vue clinique de cette approche. Cependant, un récent essai prospectif randomisé en médecine de précision chez des patients atteints d'un cancer du sein a montré que l'utilisation d'une thérapie ciblée améliorerait la survie sans progression, mais uniquement lorsque les altérations génétiques étaient classées de niveau I/II selon l'échelle ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets) (125). Ces résultats ont été confirmés par les données du programme de médecine de précision dans notre institution (128). Une meilleure stratification des altérations ciblables permettrait ainsi une meilleure sélection des patients pour les traitements ciblés.

Plus spécifiquement chez les patients atteints de PDAC, les résultats de plusieurs études ont montré un bénéfice en termes de taux de réponse globale, de survie sans progression et de survie globale médiane chez les patients présentant une altération génétique ciblable et traités par la thérapie ciblée correspondante, par rapport à ceux qui présentent une altération génétique ciblable mais ne reçoivent pas de thérapie ciblée (129–132). Cependant, il reste à démontrer si la médecine de précision génomique pourrait améliorer la prise de décision thérapeutique chez les patients atteints de PDAC, approche qui n'est pour l'instant pas implémentée dans les recommandations de prise en charge (112).

Le profilage moléculaire des PDAC retrouve l'existence de plusieurs altérations géniques clés impliquées dans la carcinogenèse, principalement dans 4 gènes : *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* et *CDKN2A*. À l'exception de la mutation *KRAS*_{G12C} qui est présente dans moins de 1-2% des cas de PDAC (133), ces altérations génétiques n'ont pas encore de thérapies ciblées validées. Cependant, dans environ 25% des cas, des altérations moléculaires ciblables peuvent être identifiées, impliquant principalement les voies de réponse et de réparation des dommages de l'ADN (gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*) par les platines ou les inhibiteurs de PARP. On peut également identifier à faible fréquence des altérations dans la voie PI3K/AKT/mTOR ciblables, ou des altérations de RTK pour lesquelles il existe des traitements spécifiques (*FGFR*(134), *NTRK*, *MET*, *RET*, *BRAF*, *EGFR*, *HER2*, etc.). Les tumeurs du pancréas sans mutation *KRAS* (10% environ) sont souvent enrichies en altérations génétiques actionnables (135), ce que nous discuterons à la lumière de notre étude présentée dans les résultats.

Actuellement, seul l'olaparib (avec l'essai POLO) a été approuvé en traitement

d'entretien après une première ligne de chimiothérapie à base de platine, chez les patients porteurs d'une mutation germinale de BRCA1 ou BRCA2 (115). De plus, la détermination du statut tumoral MisMatch Repair (MMR) devrait être systématique, compte tenu des possibilités d'immunothérapie (actuellement en essai clinique) en cas de statut avec instabilité des microsatellites (MSI).

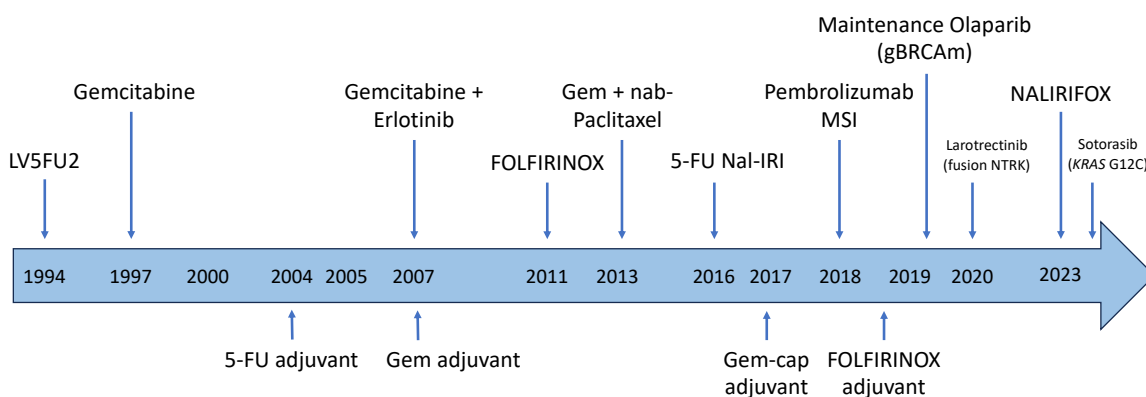


Figure 18: Principales évolutions thérapeutiques du PDAC depuis 1994

C. DES MOLECULES D'AVENIR, LES INHIBITEURS DE *KRAS*

1. *KRAS* dans le cancer du pancréas

i) La voie *RAS*

La famille *Ras* est composée de trois isoformes : *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. Ce sont des protéines cytoplasmiques de la famille des GTPases qui jouent un rôle crucial dans la transmission de signaux initiés par des récepteurs transmembranaires. La protéine *KRAS* agit comme un interrupteur pour une multitude de fonctions de signalisation cellulaire. L'équilibre entre l'hydrolyse et l'échange de nucléotides détermine les niveaux de *KRAS* actif dans les cellules (136). Lié au GDP, *KRAS* est dans un état "OFF". Lors de l'échange de GDP en GTP, généralement en réponse à des facteurs de croissance et facilité par des facteurs d'échange guanine-nucléotide (GEF) tels que *SOS1/SOS2*, *KRAS* passe à l'état activé "ON". Sous cette forme, *KRAS* active des voies effectrices, notamment les voies *MAPK* et *PI3K*, afin de promouvoir la prolifération et la survie cellulaire. *KRAS* retourne à l'état "OFF" lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, un processus catalysé par les protéines activant la GTPase activatrices de la GTPase (GAP) telles que *NF1*

(137). La plupart des mutations de *KRAS* décrites dans le PDAC laisse *KRAS* principalement dans l'état actif ON car l'hydrolyse du GTP est altérée (138,139).

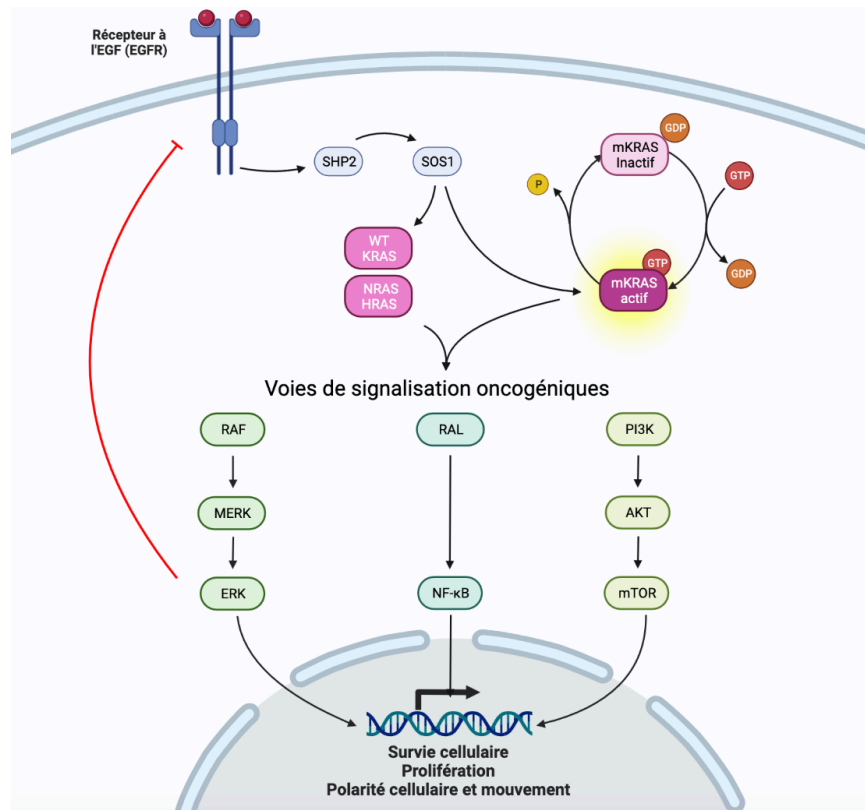


Figure 19: Voies de signalisations oncogéniques en aval de *KRAS* et rétrocontrôles

L'activation de RAS par l'activité tyrosine kinase d'un récepteur transmembranaire conduit à la phosphorylation de RAF et à son activation (138). Cela déclenche une cascade d'activation comprenant la phosphorylation de MEK1/2 (MAPK-ERK Kinase), qui à son tour phosphoryle ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase). ERK1/2 est ensuite transloqué dans le noyau où il active la transcription de gènes cibles, notamment des facteurs de transcription tels que C-Jun et C-Fos.

La voie Ras/Raf/MAPKinases favorise l'expression des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et interagit avec d'autres voies de signalisation pour réguler la motilité cellulaire, y compris l'expression de métalloprotéinases matricielles (MMP) et l'activité des protéines GTPases (140).

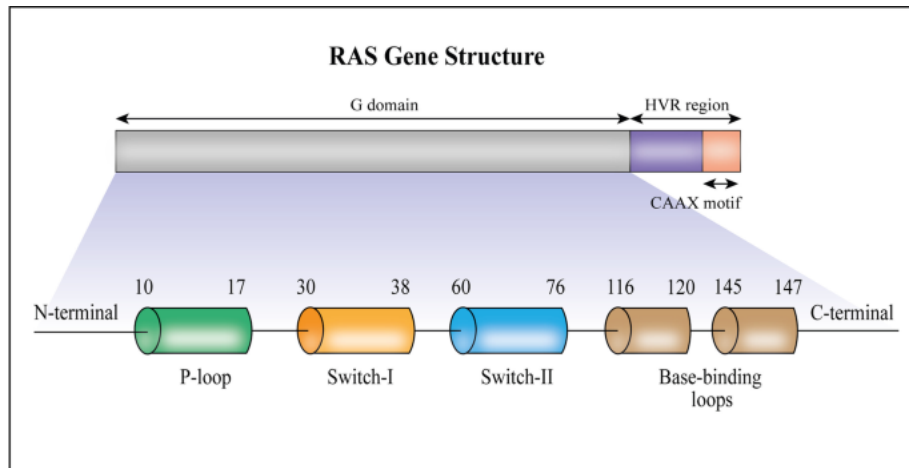


Figure 20: Domaines du gène et de la protéine KRAS (141)

ii) Type de mutation KRAS

Le PDAC est le cancer qui présente le plus fréquemment une altération de *KRAS* parmi les cancers (142) (Figure 21), avec une grande diversité de mutations du gène *KRAS* (143). L'altération la plus fréquente dans le PDAC affecte le codon G12 dans 93% des cas, mais la substitution d'acide aminé a été décrite comme différente entre les patients. La substitution la plus fréquente est G12D (41%), suivie par G12 V (34%) et G12R (16%) (144,145) (Figure 22).

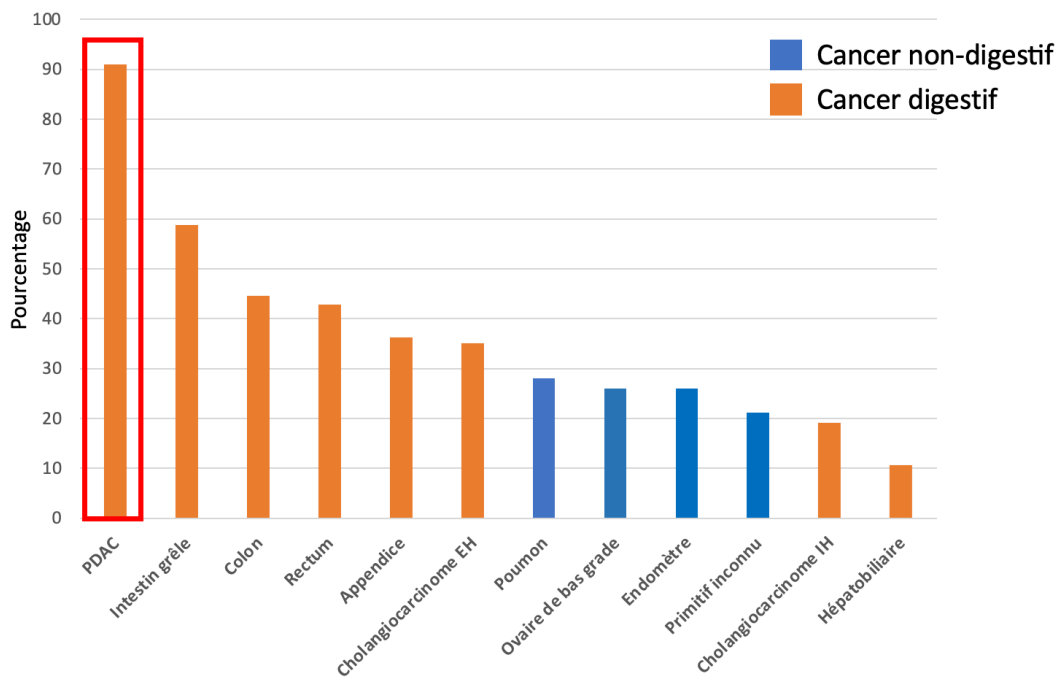


Figure 21: Pourcentage d'altérations *KRAS* (tumeurs avec prévalence >10%), d'après la cohorte GENIE v13.0-public (142)

La présence de la mutation *KRAS* est associée à une mauvaise réponse aux traitements et confère un pronostic global défavorable et à une survie plus courte chez les patients atteints de PDAC (146,147). Par conséquent, son ciblage reste un défi majeur pour le développement de nouvelles thérapies efficaces.

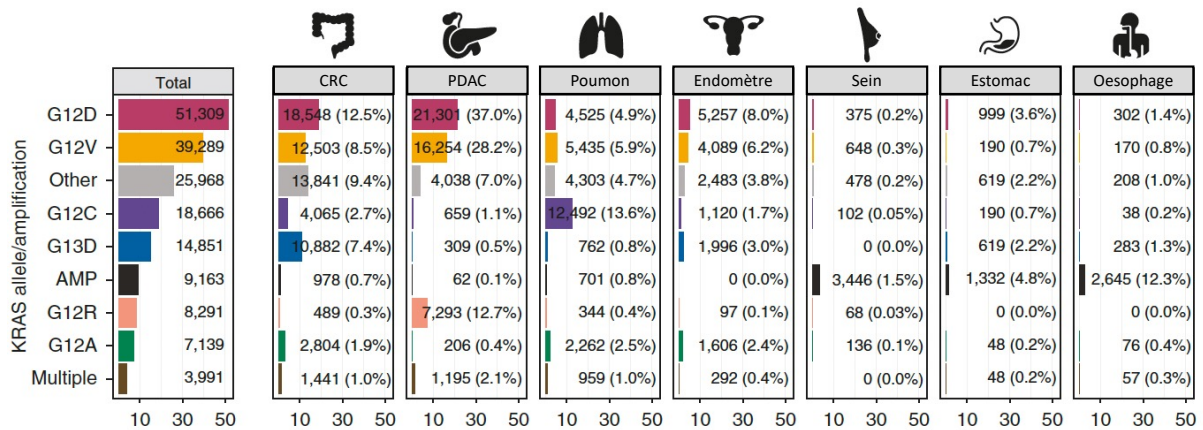


Figure 22: Nombre de patients/prévalence des altérations de *KRAS* pour différents types de cancer. CRC : colorectal ; PDAC : adénocarcinome du pancréas ; Poumon : sous-type non à petites cellules ; endomètre : carcinome de l'endomètre indifférencié ; sein : carcinome canalaire infiltrant ; Estomac : adénocarcinome gastrique ; Oesophage : Adénocarcinome oesophagien et jonction gastro-duodénale. Adapté de (133).

2. Inhibition de *KRAS* en clinique

KRAS a longtemps été considéré comme « undruggable » i.e. non ciblable pour plusieurs raisons (138,148):

- L'affinité de liaison entre *KRAS* et le GTP cytoplasmique est extrêmement élevée et limite les possibilités d'inhibition compétitive
- Les concentrations de GTP intracellulaire sont élevées
- *KRAS* manque structuralement d'une poche accessible aux médicaments pour se lier à la protéine
- Il existe de nombreux régulateurs en amont et en aval de la signalisation *KRAS*, avec des redondances de signal ce qui favorise la résistance aux anti-*KRAS*

i) Les inhibiteurs de *KRAS*_{G12C}, une révolution dans le paysage thérapeutique

La mutation G12C de *KRAS* est à présent ciblable par de nouveaux inhibiteurs qui

profitent du cycle intrinsèque de la molécule KRAS entre l'état « on » (lié au GTP) et l'état « off » (lié au GDP) (136,149). Ces inhibiteurs forment de puissantes liaisons covalentes avec la cystéine de la protéine mutante (G12C). Ainsi, ils se lient à un domaine (Switch II) quand KRAS est dans sa forme inactive (liée au GDP), ce qui piège KRAS dans sa position « off » (149). Ces inhibiteurs covalents se lient seulement à la forme mutée, et l'inhibition quasi nulle à la forme sauvage de KRAS limite les toxicités.

ii) Résultats en clinique

En août 2018, le sotorasib (AMG510) est devenu le premier inhibiteur de KRAS_{G12C} à entrer à la fois dans des essais cliniques sur l'homme et à démontrer son innocuité et son efficacité clinique. Hong et ses collègues ont rapporté les résultats d'un essai de phase I (150), multicentrique, ouvert, testant le sotorasib chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (localement avancées ou métastatiques) portant la mutation KRAS_{G12C}. Un total de 129 patients (59 patients atteints de cancer pulmonaire; 42 patients atteints de cancer colorectal; et 28 patients atteints d'autres types de tumeurs) ont été inclus dans les cohortes d'escalade des doses et d'expansion. Les patients inscrits avaient reçu une médiane de 3 (allant de 0 à 11) lignes précédentes de traitements anticancéreux pour leur maladie métastatique. Le sotorasib était administré par voie orale une fois par jour, chaque cycle de traitement durant 21 jours.

Le critère principal d'évaluation était l'incidence des effets toxiques limitant la dose (définis comme des effets toxiques liés au sotorasib dans les 21 premiers jours suivant la première dose), les événements indésirables pendant la période de traitement et les événements indésirables liés au traitement. Un total de 73 patients (56,6 %) a présenté des événements indésirables liés au traitement, et 15 patients (11,6 %) ont présenté des événements de grade 3 ou 4. Les événements indésirables liés au traitement de grade 3 les plus courants étaient des effets gastro-intestinaux ou hépatiques.

L'efficacité clinique a été étudiée en tant que critère d'évaluation secondaire et a été décrite en termes de réponse objective (réponse complète ou partielle), de contrôle de la maladie (réponse objective ou maladie stable), de durée de la réponse objective, de durée de la maladie stable et de survie sans progression. Les résultats ont été confirmés en phase II et les

résultats spécifiques aux patients atteints d'un cancer du pancréas sont présentés dans le Tableau 4 (38 patients) (151). Le sotorasib est à présent approuvé pour la prise en charge du cancer du poumon non à petites cellules.

Un autre inhibiteur, l'adagrasib (MRTX849) a également été testé en phase I et II. Les données préliminaires sur la sécurité de l'étude KRYSTAL-1 portant sur des patients atteints de tumeurs solides traités par adagrasib ont été rapportées (152,153). Les effets indésirables liés au traitement les plus fréquemment signalés (> 20%) comprennent la diarrhée (58%), les nausées (52%), la fatigue (42%) et les vomissements (36%). Parmi les 18 patients atteints de cancer colorectal évaluables pour l'activité clinique, 3 patients (17%) ont présenté une réponse objective confirmée, tandis que 17 patients (94%) ont obtenu un contrôle de la maladie. De plus, (152), des réponses partielles ont été confirmées chez une patiente atteinte de cancer de l'endomètre et chez un autre patient atteint de cancer du pancréas.

L'adagrasib et le sotorasib sont tous les deux des inhibiteurs covalents sélectifs de *KRAS_{G12C}*, mais des différences pharmacologiques entre les deux médicaments ont été rapportées, notamment la demi-vie (5 heures pour le sotorasib et 23 heures pour l'adagrasib), une exposition dépendante de la dose avec l'adagrasib et une pénétration potentielle dans le système nerveux central avec l'adagrasib (150,152).

Tableau 4: données d'efficacité et de tolérance des inhibiteurs de *KRAS_{G12C}* dans le PDAC

Critères	Adagrasib (n=21) (152)	Sotorasib (n=38) (151)
Taux de réponse objective	33% (15-57%)	21% (10-37%)
Taux de contrôle tumoral	81%	84%
Durée médiane réponse	NA	5,7 (1,6-non évaluable)
Survie dans progression	5,4 (3,9-8,2)	4,0 (2,8- 5,6)
Survie globale	8,0 (5,2-11,8)	6,9 (5,0-9,1)
Effet secondaires grade 3-4	27%	16%
Réduction de dose	40% (tumeurs solides)	13%
Arrêt pour toxicité	0%	0%

De nouveaux inhibiteurs sont en cours de développement en clinique, comme le LY3537982, qui présente un taux de réponse objective de 42 % pour le PDAC (12 patients), le divarasib (7 patients) ou en préclinique (GDC-6036, D-1553 ou garsorasib, JDQ443, BI 1823911) (154).

iii) *Combinaisons de thérapies*

Bien que les premières données des études sur la monothérapie d'adagrasib ou de sotorasib (150,152) soient prometteuses chez les patients avec des mutations $KRAS_{G12C}$, une réactivation peut se produire dans la voie de signalisation RAS-MAPK en raison d'une boucle de rétrocontrôle médiée par le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (155,156) (Figure 23). L'activation des isoformes de RAS sauvage (NRAS et HRAS) entraîne une activation de la voie MAPK en présence de l'inhibiteur de $KRAS_{G12C}$ (155,156). Ainsi, des stratégies d'inhibition verticales (double ou triple avec des anti-SHP2, MEK et/ou EGFR) peuvent augmenter l'activité des inhibiteurs de $KRAS_{G12C}$ (155,156).

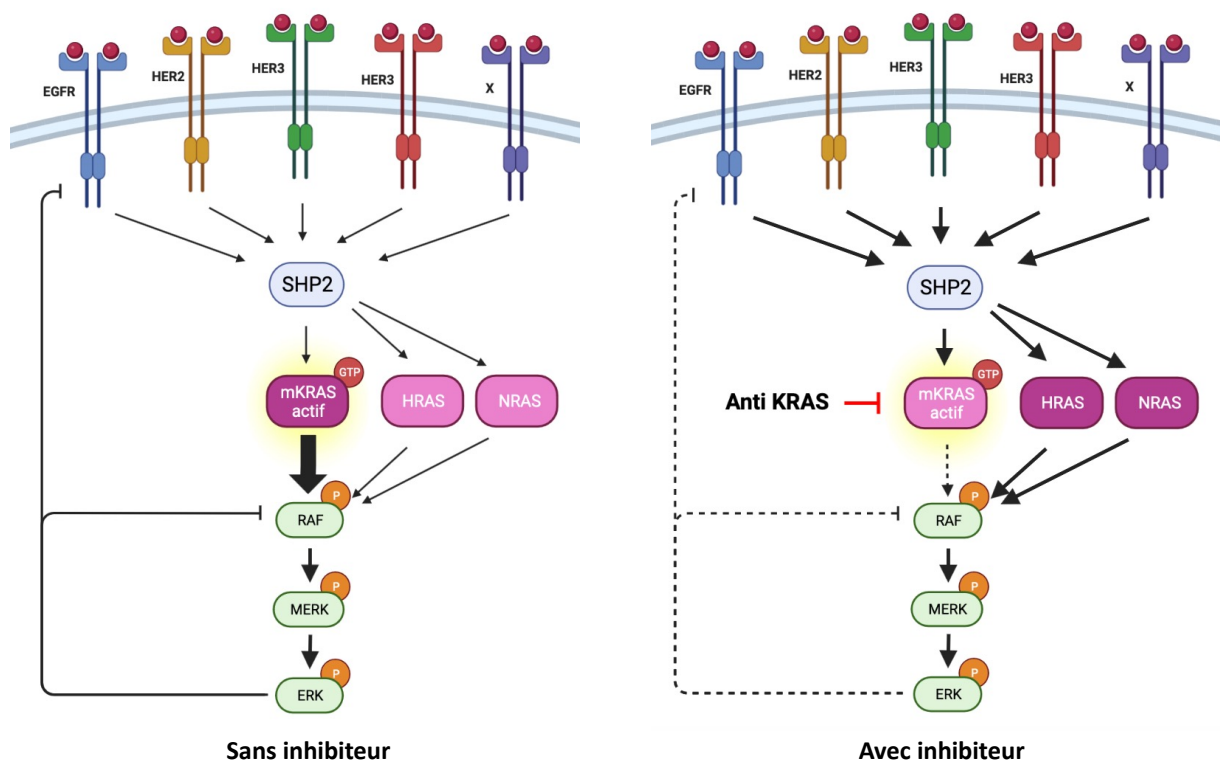


Figure 23: Mécanismes de contournement des inhibiteurs de KRAS via l'activation des formes sauvages (WT) de RAS (NRAS et HRAS) (156,157)

L'association d'un anticorps dirigé contre l'EGFR avec un inhibiteur de $KRAS_{G12C}$ est une

stratégie clinique efficace pour atténuer la réactivation de l'EGFR. Le cetuximab ou le panitumumab sont des anticorps monoclonaux anti-EGFR indiqués dans le traitement du cancer colorectal métastatique de type sauvage RAS, soit en monothérapie, soit en association avec une chimiothérapie (158,159). Dans une étude de phase Ib récente portant sur le sotorasib en association avec un anticorps monoclonal ciblant l'EGFR, le panitumumab, une réponse objective de 30 % a été rapportée chez des patients prétraités atteints d'un cancer colorectal avec une mutation *KRAS*_{G12C}, comparativement à 10 % pour la monothérapie par sotorasib (160,161). Les résultats de la phase III ont été rapportés à l'ESMO 2023, avec une survie sans progression de 5,6 mois dans le bras combinaison. Toujours dans le cancer colorectal, l'association de l'adagrasib et du cetuximab a été associée à une réponse de 46 % et à une durée médiane de réponse de 7,6 mois (162). De plus, la combinaison thérapeutique a été associée à une survie sans progression médiane de 6,9 mois, ce qui suggère un potentiel d'amélioration des bénéfices cliniques grâce à cette approche de combinaisons.

Tableau 5: Résultats de combinaison d'inhibiteurs de *KRAS*_{G12C} et d'EGFR dans le cancer colorectal

Critère	Adagrasib + Cetuximab (n=28) (162)	Sotorasib + Panitumumab (n=40) (160)
Taux de réponse objective % (IC95%)	46% (28-66)	30% (17-47)
Durée médiane de réponse Mois (IC95%)	7,6 mois (5,7 – NA)	4,4 mois (2,8 – 7,4)
Survie sans progression médiane Mois (IC95%)	6,9 mois (5,4 – 8,1)	5,7 mois (4,2 – 7,6)
Survie globale médiane Mois (IC95%)	13,4 mois (9,5-20,1)	NA

IC : intervalle de confiance ; NA : non atteint

D'autres combinaisons ont été rapportées avec le divarasib (29 patients), le garsorasib (29 patients) ou le LY3537982 (11 patients) avec des résultats similaires. Les combinaisons entre anti-*KRAS*_{G12C} et anti-EGFR n'ont pas été rapportées pour le moment dans le cancer du pancréas.

iv) Mécanismes de résistance aux anti-*KRAS*_{G12C}

Plusieurs mécanismes de résistances aux anti-*KRAS*_{G12C} ont été décrits (163) :

(i) contournement des voies de signalisation avec une réactivation de la voie KRAS-MAPK via un rétrocontrôle positif de médiateurs en amont ou en aval de la cascade KRAS-MAPK, (ii) signalisation de la voie KRAS médiée par les formes sauvages de RAS (NRAS et HRAS), (iii) augmentation de la prolifération via la désinhibition du cycle cellulaire avec reprogrammation métabolique (et notamment du métabolisme de la glutamine) et (iv) une altération de la réponse immunitaire.

3. Autres stratégies d'inhibition de KRAS

i) *Le MRTX1133, un inhibiteur spécifique de KRAS_{G12D}*

(1) *Préclinique*

La protéine correspondant au gène KRAS_{G12D}, contrairement à KRAS_{G12C}, ne contient pas de résidu permettant une liaison covalente avec la protéine, et le cycle entre forme active et inactive est différent par rapport à la protéine KRAS_{G12C} (164). Ainsi, le développement d'un inhibiteur de KRAS_{G12D} a utilisé une stratégie différente que pour les inhibiteurs de KRAS_{G12C}.

Grâce à une optimisation basée sur la structure moléculaire de KRAS, l'équipe de Mirati® a mis au point le MRTX1133 (165), un inhibiteur sélectif et puissant de KRAS_{G12D}, non covalent, avec une affinité de liaison picomolaire sur la protéine. En utilisant des techniques pour mesurer directement la liaison moléculaire, le MRTX1133 a démontré une sélectivité d'environ 700 fois plus élevée pour la liaison à KRAS_{G12D} par rapport au KRAS sauvage (165). Les différents tests pharmacologiques ont montré que le MRTX1133 se lie puissamment et sélectivement à la fois aux formes actives et inactives de KRAS_{G12D}.

Le MRTX1133 a ensuite été évalué dans des essais cellulaires pour évaluer son effet sur la signalisation KRAS et la viabilité cellulaire (166). Après un traitement de trois heures sur les lignées cellulaires de cancer HPAC (pancréatique) et GP2D (colorectal) mutantes KRAS_{G12D}, le MRTX1133 a provoqué une inhibition (concentration dépendante) des principales molécules de signalisation de la voie KRAS, dont la phospho-ERK (pERK) (165,166), avec des valeurs d'IC50 allant de 0,6 nM à 13,7 nM (IC50 médiane: 6,1 nM). Au contraire, les valeurs d'IC50 allaient de 151 nM à plus de 3000 nM (IC50 médiane: > 3000 nM) dans les lignées cellulaires non mutantes KRAS_{G12D}. En observant cette fois la viabilité cellulaire, le MRTX1133 inhibait les lignées 2D et 3D KRAS_{G12D} avec des valeurs IC50 allant de 1,4 nM à 42,3 nM (3D) et

entre 1,5 nM et 299 nM (2D). Ces données démontrent que le MRTX1133 inhibe de manière puissante et sélective la signalisation médiée par KRAS et la viabilité de la grande majorité des lignées cellulaires cancéreuses mutantes *KRAS*_{G12D} (modèles *in vitro*).

Le MRTX1133 a ensuite été évalué dans des souris immunodéprimées portant des xénogreffes de tumeurs avec la mutation *KRAS*_{G12D} afin de déterminer son effet sur la signalisation médiée par KRAS et de caractériser son activité antitumorale *in vivo*. Le MRTX1133 a ainsi induit une régression tumorale de 30 % ou plus dans 11 des 25 modèles de mutants *KRAS*_{G12D} (PDX ou lignées cellulaires) (167). Cette activité antitumorale était particulièrement importante dans les modèles de cancer du pancréas où 8 des 11 (73 %) modèles ont présenté une régression tumorale de 30 % ou plus (167). Une autre étude a montré que parallèlement à l'apoptose des cellules tumorales et à l'arrêt de la prolifération, le MRTX1133 a entraîné des changements marqués du microenvironnement tumoral, notamment au niveau des fibroblastes, de la matrice et des macrophages (168). Les cellules T étaient nécessaires pour que le MRTX1133 ait un effet antitumoral complet, et la déplétion des cellules T a accéléré la repousse de la tumeur après le traitement (168).

(2) Perspectives de combinaison

(a) EGFR

Quelques récentes études ont validé l'intérêt de la combinaison du MRTX1133 avec les anti-EGFR (toutes publiées en 2023). En effet bien que le traitement par MRTX1133 ait conduit à une activité antitumorale marquée dans la plupart des modèles testés, un sous-ensemble de modèles était moins sensible à MRTX1133 et présentait une inhibition de la croissance tumorale ou une maladie stable comme meilleure réponse. Des données supplémentaires obtenues à l'aide d'un screen CRISPR-Cas9 suggèrent que le ciblage conjoint de l'EGFR, de PI3K α (codé par le gène PIK3CA) ou de SHP2 (codé par le gène PTPN11) pourraient compléter l'inhibition de *KRAS*_{G12D} et représenter des stratégies thérapeutiques pour augmenter l'activité du MRTX1133 (166).

Une étude rapporte également que le MRTX1133 provoque un arrêt réversible de la croissance des cellules de CRC mutées *KRAS*_{G12D}, accompagné d'une réactivation partielle de la signalisation des effecteurs de RAS (157). Grâce à un criblage par létalité synthétique, il a été montré que l'inhibition de l'EGFR était synthétiquement létale avec le MRTX1133. Sur le

plan mécanistique, le MRTX1133 a réduit l'expression ERFFI1, un régulateur négatif crucial de l'EGFR, ce qui a entraîné une activation rétroactive de l'EGFR. Notamment, les isoformes sauvages de RAS, y compris HRAS et NRAS, mais pas le KRAS oncogénique, transmettait la signalisation en aval de l'EGFR activé, entraînant un rebond de la signalisation des effecteurs de RAS et une réduction de l'efficacité de MRTX1133 (Figure 24). Le blocage de l'EGFR activé avec des anticorps ou des inhibiteurs de tyrosine kinase supprimait cet axe de signalisation EGFR/RAS sauvage, et donc sensibilisait les cellules au MRTX1133 (modèles d'organoïdes ou xénogreffes) (157).

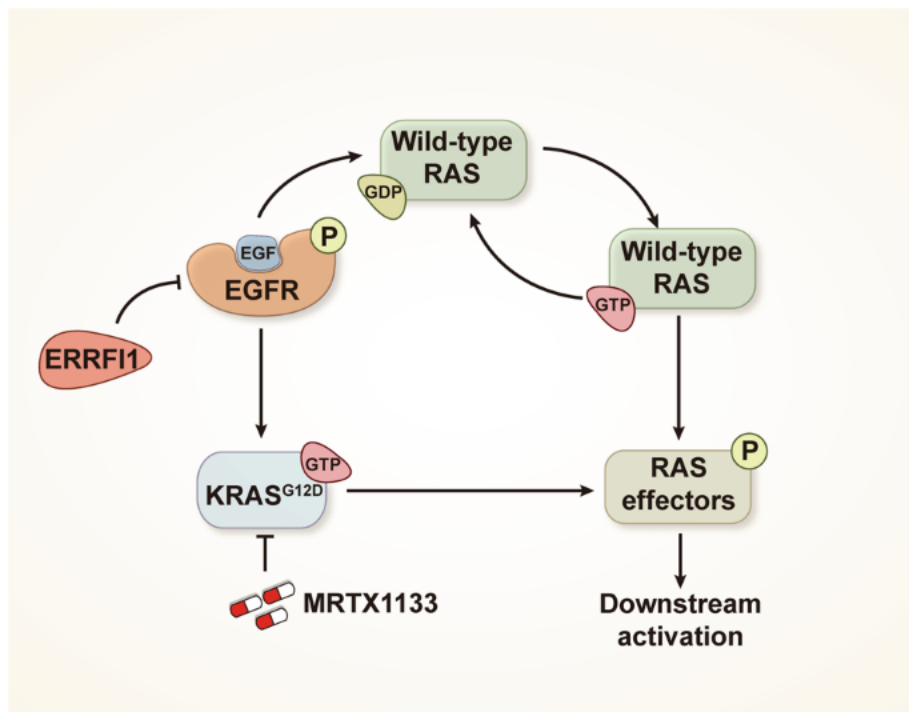


Figure 24: Mécanisme proposé de résistance primaire au MRTX1133(157)

Une autre étude montre que le MRTX1133 a augmenté l'expression et la phosphorylation d'EGFR (ERBB1) et HER2 (ERBB2) (169). L'utilisation d'un inhibiteur pan-ERBB irréversible, l'afatinib, a fortement synergisé avec le MRTX1133 *in vitro*, et des cellules cancéreuses présentant une résistance acquise à MRTX1133 *in vitro* sont redevenues sensibles sous cette combinaison thérapeutique. Enfin, la combinaison de MRTX1133 et de l'afatinib a entraîné une régression tumorale et une survie plus longue dans des modèles murins de PDAC orthotopique (169).

(b) *Inhibiteurs de checkpoints immunitaires*

Une caractéristique qui complique la prise en charge du PDAC sur le plan thérapeutique est le microenvironnement tumoral (TME) immunosuppresseur qui comprend des cellules immunitaires, des fibroblastes associés au cancer (CAF) et une matrice extracellulaire dense. Le TME du PDAC contribue à la progression de la maladie et on pense qu'il limite l'efficacité des interventions thérapeutiques (170). Ces caractéristiques sont reproduites dans un modèle de souris génétiquement modifiée qui intègre les mutations *KRAS*_{G12D} et *TP53*_{R172H} (KPC) et dans lequel les cellules tumorales peuvent être identifiées grâce à une marque de lignée YFP (KPC/Y) (171,172). A noter que les souris KPC/Y porteuses de tumeurs sont réfractaires à la plupart des interventions thérapeutiques (173), ce qui rend ce modèle utile pour prioriser les candidats thérapeutiques et définir leurs mécanismes d'action dans un environnement immunocompétent. Ce modèle KPC/Y et plusieurs de ses dérivés clonaux a été testé pour évaluer l'efficacité et l'impact biologique du MRTX1133 (168).

Les auteurs ont montré que le MRTX1133 entraînait une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire dès le début du traitement, induisant une régression tumorale(168). Il a été également montré que le médicament provoque des changements du TME, qui peuvent contribuer à l'effet antitumoral, notamment une augmentation des macrophages associés à la tumeur (avec l'adoption d'un phénotype de type M1) et des myofibroblastes α SMA+ (des types de cellules connues pour leurs propriétés inhibitrices de la tumeur). Le MRTX1133 induisait également une augmentation de l'infiltration des cellules T tumorales et un rôle de l'immunité médiée par les cellules T dans l'obtention de régressions tumorales plus profondes et d'un contrôle durable de la maladie.

Ces observations soutiennent l'intérêt d'associer le MRTX1133 avec l'immunothérapie (inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL), ou thérapie cellulaire CAR T), stimulant le système immunitaire du patient à travailler avec le médicament pour obtenir une éradication complète et durable de la tumeur et pourraient mener à des essais thérapeutiques spécifiques (174,175).

ii) *Autres classes thérapeutiques anti-KRAS*

Depuis ces dernières années, on assiste à l'émergence de trois grandes classes de médicaments anti-KRAS : des médicaments ciblant sélectivement des variants mutants de

KRAS (G12C, G12D, etc) que nous avons décrits ci-avant, des inhibiteurs pan-*KRAS* ciblant un large et diversifié spectre d'altérations de *KRAS*, couvrant les mutations et les amplifications, et des inhibiteurs indirects de *KRAS* (SOS1, SHP2) (136,138,144,148,154).

(1) *Inhibiteurs pan-KRAS*

En utilisant le criblage de fragments de *KRAS* et la conception de médicaments basée sur une approche structurale, Boehringer Ingelheim® a récemment annoncé la découverte d'inhibiteurs directs de *KRAS* pan-spécifiques et de chimères de dégradation protéolitique ciblant *KRAS* (PROTAC), capables d'épargner *NRAS* et *HRAS* (133). Cette nouvelle classe émergente de médicaments (PROTAC), dégrade spécifiquement les protéines via le système de dégradation des protéines cellulaires (176). Ces molécules interagissent simultanément avec une protéine d'intérêt et une ligase E3, formant un complexe ternaire qui permet à la ligase E3 d'ubiquitiner et d'induire la dégradation de la protéine cible (177).

Il semble également possible de cibler un large spectre de mutations *KRAS* au moyen de différents inhibiteurs pan-RAS qui bloquent les trois isoformes de RAS : *KRAS*, *NRAS* et *HRAS*. La stratégie pan-RAS adoptée par Boehringer Ingelheim® se concentre sur les inhibiteurs de la poche switch I/II (Figure 20), comme le composé BI-2865 (178,179). Cet inhibiteur non covalent se lie préférentiellement et avec une forte affinité à l'état inactif de *KRAS* tout en préservant *NRAS* et *HRAS* (179). Il bloque l'échange de nucléotides pour empêcher l'activation de *KRAS* sauvage ainsi qu'une large gamme de mutations de *KRAS*, notamment G12A/C/D/F/V/S, G13C/D, V14I, L19F, Q22K, D33E, Q61H, K117N et A146V/T. L'inhibition de la signalisation en aval et de la prolifération est limitée aux cellules cancéreuses portant une mutation de *KRAS*, et le traitement par le médicament empêche la croissance des tumeurs *KRAS* mutantes chez les souris, sans avoir d'effet néfaste sur le poids des animaux.

Revolution Medicines® a utilisé une autre approche de liaison moléculaire pour découvrir le RMC-6236, décrit comme un puissant inhibiteur de RAS, disponible par voie orale (180). L'efficacité pré-clinique de ces inhibiteurs a été établie (133). Les résultats de la phase I ont été décrits à l'ESMO 2023, avec un taux de réponse de 20% chez les patients atteints d'un PDAC (65 patients traités, 46 patients évaluable). Il reste à établir si le ciblage simultané des trois isoformes de RAS seront compatibles avec l'obtention d'une fenêtre thérapeutique chez les patients (i.e. avec des toxicités gérables) mais les premières données de l'essai de phase I

sont rassurantes, avec des rashes et des troubles gastro-intestinaux principalement. Le Tableau 6 récapitule les différents inhibiteurs de *KRAS* en développement.

Tableau 6: Principaux inhibiteurs de KRAS en développement (mi-2023)

Type d'inhibiteur	Cible	Statut
Inhibiteur spécifique		
Sotorasib/ AMG 510 (Amgen)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Approuvé
Adagrasib/ MRTX849 (Mirati)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
D-1553 (InventisBio)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
JDQ443 (Novartis)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
RG6330 / GDC-6036 (Roche)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
LY3537982 (Eli Lilly)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
BI 1823911(Boehringer Ingelheim)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
JAB-21822 (Jacobio)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
GFH925 (GenFleet)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
GH35 (Genhouse Bio)	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
RMC-6291c	<i>KRAS</i> _{G12C}	Clinique
MRTX1133 (Mirati)	<i>KRAS</i> _{G12D}	Clinique
KRASG12DI-3 (Boehringer Ingelheim)	<i>KRAS</i> _{G12D}	Pré-clinique
RAS(ON) G12D (Revolution Medicines)	<i>KRAS</i> _{G12D}	Pré-clinique
RAS(ON) G13C (Revolution Medicines)	<i>KRAS</i> _{G13C}	Pré-clinique
Inhibiteur SHP2		
TN0155 (Novartis)	<i>SHP2</i>	Clinique
RMC-4630 (Revolution Medicines)	<i>SHP2</i>	Clinique
JAB-3068 (Jacobio)	<i>SHP2</i>	Clinique
JAB-3312 (Jacobio)	<i>SHP2</i>	Clinique
RG-6433/RLY-1971(Roche/Genentech)	<i>SHP2</i>	Clinique
BBP-398 (BridgeBio/Navire)	<i>SHP2</i>	Clinique
ERAS-601(Erasca)	<i>SHP2</i>	Clinique
PF-07284892 / ARRY-558 (Pfizer)	<i>SHP2</i>	Clinique
SH3809 (Nanjing Sanhome)	<i>SHP2</i>	Clinique
Pan-KRAS		
RSC-1255 (RasCal Therapeutics)	Pan- <i>RAS</i>	Clinique
BI-pan-KRASI-4 inhibitors (Boehringer Ingelheim)	<i>KRAS</i> _{G12D/V} , <i>KRAS</i> WT	Pré-clinique
BI-pan-KRASdegraderl (Boehringer Ingelheim)	<i>KRAS</i> _{G12C/D/N/A} , <i>KRAS</i> _{G13C} , <i>KRAS</i> _{A146T/P} , <i>KRAS</i> _{Q61E/P} , <i>KRAS</i> WT	Pré-clinique
RMC-6236 (Revolution Medicines)	<i>KRAS</i> _{G12D/V} , <i>KRAS</i> _{G13D} , <i>KRAS</i> _{Q61K} , <i>KRAS</i> WT	Clinique
SOS inhibitor		
BI 1701963 (Boehringer Ingelheim)	<i>SOS</i>	Clinique
RMC-5845 (Revolution Medicines)	<i>SOS</i>	Pré-clinique
BAY-293 (Bayer)	<i>SOS</i>	Pré-clinique
SDGR5 (Schrödinger/BMS)	<i>SOS</i>	Pré-clinique
GH52 (Genhouse Bio) ERAS-9 (Erasca)	<i>SOS</i>	Pré-clinique
SOSli (Mirati)	<i>SOS</i>	Pré-clinique

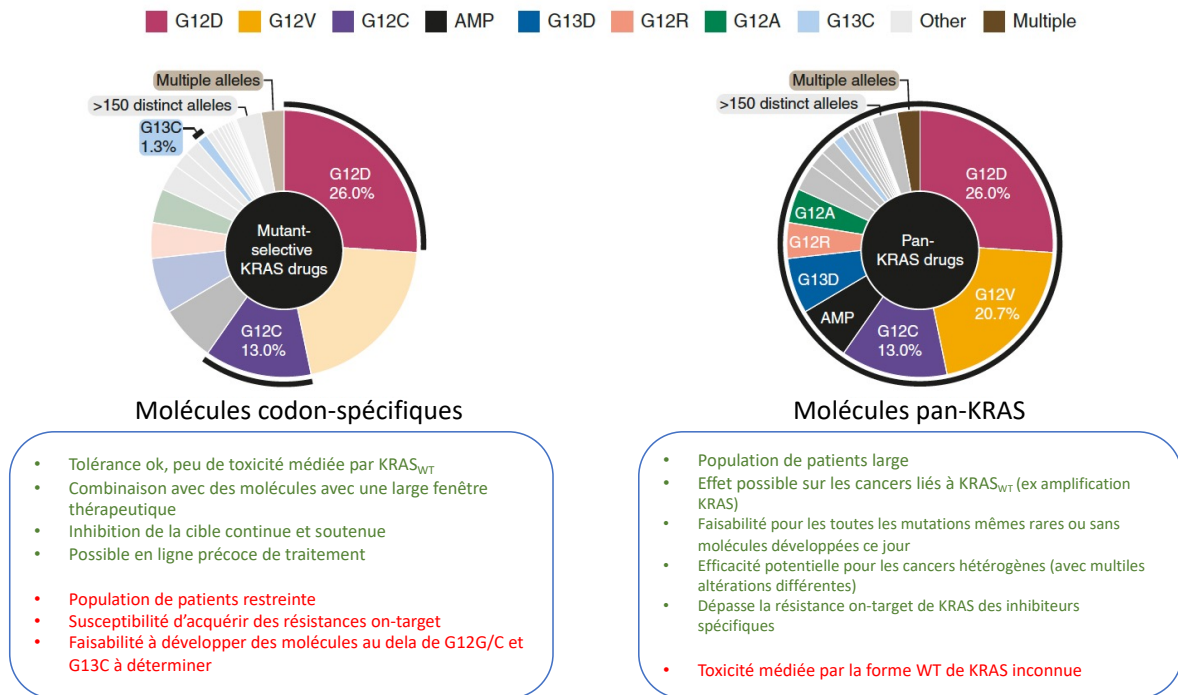


Figure 25: Avantages et inconvénients des différentes stratégies d'inhibition de KRAS (133,148)

(2) Inhibition indirecte

Plusieurs médicaments ciblant indirectement KRAS sont actuellement en développement, en interférant avec l'échange de nucléotides et l'activation de KRAS via l'inhibition de SHP2 ou de SOS1 (181–185). Le rationnel des inhibiteurs de SHP2 et SOS1 en tant qu'inhibiteurs pan-KRAS repose sur le cycle de KRAS entre un état inactif et actif qui est dépendant (i) d'une activation en amont et (ii) de l'échange de nucléotides.

Les inhibiteurs de SHP2 stabilisent une conformation de l'enzyme inhibée et perturbent ainsi l'échange de nucléotides de KRAS médié par SOS1 (183,186,187). Des inhibiteurs de SHP2, le RMC-4630, le TNO155 et le JAB-3068, ont atteint la phase II des essais cliniques. Dans une étude de phase I/II (NCT03634982) avec le RMC-4630 incluant des patients atteints de tumeurs présentant des altérations de RAS (dont amplification de KRAS), les premières données cliniques ont montré un taux de contrôle de la maladie de 71 % (5/7 patients) avec une réduction du volume tumoral observée chez trois patients (43 %) et une réponse objective confirmée chez un patient atteint d'un cancer du poumon muté KRAS_{G12C} (188). Les premières données cliniques dans une étude de phase I (NCT03114319) avec l'inhibiteur de SHP2 TNO155 ont montré une sensibilité de certaines tumeurs mutées KRAS_{G12},

en particulier le cancer du poumon muté *KRAS*_{G12C} et le mélanome sans mutation *BRAF/NRAS*, mais l'absence de réponses partielles (189).

Les inhibiteurs de SOS1 bloquent l'interaction entre SOS1 et KRAS-GDP, empêchant l'échange de nucléotides et le chargement de GTP de KRAS (184). BI-1701963 est actuellement le seul inhibiteur de SOS1 faisant l'objet d'essais cliniques. BI-1701963 a été généralement bien toléré, avec une dose maximale tolérée atteinte à 800 mg, et une maladie stable jusqu'à 18 semaines chez 7 patients sur 31 atteints de tumeurs solides présentant des mutations de *KRAS* a été démontrée (190).

En amont de *KRAS*, les inhibiteurs de SOS1 et de SHP2 suscitent également un intérêt dans le cadre de combinaisons thérapeutiques, pour déterminer si le blocage vertical des différentes voies peut "resserrer l'emprise" sur la voie *KRAS*/MAPK et ainsi augmenter les taux et la durée des réponses. Les inhibiteurs de SHP2 et le BI-1701963 sont associés à des inhibiteurs de MEK (NCT04294160, NCT03989115, NCT04720976, NCT04111458 et NCT048357) pour améliorer la modulation de la voie MAPK et supprimer la réactivation de la voie induite par le soulagement du contrôle par rétroaction négative. Les inhibiteurs de SHP2 sont également associés à des inhibiteurs de ERK (NCT04916236) et à des inhibiteurs de l'EGFR (NCT03989115 et NCT03114319). Étant donné que les inhibiteurs de SOS1 et de SHP2 modifient l'équilibre de *KRAS* vers l'état lié au GDP, il serait également logique de combiner ces modulateurs indirects de *KRAS* avec des inhibiteurs spécifiques des mutations *KRAS*, tels que les inhibiteurs covalents de *KRAS*_{G12C} qui se lient à *KRAS* dans son état lié au GDP.

III. LES ORGANOÏDES, DES AVATARS DE LA TUMEUR

La biologie fondamentale du cancer a été largement étudiée en utilisant des lignées de cellules cancéreuses, qui sont faciles à cultiver au laboratoire. Cependant, lorsque ces cellules sont cultivées sur des supports artificiels rigides en l'absence de la matrice extracellulaire, elles s'éloignent du cancer d'origine et ne représentent pas fidèlement l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale des cancers (191). De plus, le séquençage pangénomique des lignées de cellules cancéreuses humaines (sein, mélanome, poumon, foie) a révélé l'accumulation d'anomalies génétiques qui ne sont pas présentes dans la tumeur initiale (192). Par conséquent, les lignées cellulaires ont une représentativité limitée des tumeurs dont elles sont dérivées et sont limitées pour décrypter les mécanismes de la carcinogenèse ou pour identifier de nouveaux traitements.

A. MISE AU POINT DES ORGANOÏDES

1. Développement d'organoïdes dérivés de tumeur

i) Les organoïdes, définition et principes du modèle

Les organoïdes sont des structures pluricellulaires, capables de s'autorenouveler et de s'auto organiser, ainsi que de maintenir un aspect et des fonctionnalités similaires au tissu dont elles proviennent. Les organoïdes sont composés des multiples types cellulaires spécifiques d'un organe donné et cultivés au laboratoire dans un environnement tridimensionnel (193). Ils peuvent également être maintenus en culture et amplifiés par des passages tout en conservant leur stabilité génétique. Initialement développés à partir de tissu intestinal et colique (193), des organoïdes ont à présent été obtenus à partir de divers organes et types tumoraux (194) (pancréas, cerveau, prostate, sein, poumon, etc) (Figure 26). Les organoïdes peuvent être obtenus à partir de tissus primaires, de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes (hPSC) (195) qui peuvent ensuite être différenciées pour reproduire le type cellulaire choisi (196).

Mis au point en 2009 pour la première fois dans le laboratoire de Hans Clevers (Hubrecht Institute, Utrecht, Pays-Bas), les organoïdes ont d'abord été obtenus à partir des cellules souches intestinales adultes murines (isolées ou dans les cryptes intestinales) (193)

pour reproduire des structures intestinales saines.

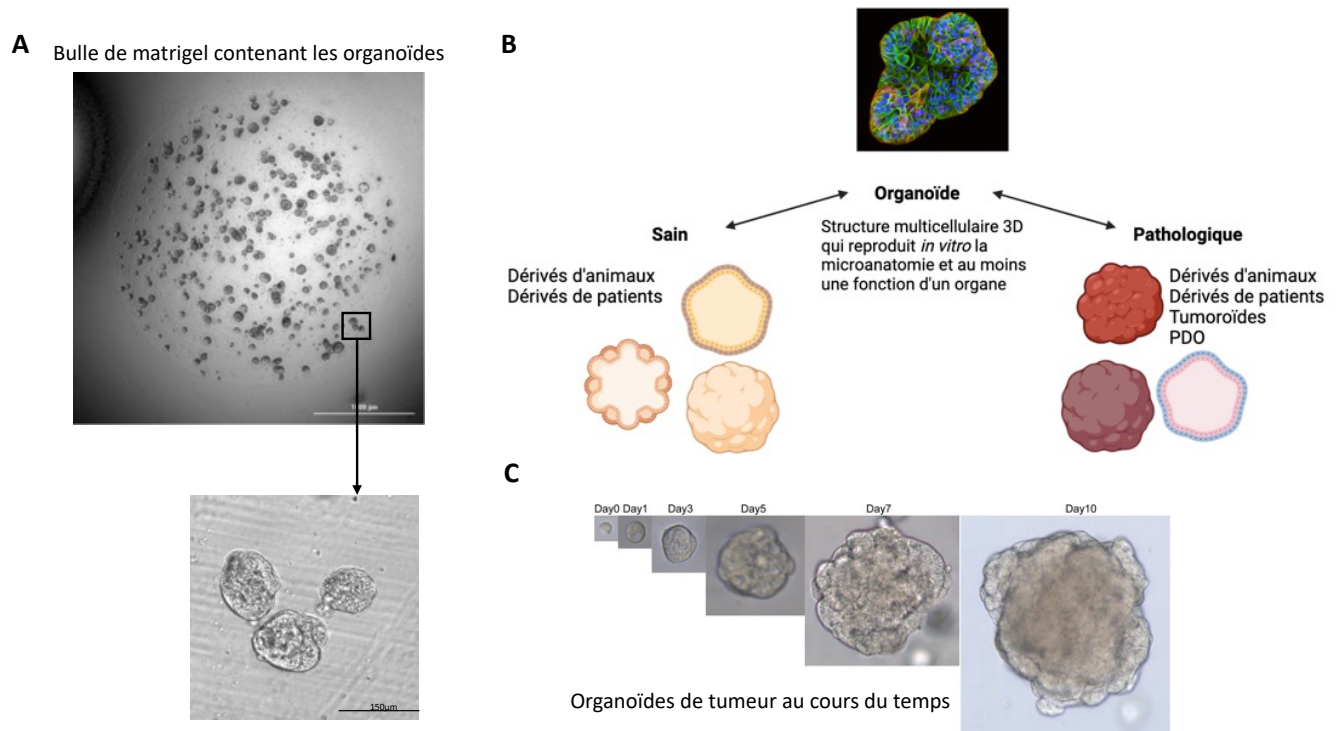


Figure 26: Culture des organoïdes. A. Exemple de bulle de matrigel comportant des organoïdes avec zoom sur des organoïdes de PDAC. B Principe des organoïdes (adapté du site de l'université de Nantes avec Biorender). C. Exemple de croissance d'un organoïde de cancer colorectal (194)

La culture des organoïdes est possible grâce à un milieu de culture riche, qui mime les facteurs sécrétés par la « niche » environnementale des cellules souches et contient des facteurs de croissance indispensables (194,197–200) :

1) R-spondin1, agoniste de WNT, qui induit une hyperplasie des cryptes (organoïdes intestinaux/coliques) ; ainsi que le ligand de WNT (WNT3A) pour certains modèles tumoraux

2) le facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*, EGF), qui permet une prolifération accrue, ainsi que le FGF (*Fibroblast Growth Factor*);

3) Noggin, un inhibiteur de la voie TGF- β qui induit également la prolifération cellulaire;

4) un inhibiteur de TGF- β (A83-01) et un inhibiteur de p38 (SB202190) (voie MAPK);

Les organoïdes sont cultivés dans du Matrigel®, matrice riche en laminine (qui est physiologiquement enrichie dans la matrice extracellulaire) qui permet de reproduire un environnement extracellulaire. Les organoïdes de tumeur, en fonction de leurs altérations génétiques (notamment mutation de *KRAS*), nécessitent en général moins de facteurs (194) que les organoïdes de tissu sain et les composants précis de ce milieu de culture sont variables en fonction du type de tissu (organe, sain ou tumoral) et de l'origine (humaine ou murine) des cellules.

ii) Type de tumeurs cultivables en organoïdes

En 2011, le laboratoire de Hans Clevers a mis au point un protocole pour cultiver des adénocarcinomes coliques en organoïdes (194). Ces organoïdes tumoraux, générés à partir de biopsies ou de prélèvements chirurgicaux, poussent en structures plus compactes et irrégulières que le tissu sain. Différents types tumoraux sont cultivables à présent en organoïdes, notamment la majorité des carcinomes digestifs (Figure 27).

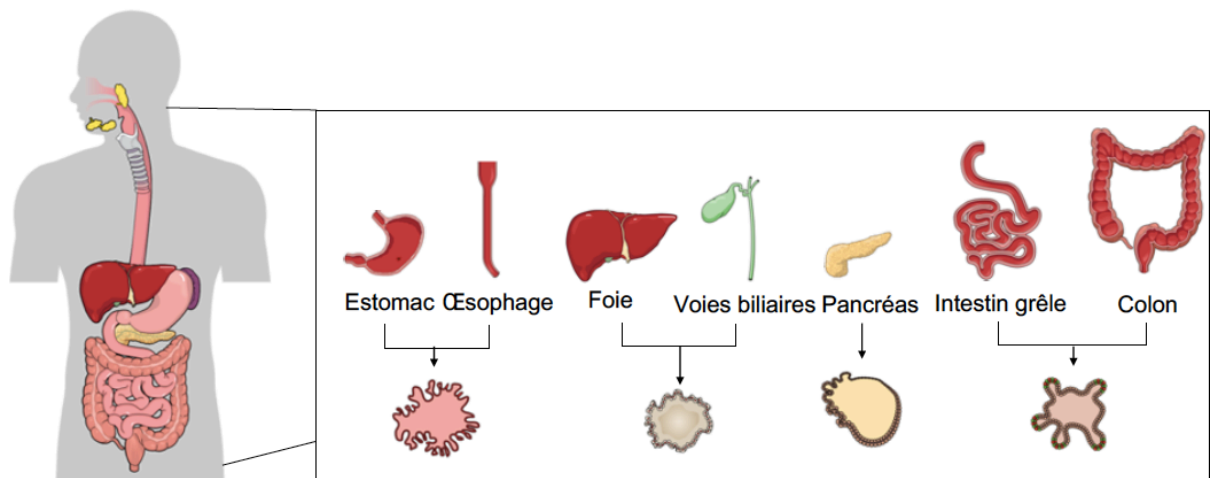


Figure 27: Principales tumeurs digestives cultivables en organoïdes (202)

Ces organoïdes tumoraux présentent des mutations qui leur permettent de s'affranchir des facteurs de la niche (l'activation de WNT avec les mutations d'*APC*, l'activation de la voie MAPK avec les mutations *KRAS*, l'inhibition de la voie TGFβ avec les mutations de *SMAD4* et *TGFβ-R*) et poussent donc, pour la plupart, dans un milieu plus simple que les organoïdes de tissu sain (194,199). Par exemple, l'introduction de 4 mutations (*APC*, *SMAD4*, *TP53* et *KRAS_{G12D}*) dans des organoïdes coliques sains humains a montré que ces organoïdes

mutés pouvaient se développer sans les facteurs WNT3A, R-spondin-1 et EGF (201). Cette étude a mis en évidence l'impact des mutations oncogéniques dans la capacité des tumeurs à échapper aux facteurs de croissance, et a démontré l'utilité des organoïdes dans la compréhension de la transition de l'adénome à l'adénocarcinome.

iii) Organoïdes de PDAC

En 2013, la Dr Huch (au sein du laboratoire de Hans Clevers) a adapté le protocole de culture des organoïdes pour les tissus pancréatiques, permettant ainsi de créer des organoïdes de pancréas sains (203). Plus tard, en 2015, Boj et al. (197) ont réussi à produire les premiers organoïdes d'adénocarcinome pancréatique à la fois murin et humain en incorporant les cellules pancréatiques dans une matrice de Matrigel enrichie en facteurs spécifiques. Ces organoïdes présentaient toutes les caractéristiques des tissus normaux et tumoraux du pancréas, et gardaient une similarité physio/pathologiquement aux tissus d'origine. De plus, lors de la transplantation orthotopique de ces organoïdes tumoraux dans des souris immunodéficientes, il a été observé la formation de lésions pré-invasives similaires aux néoplasies intraépithéliales pancréatiques, qui peuvent évoluer en adénocarcinome. Ce modèle était donc une approche prometteuse pour l'étude de la progression du PDAC *ex vivo*.

D'autres approches de culture des organoïdes ont été publiées (204) (Figure 28). Le laboratoire de Melissa Skala a décrit une méthode assez similaire pour cultiver des organoïdes de PDAC dans du Matrigel (205). Les tumeurs de PDAC étaient isolées à partir de souris, digérées, puis incorporées dans un mélange de 50%/50% de Matrigel et de milieu de culture contenant du sérum. Dans ces conditions, à la fois les fibroblastes et les cellules tumorales positives pour la cytokératine ont pu se propager, ces dernières formant des organoïdes sphériques et asymétriques. Senthil Muthuswamy et ses collègues ont rapporté une troisième méthode de génération de cultures d'organoïdes pancréatiques (206). Des cellules souches pluripotentes humaines ont été converties en cellules progénitrices pancréatiques *in vitro*, puis cultivées dans un milieu de culture sur un lit de Matrigel. Dans ces conditions, les progéniteurs s'organisaient en sphères kystiques sécrétant une couche externe de membrane basale et conservaient des schémas d'expression génique similaires à ceux des cellules progénitrices pancréatiques. L'ajout de ligands exogènes pour stimuler la voie de signalisation Wnt n'était

pas nécessaire pour maintenir ces cultures. Le groupe de Muthuswamy a étendu cette méthode pour générer des cultures d'organoïdes à partir de PDAC humaines réséqués avec une grande efficacité (206).

Enfin, Calvin Kuo a développé une méthode distincte pour cultiver les cellules du pancréas sous forme d'organoïdes (207), en utilisant une méthode dite "interface air-liquide" (ALI) dans laquelle des fragments de tissu embryonnaire sont cultivés dans un gel de collagène de type I reposant sur un substrat perméable avec un milieu en dessous, permettant aux nutriments de diffuser par le bas. Le sommet de la culture est exposé à l'air, permettant ainsi aux cellules de recevoir des niveaux d'oxygène plus élevés que dans les méthodes de culture traditionnelles et évitant la mort par hypoxie. Lorsqu'ils sont cultivés en tant que cultures ALI, les tissus pancréatiques néonataux murins forment des organoïdes kystiques composés principalement de cellules épithéliales canalaire, entourées de cellules stromales. Ces cultures ne nécessitaient pas de supplémentation en facteurs de croissance exogènes et étaient viables pendant une durée allant jusqu'à 50 jours, mais ne pouvaient pas être multipliées.

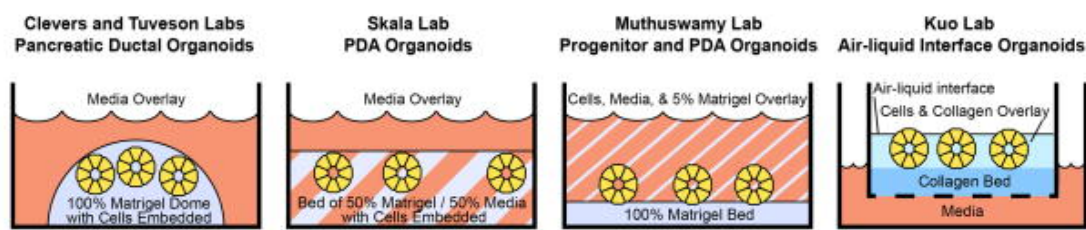


Figure 28: Différents modèles de cultures d'organoïdes (197,205,206,208)

2. Corrélation phénotypique et moléculaire des organoïdes avec leur tumeur d'origine

i) Corrélation phénotypique

Différentes biobanques d'organoïdes ont été générées à partir de PDAC, notamment celle décrite par une autre étude du laboratoire de Hans Clevers, où les organoïdes issus de PDAC ont été caractérisés par génomique, transcriptomique et tests de sensibilité aux médicaments (209,210). Une caractéristique de cette étude était que les tissus prélevés lors de biopsies (n=2 PDO) ou de résections chirurgicales (n=50 organoïdes) ont été digérés puis cultivés dans deux types de milieux, appelés milieu tumoral 1 (TM1) et milieu tumoral 2 (TM2).

Le TM1 contenait tous les composants du milieu pancréatique complet (CM) à l'exception de l'EGF et du PGE2, tandis que le TM2 ne contient pas de PGE2, WNT et l'inhibiteur de TGF- β A83-01. Les échantillons étaient cultivés dans les deux milieux indépendamment. Si des organoïdes se développaient dans les deux milieux, les deux cultures étaient maintenues en parallèle et comparées ultérieurement. Le taux de prise globale était de 62% (31% pour les biopsies). La morphologie des organoïdes tumorales différait, allant de structures kystiques (avec une lumière claire ou pleine) à des structures denses. La comparaison de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) des PDOs et des tissus tumoraux correspondants a révélé des similitudes morphologiques entre les PDOs et les tissus tumoraux, avec une atypie cellulaire, y compris une localisation aberrante des noyaux, selon l'évaluation pathologique.

A noter qu'une seule culture d'organoïdes de PDAC peut présenter de multiples histologies différentes, rappelant les multiples histologies pouvant être observées dans la tumeur primaire, ce qui suggère que ce système de culture peut capturer l'hétérogénéité intratumorale présente dans les tumeurs primaires (198,206,210).

ii) Génomique

Les premières études montrant la stabilité génomique des organoïdes ont été faites dans le cancer colorectal (211). Un séquençage du génome de 1977 gènes impliqués dans la cancérogénèse à partir de 14 organoïdes dérivés de cancers colorectaux métastatiques a montré que les mutations somatiques étaient partagées à 90% entre les organoïdes et les biopsies du même patient (211). Dans une autre étude, le paysage mutationnel d'organoïdes dérivés de métastases de cancers digestifs a été comparé aux biopsies initiales, avec une correspondance de 96% (212).

Plus spécifiquement pour le PDAC, plusieurs groupes ont réalisé des séquençages ciblés de l'exome et du génome entier pour démontrer la bonne concordance génomique entre les tumeurs primaires du PDAC et leurs modèles dérivés (213–215) avec une corrélation de 78 % (213) (certains organoïdes qui provenaient finalement de cellules saines ont été exclus des analyses ultérieures) à 90% (214). Les quatre gènes les plus fréquemment altérés dans le PDAC (*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*) sont retrouvés dans les organoïdes et on observe une détection plus importante des mutations somatiques détectées dans les cultures d'organoïdes en raison de la nature pauci-cellulaire des tumeurs primaires et de la pureté en cellules

tumorales élevée des organoïdes. Alors que le séquençage génétique des échantillons de tissu primaire de PDAC peut être rendu difficile en raison de la faible cellularité tumorale, la profondeur élevée réalisable sur les organoïdes offre ainsi des moyens alternatifs d'identifier des altérations génétiques d'intérêt chez les patients atteints de PDAC.

iii) Transcriptomique

Les organoïdes fournissent un nouvel outil spécifique pour étudier l'expression génique (ou transcriptome) dans les cellules épithéliales des tumeurs pancréatiques, sans contamination par les cellules hématopoïétiques, mésenchymateuses ou immunitaires (stroma) et le transcriptome des organoïdes reflète probablement plus celui de la tumeur initiale que le transcriptome réalisé sur biopsies tumorales car celles-ci sont contaminées par le stroma (199).

L'analyse transcriptomique des organoïdes de PDAC a permis la description de sous-types moléculaires à partir des tumeurs des patients par plusieurs groupes, et les deux sous-types majeurs ont été identifiés de manière cohérente (66–68). Le premier sous-type, basal-like (squameux ou quasi-mésenchymateux), identifie les patients avec un mauvais pronostic et est caractérisé par l'expression de TP63 et d'autres marqueurs basaux. Le deuxième sous-type, appelé classique (ou progéniteur pancréatique) est caractérisé par l'expression de marqueurs de différenciation canalaire tels que GATA6 et identifie les patients avec un meilleur pronostic (66–68,73,216). Ces sous-types ont été identifiés dans des cohortes indépendantes d'organoïdes dérivés de patients, ce qui indique que ces programmes transcriptomiques sont maintenus dans les cultures *ex vivo*, même dans un milieu riche en ligands Wnt et en facteurs de croissance (213,217). Néanmoins, certaines études suggèrent une moindre variabilité du transcriptome des organoïdes par rapport aux lignées cellulaires et aux xénogreffes de tumeurs (PDX), accompagnée d'un fort enrichissement dans un phénotype classique (218).

iv) Applications des organoïdes

La plupart des techniques utilisées sur les lignées cellulaires classiques sont également applicables aux organoïdes, notamment la cytométrie en flux, la cryopréservation, l'histologie, l'immunohistochimie, l'immunofluorescence confocale et la spectrométrie de masse. L'extraction d'ADN ou d'ARN, la PCR en temps réel, la transfection d'ADN et d'ARN interférant,

l'infection par des rétrovirus et des lentivirus recombinants, ainsi que le séquençage peuvent être réalisés avec les organoïdes. Le système d'édition du génome CRISPR-Cas9 a également été utilisé avec les organoïdes (219,220). Une première utilisation a permis de corriger le gène CFTR responsable de la mucoviscidose, conduisant à la formation d'organoïdes intestinaux et coliques fonctionnels après correction de la mutation causale de la mucoviscidose (221). Les organoïdes peuvent également être greffés chez des souris, ouvrant ainsi des perspectives en matière de régénération tissulaire et de médecine personnalisée (201). Par exemple, la transplantation d'organoïdes dérivés de patients atteints de mucoviscidose, dont l'ADN a été réparé par CRISPR-Cas9, a permis la récupération d'une fonction normale. Cela ouvre des possibilités de traitement pour des maladies incurables grâce à la transplantation d'organoïdes génétiquement modifiés.

Les organoïdes sont donc de précieux outils pour améliorer notre compréhension du de la cancérogénèse, et avec l'utilisation de gènes inductibles, l'étude en temps réel des effets d'une potentielle mutation.

3. Limites du modèle

Malgré cette similarité avec la tumeur dont ils proviennent, les principaux modèles actuels d'organoïdes tumoraux ne contiennent que des cellules épithéliales tumorales, ce qui est l'une des principales limites. Néanmoins, des approches qui complexifient les organoïdes via des systèmes de co-cultures sont à présent développées et contribuent à améliorer le modèle.

i) Intégration du stroma

Le stroma joue un rôle crucial dans le développement et la progression de l'adénocarcinome du pancréas (170). Il s'agit d'un composant majeur du microenvironnement tumoral, constitué de cellules fibroblastiques, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et d'une matrice extracellulaire dense. Le stroma pancréatique présente des caractéristiques distinctes, notamment une fibrose étendue et une réorganisation de la matrice extracellulaire. Ces altérations du stroma sont induites par des signaux sécrétés par les cellules tumorales elles-mêmes. Le stroma réagit en produisant des facteurs de croissance, des cytokines et des

enzymes qui favorisent la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses (dialogue stroma-cellules tumorales). De plus, le stroma peut entraver l'efficacité des traitements anticancéreux en formant une barrière physique et en favorisant la résistance aux médicaments (222). Ainsi, le stroma joue un rôle complexe dans l'adénocarcinome du pancréas en favorisant la progression tumorale et en modulant la réponse aux traitements. Comprendre les interactions entre les cellules tumorales et le stroma est essentiel pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant cette composante du microenvironnement tumoral, et des modèles de co-cultures avec des fibroblastes sont à présent décrits (223,224).

D'autres approches sont « d'innover » les organoïdes en les cultivant avec des progéniteurs du système nerveux mésentérique cultivés *in vitro* (225–227), ou de mimer la vascularisation avec des cellules endothéliales (228).

ii) Interaction avec cellules immunitaires

Les organoïdes peuvent être co-cultivés avec des cellules immunitaires, ce qui induit une différenciation et une maturation accrue des organoïdes (229). Les cellules immunitaires co-cultivées vont sécréter de l'interleukine-2 (IL-2), induisant une augmentation de l'expression des marqueurs épithéliaux comme des facteurs de transcription (CDX2, SOX9, ISX) et des marqueurs spécifiques de types cellulaires (dans le cadre du colon, entérocytes, cellules de Paneth, cellules caliciformes, cellules neuroendocrines). Des co-cultures fonctionnelles entre organoïdes tumoraux (de rein, poumon, mélanome ou colon) et lymphocytes infiltrant les tumeurs ont également été développées, créant un modèle pour l'immunothérapie basée sur les cellules T à l'échelon individuel (230). Cela ouvre des possibilités d'étude de l'interaction cellules immunitaires et cellules tumorales (231).

iii) Interaction avec le microbiote

Le microbiote est absent des organoïdes produits *in vitro*, les conditions de culture étant stériles. Néanmoins, il est possible d'introduire des bactéries ou des virus dans la lumière des organoïdes, ce qui permet d'étudier l'effet des bactéries sur le développement intestinal (232). Il est également possible de modéliser des infections entériques telle que *Clostridium difficile*. Les organoïdes sont également utilisés pour étudier les infections virales, en utilisant les organoïdes intestinaux (rotavirus, norovirus, entérovirus et adénovirus), les organoïdes cérébraux (virus Zika) et les organoïdes pulmonaires (virus respiratoire syncytial) (233). Plus

récemment, les organoïdes ont été un modèle pour étudier le rôle du SARS-Cov-2 sur les cellules intestinales (234).

Ainsi, la reconstruction fidèle du microenvironnement d'une tumeur au sein des organoïdes inclut non seulement les cellules immunitaires et épithéliales, mais aussi d'autres cellules stromales telles que les cellules endothéliales, les neurones, les fibroblastes et le microbiote, et la complexification des systèmes de co-culture promet une modélisation des tumeurs par les organoïdes de plus en plus fidèle.

B. MEDECINE FONCTIONNELLE ET ORGANOÏDES

L'une des applications les plus prometteuses des organoïdes est leur utilisation comme plate-forme pour la sélection des drogues les plus adaptées à chaque patient. Cette approche a le potentiel d'identifier les vulnérabilités thérapeutiques individuelles en permettant de personnaliser les traitements.

1. Principes de la médecine de précision fonctionnelle

Les organoïdes ont été utilisés comme modèle de médecine personnalisée dès 2016, avec l'utilisation chez des patients atteints de mucoviscidose d'organoïdes dérivés de biopsies rectales pour prédire la réponse des patients aux traitements (235). La mucoviscidose est habituellement liée à une mutation de CFTR, un gène codant pour une protéine épithéliale transporteuse d'anions. Au moins 2000 mutations de CFTR ont été identifiées mais seulement quelques-unes ont pu être ciblées avec succès. Le test de médicaments sur des organoïdes dérivés de patients a permis la prédiction de la réponse individuelle au traitement, malgré des mutations CFTR parfois rares ou non caractérisées.

Dans le cadre du traitement des cancers, la médecine de précision fonctionnelle (MPF) est également une stratégie prometteuse qui vise à identifier la meilleure option thérapeutique pour chaque patient (236). La MPF repose sur des tests réalisés sur des cellules tumorales vivantes afin de déterminer le profil de sensibilité et de résistance de chaque tumeur à un panel de médicaments. Les résultats peuvent être utilisés par les cliniciens comme un outil d'aide à la décision pour guider efficacement le traitement des patients (236–238). Récemment, la MPF a fait ses preuves chez les patients atteints de cancers

hématologiques (239,240), pour lesquels l'accès à de grandes quantités de cellules tumorales est facile et rapide. Néanmoins, l'application de la MPF aux patients atteints de tumeurs solides a été ralentie par le manque de technologies adaptées permettant d'amplifier rapidement et fidèlement les cellules tumorales *ex vivo*. À cet égard, les organoïdes, désormais considérés comme de très bons avatars de tumeur, fournissent la technologie la plus fiable pour mettre en œuvre la MPF chez les patients atteints de tumeurs solides.

i) Premières approches de médecine de précision fonctionnelle

Plusieurs études ont testé des approches de criblage pharmacologique sur les organoïdes. L'une des premières études réalisées dans le cancer colorectal par Van de Wetering et al. a utilisé une biobanque de 20 organoïdes de cancers colorectaux, et a testé 83 traitements (traitements standards, molécules en essai ou molécules expérimentales) (241). La prolifération des organoïdes a pu être bloquée en inhibant telle ou telle voie moléculaire correspondant à des amplifications/mutations géniques spécifiques de l'organoïde concerné. Les organoïdes semblaient mêmes plus puissants qu'une simple corrélation génotype-phénotype pour prédire la réponse au médicament. Par exemple, une lignée d'organoïdes avec amplification EGFR n'a pas répondu à un inhibiteur d'EGFR, comme observé en clinique avec le patient dont l'organoïde était dérivé (212).

Dans le PDAC, Driehuis et al (210) a exposé 26 organoïdes de PDAC à un panel de 76 traitements, comprenant des chimiothérapies couramment utilisées. Différentes réponses ont été observées pour les organoïdes dérivés de différents patients, mais les réponses observées pour des molécules avec un mécanisme d'action similaire (ex : agents ciblant les microtubules) ou la même voie moléculaire (ex : EGFR) étaient semblables.

Ainsi, ces résultats indiquent que les réponses observées *in vitro* sont indicatives de véritables vulnérabilités biologiques et ne sont pas le résultat d'une variabilité technique. De plus, dans ces premières études, pour de nombreux organoïdes testés, des médicaments ont pu être identifiés pour lesquels l'organoïde individuel était plus sensible que tous les autres organoïdes testés et qui n'était pas un standard de traitement (210). D'autres études montrant l'applicabilité de tels tests de chimiosensibilité ont été également publiées (198,206,213,242).

ii) **Méthodologie des cribles pharmacologiques**

Diverses méthodes sont utilisées pour évaluer la sensibilité des organoïdes aux médicaments (243) avec pour principales variables :

- Matrice : Organoïdes incorporés dans une matrice ou en suspension
- Tests basés sur l'individualisation des organoïdes (*single organoid*) ou poolés (*bulk*)
- Durée d'exposition aux médicaments de 2 à 24 jours (en moyenne 5 jours)
- Critères de jugement principaux : viabilité cellulaire dans un test de luminescence (majorité des cas, 11/17 études rapportées dans la méta-analyse de Wensink et al (243)), mais aussi immunofluorescence avec une coloration des cellules vivantes/mortes, et quantification de l'interféron-gamma (IFN- γ) dans les lymphocytes T CD8+. Sharick et al. ont utilisé l'imagerie métabolique optique (OMI) pour mesurer l'état métabolique des cellules individuelles au sein des PDO par rapport à la moyenne des cellules témoins, ce qui permet de capturer l'hétérogénéité métabolique pendant le traitement en plus de l'effet du traitement lui-même (244). D'autres auteurs utilisent une approche basée sur l'imagerie, parfois à l'échelle d'un seul organoïde (245) en mesurant la taille et la forme des organoïdes avec un suivi dans le temps.
- Mesure de la réponse *in vitro* : aire sous la courbe de réponse aux médicaments (AUC; dans sept études rapportées dans (243)) est principalement utilisée. A noter que toutes les études ne fournissent pas de définition de la réponse *in vitro*. Certaines études utilisent une approche basée sur les courbes ROC (246). L'AUC qui combine la puissance et l'efficacité d'un médicament, est un paramètre robuste lorsqu'on cherche à comparer un agent à travers plusieurs lignées cellulaires exposées à la même plage de concentrations et peut être plus précis que l'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) (247,248).
- Mesure de la réponse *in vivo* chez le patient: Taux de réponse objective selon RECISTv1.1 dans la majorité des études, rarement la survie sans progression (SSP) (213) ou survie sans récurrence dans le cadre de traitements adjuvants (244).

Pour une combinaison de traitements, deux approches sont utilisées en général: analyser chaque agent séparément (test en monothérapie) pour une classification de réponse combinée (213,249–252) ou analyser directement la réponse au traitement combiné *in vitro* (244,251–257).

2. Corrélation des organoïdes avec la clinique

i) Dans le PDAC

Dans leur étude où ils ont établi une biobanque de 66 organoïdes de PDAC, Tiriac et al (213) ont soumis les organoïdes à un test de médicament pour les cinq médicaments les plus couramment utilisés dans le PDAC (5-FU, irinotecan/SN-38, oxaliplatine, gemcitabine et paclitaxel). Ils ont confirmé que la sensibilité aux médicaments était stable sur les différents passages. De plus, la réponse aux médicaments a été stratifiée en trois sous-groupes (sensible, intermédiaire, résistant) en fonction de l'aire sous la courbe. Pour étudier la capacité des organoïdes à prédire avec précision la sensibilité aux médicaments, la réponse au traitement clinique de 9 patients a été corrélée rétrospectivement avec les données du test de sensibilité. Dans cette étude, 5 des 6 patients qui ont eu une survie sans progression (SSP) plus longue (SSP = 332 jours) que celle prévue sur les données historiques (SSP = 180 jours(104,106)) avaient reçu au moins un agent pour laquelle le test de sensibilité a indiqué une activité élevée, mais aucun agent pour lequel le pharmacotypage a prédit une résistance. D'autre part, 2 des 3 patients ayant une survie plus courte que prévu présentaient un profil de résistance dans le test de sensibilité. Par ailleurs, les auteurs ont également utilisé 22 lignées d'organoïdes résistantes aux thérapies standards et les ont soumises à un panel d'agents ciblés (par exemple des inhibiteurs de tyrosine kinase). Les auteurs ont alors observé une sensibilité conservée de 11 lignées d'organoïdes à certaines substances testées (par exemple, sensibilité au sunitinib dans un organoïde résistant à tous les autres agents chimiothérapeutiques testés), permettant de proposer de potentielles pistes thérapeutiques.

Dans une autre étude, Demyan et ses collègues ont inclus 94 patients avec un PDAC confirmé (258) et obtenus du tissu par résection chirurgicale ou aspiration/biopsie à l'aiguille fine, avant ou après une chimiothérapie néoadjuvante. Alors que le taux de prise des organoïdes variait entre 53 % et 76 % en fonction du prétraitement et de la méthode d'échantillonnage, un test de sensibilité a pu être réalisé pour 9 lignées d'organoïdes pour le 5-FU, l'irinotécan/SN-38, l'oxaliplatine, le gemcitabine, le paclitaxel, et les profils de résistance ont été intégrés aux résultats de pharmacotypie de la biobanque de Tiriac (213). L'analyse globale et la corrélation avec la réponse clinique définie par différents paramètres (par exemple, la réponse pathologique, les niveaux de CA19-9 dans le sérum) au sein de cette cohorte hétérogène de patients indiquaient un certain degré de corrélation avec les taux de

réponse réels observés sous chimiothérapie.

Dans un autre essai de faisabilité, le test de sensibilité des organoïdes a été effectué sur 28 lignées d'organoïdes (à partir d'un total de 54 patients atteints de PDAC à différents stades de la maladie) obtenus par différentes méthodes (résection, biopsie guidée par échographie, aspiration à l'aiguille fine) (259). Les aires sous la courbe (AUC) ont ensuite été également stratifiées en trois catégories (répondeur, intermédiaire, non-répondeur) de réponse à chaque agent. La réponse prédite a été comparée au résultat du patient évalué selon RECIST 1.1. La prédiction était correcte dans 91 % des traitements de première ligne et 80 % des traitements de deuxième ligne (disponible pour 16 des 28 organoïdes soumis à un test de sensibilité). Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'essai HOPE portant sur un total de 12 patients soumis à un test de sensibilité (260).

Une validation supplémentaire de la capacité des organoïdes à imiter la biologie tumorale provient des études de Farshadi et al. (261) et Hennig et al. (262), où des organoïdes ont été générés après un traitement néoadjuvant et comparés à des organoïdes générés à partir de patients atteints de PDAC naïfs vis-à-vis du traitement. Dans les deux études, le prétraitement a conduit à une résistance des organoïdes à tous les traitements précédemment reçus. Bien que les différences n'aient pas atteint de signification statistique par rapport aux organoïdes naïfs vis-à-vis du traitement, ces résultats semblent refléter la dynamique suivant les chimiothérapies reçues précédemment. A noter que Hennig et al. (262) ont observé que le taux de prolifération était similaire dans les organoïdes obtenus à partir de patients naïfs vis-à-vis du traitement et de patients prétraités une fois que des cultures de PDO stables ont été établies (>30 passages) pour une culture à long terme (209).

ii) Dans les autres types de tumeurs

Dans une revue de la littérature systématique (243), les auteurs ont identifié 17 études qui rapportent des données concernant les résultats des tests de médicaments basés sur les organoïdes et leur valeur prédictive ou leur association avec la réponse du patient au traitement en clinique (Figure 29). La validité clinique a été évaluée, en étudiant si les études cliniques démontraient une corrélation entre les résultats des tests de médicaments basés sur les organoïdes et la réponse clinique au traitement chez les patients. Le taux d'établissement des organoïdes et le temps nécessaire pour obtenir les résultats des tests de médicaments a

également été évalué.

Pour exprimer les résultats de validité clinique, les auteurs ont regroupé la sensibilité et la spécificité des résultats des tests de médicaments basés sur les organoïdes pour prédire la réponse au traitement (Figure 29). Les valeurs regroupées de sensibilité et de spécificité pour la réponse clinique par le dépistage basé sur les organoïdes étaient respectivement de 0,81 (IC à 95%: 0,69 à 0,89) et de 0,74 (IC à 95%: 0,64 à 0,82) (243).

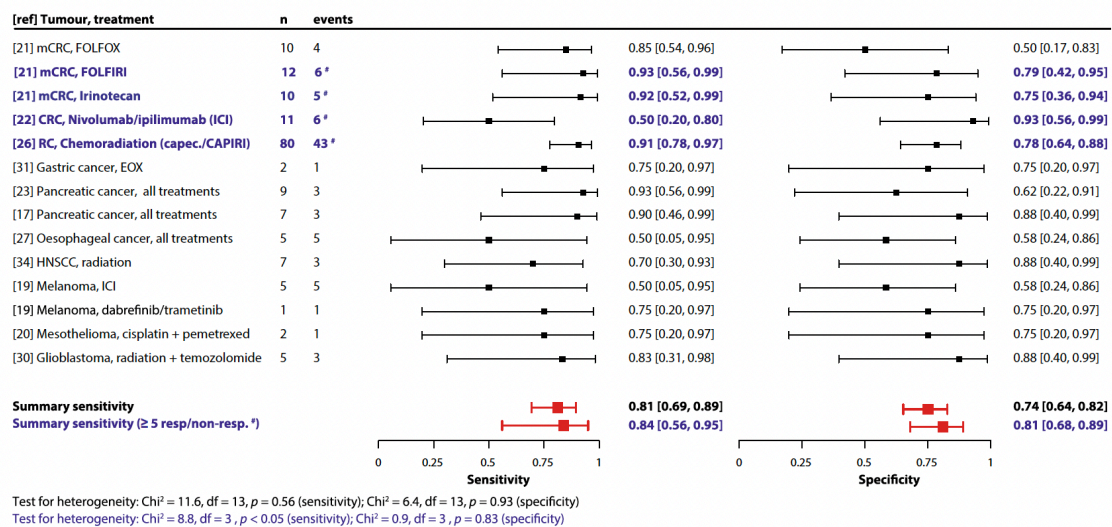


Figure 29: Résultats de la méta-analyse présentant sensibilité et spécificité des organoïdes en corrélation à la clinique (243)

Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence car les organoïdes peuvent être des biomarqueurs prédictifs avec des différences selon les types de tumeurs et les traitements. Les éléments les plus solides à ce jour sont pour les patients atteints de CRC, avec de plus larges cohortes montrant une corrélation entre les résultats des tests de médicaments basés sur les organoïdes et la réponse aux traitements systémiques/radiothérapie. Le défi actuel est de prouver que les tests de réponse tumorale individualisée basés sur les organoïdes sont réalisables, en optimisant les taux d'établissement des organoïdes et le temps nécessaire pour obtenir les résultats du dépistage basé sur les organoïdes.

C. LA MEDECINE DE PRECISION FONCTIONNELLE EN PRATIQUE

1. Essais prospectifs

Jusqu'à présent, seules deux études (SENSOR (263) et Tumorspheres Colrec (264)) ont proposé un traitement guidé par les organoïdes (ce qui signifie que le chimogramme a été utilisé pour orienter le traitement du patient) dans le cadre du CRC. L'essai SENSOR a donné des résultats négatifs, avec seulement six patients traités et sans bénéfice clinique (263). En revanche, l'essai de phase II Tumorspheres Colrec a été positif au regard de son critère d'évaluation principal (264). Cependant, sur les 34 patients qui ont reçu un traitement basé sur des tests *ex vivo*, seule la moitié a démontré une survie sans progression à deux mois et la pertinence clinique de ces résultats est discutable. Dans l'ensemble, ces résultats soulignent la nécessité d'améliorer encore les stratégies de médecine de précision fonctionnelle afin de bénéficier efficacement aux patients atteints de cancer. En ce qui concerne le PDAC, aucun essai de traitement orienté organoïdes n'a été publié jusqu'à présent, avec un essai chinois (NCT04931381) en cours.

2. ORGANOTREAT-01

L'essai ORGANOTREAT-01 (NCT05267912, PHRC 2020) a évalué si, pour un patient donné, un chimiogramme personnalisé basé sur les organoïdes pouvait être généré dans un délai limité et révélait une résistance ou une sensibilité aux traitements appartenant ou non à l'arsenal standard de prise en charge des cancers colorectaux.

ORGANOTREAT-01 est une étude prospective de phase I/II, multicentrique, française et son objectif principal est donc d'évaluer la faisabilité de générer en temps adéquat des chimiogrammes personnalisés pour les patients à partir d'organoïdes dérivés de cancers colorectaux (Figure 30). Il n'y avait pas de groupe témoin, chaque patient inclus dans l'essai se voyant offrir chimiogramme basée sur les organoïdes. Chaque patient sera biopsié au début de sa dernière ou avant-dernière ligne de traitement standard validée. La génération des organoïdes, leur culture, leur amplification et les tests de médicaments ont été réalisés dans le laboratoire de Fanny Jaulin (Jérôme Cartry et Sabrina Bedja, U1279, Gustave Roussy). Un rapport de chimiogramme a été établi pour permettre à un comité de chimiogramme (CTB ou *chemogram tumor board*) de délivrer une recommandation thérapeutique. Ce comité est composé d'au moins un oncologue de Gustave Roussy, d'un membre du laboratoire, d'un

pharmacien et de l'oncologue référent du patient. Les patients ont été traités conformément à la recommandation du comité de chimiogramme après progression de la maladie ou toxicité inacceptable sous la dernière ligne de traitement standard validée.

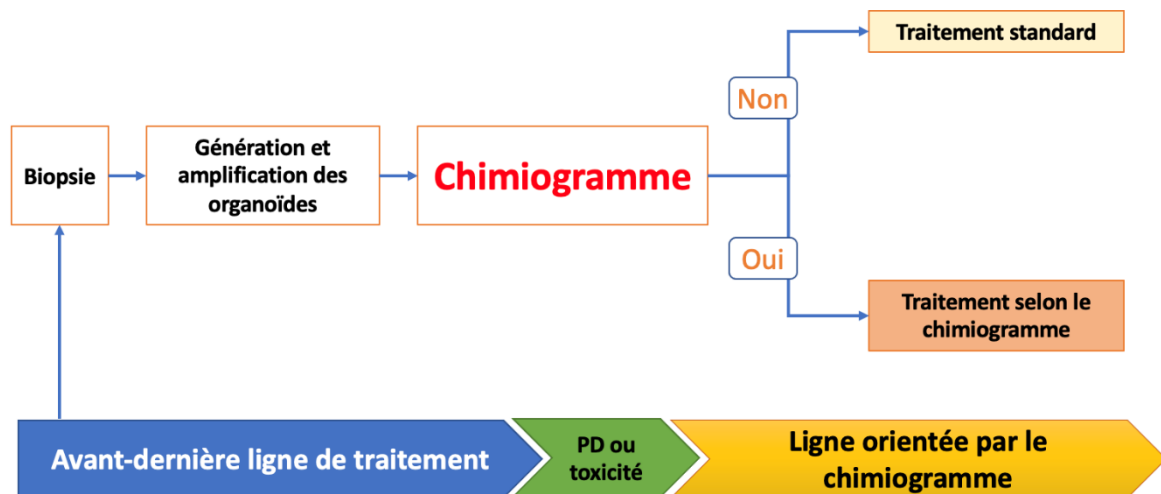


Figure 30: Principe de l'essai ORGANOTREAT-01. (PD : progression)

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Âge \geq 18 ans
- État de performance ECOG de 0 à 1
- Espérance de vie supérieure à 3 mois
- Cancer colorectal localement avancé ou métastatique confirmé histologiquement et non résecable
- Au moins une lésion mesurable selon les critères RECIST v1.1
- Au moins un site tumoral > 2 cm (différent de la lésion cible) accessible à la biopsie sans risque significatif
- Consentement éclairé signé par le patient ou son représentant légal
- Affiliation à un système de sécurité sociale
- Les patients doivent avoir échoué (progression de la maladie ou intolérance) ou avoir une contre-indication aux traitements suivants :
 1. Fluoropyrimidines
 2. Oxaliplatine
 3. Irinotécan
 4. Traitements anti-EGFR (tumeur de type RAS sauvage)
 5. Traitements anti-BRAF (tumeur avec mutation BRAFV600E)

6. Traitements anti-angiogéniques

- Les patients doivent toujours être éligibles à au moins un traitement systémique validé pour le cancer colorectal métastatique : trifluridine-tipiracil ou regorafenib.

Les critères d'exclusion étaient :

- Antécédents d'un autre cancer dans les 5 années précédant l'entrée dans l'essai, à l'exception d'un carcinome basocellulaire de la peau correctement traité ou d'un carcinome *in situ* du col de l'utérus
- Cancer colorectal non adénocarcinome
- Médicaments/comorbidités concomitants pouvant empêcher la réalisation d'une biopsie
- Anomalie de la coagulation interdisant une biopsie
- Grossesse ou allaitement
- Privation de liberté ou tutelle
- Raisons géographiques, sociales ou psychologiques empêchant la participation à l'étude et le suivi.

L'essai a inclus des patients entre janvier 2021 et octobre 2023 et les résultats seront disponibles prochainement.

3. Enjeux et difficultés de la MPF dans le PDAC

Pour mettre en œuvre des tests de médicaments basés sur les organoïdes dans le parcours clinique des patients atteints de tumeurs solides et plus spécifiquement de PDAC, il est nécessaire de relever trois défis (237): 1) établir des organoïdes à partir d'une quantité limitée de matériel tumoral obtenu par biopsie à l'aiguille ; 2) tester un large panel de médicaments anticancéreux (ou de combinaisons de médicaments) afin d'augmenter la probabilité d'identifier des thérapies efficaces ; et 3) fournir les résultats aux cliniciens de manière rapide afin d'éviter toute interruption dans la prise en charge thérapeutique des patients. A ce jour, aucune étude prospective interventionnelle n'a été publiée dans le PDAC, et aucune étude dans le PDAC visant à évaluer la faisabilité de la MPF basée sur les organoïdes n'a été publiée non plus.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est un cancer de plus en plus fréquent, dont les options thérapeutiques sont limitées et le pronostic mauvais. Les chimiothérapies conventionnelles ont montré une efficacité limitée, ce qui souligne la nécessité de nouvelles approches thérapeutiques. La médecine de précision génomique, rendue permise par l'amélioration des techniques de séquençage haut débit, a connu un essor important en oncologie au cours de la dernière décennie. Néanmoins, l'utilité du profilage moléculaire dans le PDAC n'a pas encore été établie, malgré l'amélioration de la survie globale lorsque les patients reçoivent un traitement adapté sur le plan moléculaire. La médecine de précision fonctionnelle (MPF) est une autre stratégie prometteuse qui vise à identifier la meilleure option thérapeutique pour chaque patient. La MPF repose sur des tests d'un panel de médicaments sur des cellules tumorales vivantes afin d'identifier le profil de sensibilité et de résistance de chaque tumeur. Les résultats pourraient être utilisés par les cliniciens comme un outil de prise de décision pour guider efficacement le traitement des patients.

Les organoïdes sont à ce titre des outils robustes et prometteurs pour étudier les mécanismes de cancérogénèse aussi bien à niveau moléculaire que cellulaire et tissulaire. Cliniquement, il est désormais possible d'envisager une nouvelle médecine personnalisée de type « fonctionnelle », basée sur des organoïdes dérivés de tumeur de patients. Cette médecine de précision fonctionnelle, agnostique du portrait moléculaire, reposerait sur une approche « intelligemment naïve ». Aucun *a priori* ne serait établi sur le mécanisme, ni escompté sur l'efficacité du médicament testé. Cette approche paraît particulièrement prometteuse en oncologie digestive, qui a malheureusement encore peu bénéficié des deux révolutions thérapeutiques de l'oncologie moderne : les thérapies ciblées et les immunothérapies. D'un point de vue préclinique, les lignées d'organoïdes de cancer digestif déjà établies, employées dans des expériences de criblage de molécule à haut débit, sont des modèles de choix pour identifier des nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce projet de doctorat s'est ainsi développé sur trois axes de recherche:

Axe translationnel

Organoïdes et médecine de précision fonctionnelle dans le cancer du pancréas

L'objectif principal de ce projet a été d'établir un cadre pour intégrer les tests de sensibilité aux médicaments basés sur les organoïdes dans la gestion clinique des patients atteints de PDAC. En évaluant la réponse thérapeutique des organoïdes à un panel de médicaments anticancéreux, nous visons à identifier des options thérapeutiques efficaces adaptées à chaque patient puis à corrélérer les résultats à la réponse clinique observée chez les patients.

Organoïdes en pré-clinique (265)

L'objectif de cette partie a été d'évaluer l'apport des organoïdes dans les études précliniques en testant l'efficacité d'un inhibiteur de $KRAS_{G12D}$, le MRTX1133, une molécule prometteuse pour la prise en charge du PDAC, aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec d'autres inhibiteurs.

Axe clinique

Médecine de précision pour les cancers du pancréas *KRAS* sauvage

Cette étude a eu pour objectif d'évaluer l'impact de la mutation *KRAS* chez les patients atteints de PDAC, en termes de caractéristiques cliniques, moléculaires, réponse au traitement et de pronostic (comparaison *KRAS* sauvage vs *KRAS* muté), notamment si un traitement ciblé a été reçu.

Impact des sous-types de mutation de *KRAS*

Ce projet visait à caractériser les populations de patients atteints de PDAC qui pourraient bénéficier à terme des inhibiteurs de *KRAS*, notamment ceux ciblant spécifiquement la mutation $KRAS_{G12D}$ ou les pan-*KRAS*. Ainsi, nous visons à évaluer l'impact du sous-type de codon *KRAS* muté en termes de caractéristiques cliniques, moléculaires, réponse au traitement et de pronostic (comparaison $KRAS_{G12}$ vs $KRAS_{\text{autre}}$). La réponse des organoïdes aux traitements standards a aussi été évaluée.

Axe fondamental

Etudier le phénotype invasif des PDAC

Un nouveau programme « onco-morphogénétique » a été identifié au sein du laboratoire comme médiateur de la dissémination métastatique des cancers colorectaux festonnés (CRC) à partir d'une cohorte prospective d'explants de patients (266). Ces CRC qui possèdent une morphologie unique festonnée ont la possibilité de former des TSIP (sphères tumorales à polarité inversée, intermédiaires tumoraux malins) (266). Ils présentent un profil moléculaire particulier où l'activation de RAS ou RAF est un élément fondateur précoce, tout comme l'inhibition de la voie TGF- β . Cette robuste association génotype/phénotype souligne l'existence de programmes morphogénétiques oncologiques. Nous nous sommes demandé si le phénotype invasif des PDAC était médié par un programme onco-morphogénétique et si les TSIP étaient des intermédiaires tumoraux de la dissémination des PDAC. L'objectif était de rechercher les drivers oncogéniques des sous-types de PDAC produisant TSIPs et de modéliser les voies morphogénétiques de la tumorigénèse pancréatique et de l'invasion tumorale à l'aide des organoïdes.

La mise en œuvre d'une médecine fonctionnelle de précision basée sur les organoïdes dans la prise en charge du PDAC offre un potentiel important pour révolutionner les stratégies de traitement et améliorer les résultats pour les patients. Ce projet de doctorat vise à développer un cadre complet pour l'utilisation des organoïdes comme outil de modélisation des tumeurs et outils d'étude des mécanismes d'invasion des PDAC (axe fondamental) ou outil de sélection de traitements personnalisés et outil de tests de médicaments en pré-cliniques (axe translationnel et clinique). En comblant le fossé entre les essais précliniques et la pratique clinique, ce projet vise à nous rapprocher de la médecine de précision dans la gestion des PDAC.

RESULTATS

I. ORGANOÏDES ET MEDECINE DE PRECISION FONCTIONNELLE DANS LE CANCER DU PANCREAS

Contexte:

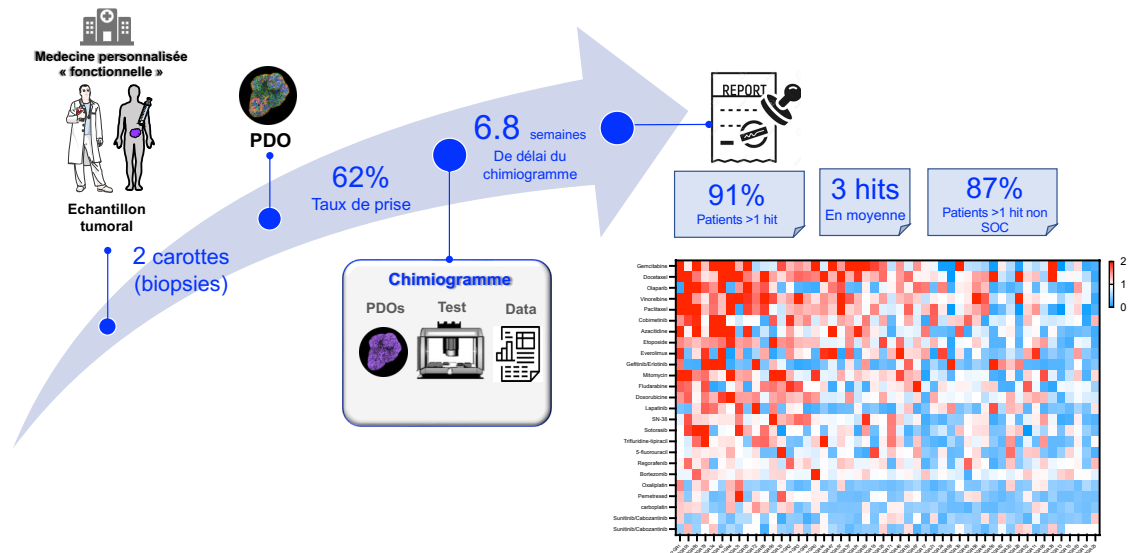
Les organoïdes (PDO) sont de plus en plus considérés comme des avatars de la tumeur dont ils proviennent et pourraient servir à la médecine de précision fonctionnelle (MPF). Il a été démontré qu'ils peuvent prédire la réponse au traitement des cancers digestifs avancés, et pourrait donc informer sur la meilleure option thérapeutique pour chaque patient (198,206,213,260,267,268), voire éviter l'administration d'un médicament inefficace et ses toxicités potentielles.

Notre hypothèse est que les PDO peuvent permettre de générer des "chimiogrammes" personnalisés et d'identifier des options thérapeutiques pour les patients atteints de PDAC métastatiques. Pour être mis en œuvre dans la pratique clinique, la MPF doit remplir 3 principales conditions : i) être réalisable avec une quantité limitée de matériel, ii) disposer d'un large panel de médicaments, et iii) obtenir les résultats des tests dans un délai cliniquement pertinent (238). Nous présentons ici les résultats de la cohorte PANORAMIC (PANcreas ORgAnoids for precision MedICine). Cette cohorte prospective a évalué la faisabilité de générer des PDO à partir de patients atteints de PDAC dans un contexte clinique pertinent et l'efficacité prédictive d'un test portant sur un panel de 25 médicaments appelé chimiogramme. Nous avons également utilisé la collecte de PDO comme plateforme préclinique pour identifier des traitements combinés efficaces chez les patients présentant le variant *KRAS*_{G12D}.

Principaux résultats:

- Cohorte :
 - ⇒ Plus grande cohorte de PDO issus de patients avec un PDAC métastatiques pré-traités, à notre connaissance
 - ⇒ Première cohorte caractérisée de PDO issus d'ascite de PDAC (n=15), à notre connaissance
 - ⇒ Concordance génétique à 91% des PDO avec la tumeur initiale

- PDO et chimiogramme :
 - ⇒ Taux de prise de 62% (variable selon les types d'échantillons)
 - ⇒ Délai de chimiogramme de 6,8 semaines
 - ⇒ 25 traitements testés dans le chimiogramme
 - ⇒ Hits dans 91% des cas (dont 87% non standards)
- Corrélation clinique :
 - ⇒ Première étude à rapporter que la survie globale et la survie sans progression est plus élevée chez les patients pour lesquels les PDO n'ont pas été établis par rapport aux patients pour lesquels les PDO ont été établis (en analyse univariée et multivariée après ajustement sur les principaux facteurs de pronostic disponible).
 - ⇒ Plus grosse cohorte de patients évaluables (n=34) après le prélèvement pour PDO
 - ⇒ Concordance clinique élevée avec sensibilité de 83% et spécificité de 93%
 - ⇒ Meilleurs hits également prédictifs d'une meilleure survie sans progression, survie globale, taux de contrôle de la maladie.



(Travail en révision à Gastroenterology depuis le 02/11/2023, soumis le 24/09/2023)

Organoids as tools for functional precision medicine in advanced pancreatic cancer

Running title : Organoids for functional precision medicine in advanced PDAC

Alice Boilève^{1,2,3}, Negaar Goudarzi^{1,4}, Jérôme Cartry^{1,2*}, Sabrina Bedja^{1,2*}, Jacques R. R. Mathieu^{1,2}, Ali Mouawia¹, Claudio Nicotra⁵, Maud Ngo-Camus⁵, Bastien Job⁶, Karélia Lipson⁴, Valérie Boige³, Marine Valéry³, Anthony Tarabay³, Mohamed-Amine Bani⁷, Peggy Dartigues⁷, Lambros Tselikas⁸, Thierry de Baere⁸, Antoine Italiano⁵, Simona Coscinea⁹, Maximiliano Gelli¹⁰, Elena Fernandez-de-Sevilla¹⁰, Maxime Annereau¹², David Malka^{1,3,11}, Cristina Smolenschi^{3,5}, Michel Ducreux^{1,2,3}, Antoine Hollebecque^{3,5}, Fanny Jaulin^{1,2,13}

1. INSERM U1279, Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France
2. Université Paris Saclay, 91471 Orsay, France
3. Gustave Roussy, département de médecine, 94800 Villejuif, France
4. Gustave Roussy, plateforme organoïdes, 94800 Villejuif, France
5. Gustave Roussy, DITEP, 94800 Villejuif, France
6. Gustave Roussy, département de bioinformatique, 94800 Villejuif, France
7. Gustave Roussy, département de pathologie morphologique, 94800 Villejuif, France
8. Gustave Roussy, département de radiologie interventionnelle, 94800 Villejuif, France
9. Gustave Roussy, département d'endoscopie, 94800 Villejuif, France
10. Gustave Roussy, département de chirurgie, 94800 Villejuif, France
11. Institut mutualiste Montsouris, département d'oncologie médicale, 75014 Paris, France
12. Gustave Roussy, département de pharmacie, 94800 Villejuif, France
13. Gustave Roussy, département de recherche, 94800 Villejuif, France

**co-third authors*

Funding:

Gustave Roussy (STING)

Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant ANR-20-CE13-0031-01

Institut National du Cancer (INCa) grant 2020-1-PLBIO-04-IGR-1

Fundraising against CRC and Mars Bleu from the Gustave Roussy foundation

Inserm Cancer 3R program (20CR046-00)

This work has benefited from state financial aid, managed by the Agence Nationale de Recherche under the investment program integrated into France 2030, project reference ANR-21-RHUS-0005.

Philantropia

Corresponding authors:

Fanny Jaulin, PhD

114 rue Edouard Vaillant,

94800 Villejuif

fanny.jaulin@gustaveroussy.fr

+33 1 42 11 23 96

Alice Boilève, MD

114 rue Edouard Vaillant,

94800 Villejuif
Alice.boileve@gustaveroussy.fr
+33 1 42 11 23 96

Disclosures:

LT: consultant : GE, Terumo, quantum surgical

AI: Research grant (AstraZeneca, Bayer, BMS, Merck, MSD, Pharmamar)

AH : Amgen, AstraZeneca, Debiopharm, Eli Lilly and Company, Incyte Corporation, QED Therapeutics

DM: Roche, Amgen, Bayer, Sanofi, Merck Serono, Servier, Sanofi, Pierre Fabre, Viatris, Bristol Myers Squibb, MSD Oncology, LEO Pharma, Incyte, AstraZeneca, Taiho Oncology, Pfizer

VB: Amgen; AstraZeneca; Bayer Schering Pharma; Ipsen; Merck Serono; MSD Oncology; Roche/Genentech

MD: Merck Serono, MSD, AMGEN, Roche, Bayer, Ipsen, Pfizer, Servier, Pierre Fabre, HalioDx, Lilly, Sanofi, BMS.

FJ: Orakl, Astra Zeneca

Other authors report no conflict of interest.

Other

Number of figures: 5

Number of tables : 1

Word count : 6973

Abstract

Background:

Patient-derived organoids (PDO) have emerged as *ex vivo* tumor avatars and are promising for functional precision medicine (FPM). This study aims to evaluate whether PDO can be implemented in clinical practice for pancreatic adenocarcinoma (PDAC).

Methods:

During 2021-2022, patients were prospectively enrolled in an IRB-approved protocol. Inclusion criteria were: histologically-confirmed PDAC, tumor site accessible (biopsy, surgery, effusions). Efficacy of 25 antitumor therapies was tested to predict sensitivity/resistance (chemogram).

Results:

Fifty-four PDO were generated from 87 pretreated patients (take-on rate 62%). Main PDO mutations were *KRAS* (90%), *TP53* (83%) and *CDKN2A/B* (23%), with 91% concordance rate with tumor. Mean turnaround-time to chemogram was 6.8 weeks. In 91% of cases, ≥ 1 hit was identified (gemcitabine (n=18/54), docetaxel (n=18/54) and vinorelbine (n=17/54) with a median of 3 hits/patient [range:0-12]).

Considering 34 evaluable patients, we report a sensitivity of 83.3% and specificity of 92.9%. Overall-response rate and progression-free survival were higher when patients received a “hit” compared to patients that received a “non-hit” drug (as part of routine management). We leveraged our PDO collection as a platform for drug sensitivity and combo identification. We tested Anti-*KRAS*_{G12D} (MRTX1133), alone or combined, and identified a specific synergy with anti-EGFR therapies in *KRAS*_{G12D} variants.

Conclusion:

We report the largest prospective study aiming at implementing PDO-based FPM for PDAC and identify very robust predictive value in this clinical setting. In a clinically relevant turnaround-time, we identified putative hits in 91% of patients, with potential survival benefits. This remains to be confirmed in interventional precision oncology trials, yet, PDO collection are already powerful platform for drug and combo development.

Keywords. Organoids, precision medicine, pancreatic adenocarcinoma, chemogram, *KRAS*

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is currently the fourth leading cause of cancer-related death in both men and women and, with increasing incidence, is expected to become the second cause of cancer-related death worldwide in 2030-2040(1). Most patients are diagnosed with or will develop metastases, and have a dismal prognosis, with a median overall survival (OS) of less than 12 months(2,3). Less than 20% of patients are resectable at diagnosis, and most of them will experience metastatic relapse. Therefore, cytotoxic chemotherapy remains the mainstay of treatment for metastatic PDAC (mPDAC), with two first-line standards (FOLFIRINOX or Nab-paclitaxel-Gemcitabine)(2,3). Beyond first line, therapeutic options are very limited with poor survival results. Of note, targeted therapies and immunotherapies, the two recent major breakthroughs in cancer therapy, have resulted to date in almost no additions to the therapeutic arsenal against mPDAC, with the exception of olaparib in *BRCA1/2* mutated tumors(4). PDAC are resistant to immunotherapy so far and harbor *KRAS* mutation, that has long been notoriously undruggable in up to 90% of cases (currently only *KRAS* G12C mutations are druggable but found in only 1% of PDAC)(5). Therefore, there is an urgent need to identify efficient therapeutic approaches for mPDAC patients and tailor decision making process to match the right drugs to the right patients.

Current precision medicine strategies in PDAC are limited by the lack of predictive biomarkers for therapeutic response. Molecular profiling of PDAC demonstrated the existence of several key molecular alterations involved in carcinogenesis (mainly *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* and *CDKN2A*)(6). For only 10-20% of patients, actionable molecular alterations are identified (7–9), involving mostly DNA Damage Response and Repair (DDR) pathway (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM* genes), but also *FGFR*, *ERBB2*, *BRAF*, etc(6). However, very few molecularly-matched treatment has been proven to be effective so far(8). Furthermore, several retrospective or prospective studies proved this molecular precision medicine approach have benefit in a limited subset of patients (less than 10% of all patients) (8,10–12).

Functional precision medicine (FPM) is a promising strategy that aims to identify the best therapeutic option for each patient(13). FPM is based on testing a panel of drugs on living tumor cells to identify the sensitivity and resistance profile of each tumor. The results could be used by clinicians as a decision making tool to effectively guide patient treatment(13–15). Recently, FPM has been proven effective for patients with hematological malignancies (16,17), for whom access to large quantities of tumor cells is easy and fast. Applying FPM to patients

with solid tumors has been challenged by the lack of adequate technology to rapidly and faithfully amplify tumor cell *ex vivo*. In that regard, patient-derived organoids (PDO), now considered as the best tumor avatars, provide the most reliable technology to implement FPM for patients with solid tumors. PDO are tridimensional, multicellular structures that can be expanded *in vitro*, and which retain the genotypic and phenotypic features of their tissue of origin, including PDAC(18–20). Recently, it has been shown that PDO can accurately predict the treatment response of advanced digestive cancers, and could therefore inform on the best therapeutic option for each patient(18,20–24), or even avoid giving a non-effective drug and its potential toxicities.

We hypothesize that tumor-derived organoids may allow generating personalized ‘chemograms’ and identifying unexpected therapeutic options for patients with mPDAC. To be implemented in clinical practice and to provide benefit to most patients, FPM must meet 3 conditions: i) be feasible with a limited amount of material, ii) have a wide panel of drugs, and iii) obtain the test results in a clinically-meaningfull turnaround time(15). Here, we report the results of the PANORAMIC cohort (PANcreas ORgAnoids for precision MediCine). This prospective cohort assessed the feasibility of generating PDOs from PDAC patients in a clinically relevant setting and the predictive efficacy of a 25 drugs panel assay named chemogram. We also leveraged the collection of PDO as pre-clinical platforme to identify efficient combination treatments efficient in patients segments harboring KRAS_{G12D} variant.

Material and methods

Patients and tissue sampling

Patients with PDAC were prospectively included from October 2021 to March 2023 in Gustave Roussy Cancer Profiling (STING) trial (NCT0493252), in compliance with Helsinki declaration. All patients gave signed informed consent for tumor sampling and genomic analysis. Inclusion criteria were: at least one tumor site accessible to pathological sampling, *performans status* ECOG 0-1. Tumor tissues were obtained from Gustave Roussy hospital (primitive lesion: surgery or fine needle cytopuncture; metastases: core needle biopsy or pleural/peritoneal effusions). Study data were collected and managed using *REDCap* electronic data capture tools hosted at Gustave Roussy. Study protocol is described in **Figure 1A**.

Organoids isolation

Samples were harvested from hospital and immediately transferred to the lab (objective: <2h between sample collection and beginning of tumor digestion). Organoids were generated as previously described and full detailed protocols are described in **Supplementary material 1**.

Drug testing (chemogram)

Drugs were all purchased at Clinisciences at stock concentration of 10mM, but oxaliplatin and carboplatin that were kindly given by Gustave Roussy pharmacy. The panel included chemotherapeutics (n=14), kinase inhibitors (n=9) and epigenetic drugs (n=2) to cover a large set of action mechanisms (**Supplementary table 1**). All drugs were diluted in DMSO, except for carboplatin, oxaliplatin and trifluridine-tipiracil in PBS-tween20 (0.3%). 96-wells drug source plates at 10x desired concentration were prepared with D-300e digital dispenser (Tecan) (drugs were dissolved in culture media). Each plate contained control wells (containing only solvent). PDO lines tested were incubated for 3-20 min at 37 °C in TrypLE1X and dissociated to single cells by vigorous pipetting every 5 min (counted using Kova Glasstic Slide). Cells were then embedded in growth factor reduced BME (350 cells/ μ l) and plated in the 60 center wells of a 96 wells plates with a pipetting robot (Assist Plus, Integra) (3 μ l/well). After 20 min incubation at 37°C, 125 μ l of culture media was added with a pipetting robot (Viaflo, Integra). Two days post plating, media was replaced by 112.5 μ l of fresh culture media and 12.5 μ l of the drug source plate using a pipetting robot (Viaflo, Integra). This step was

repeated at day 5. At day 8, to assess cell viability, media was removed and 50 μ l of CellTiterGlo 3.0 (Promega) was added to each well. Results were obtained using Biotek SynergyH1 plate reader after 20 min of incubation (included 5 min under gentle agitation). Each condition was tested in triplicate (3 wells) and working concentrations were determined so that C_{max} was under theoretical C_{max} in human plasma (Supplementary figure 1A)(25). For 25 drugs, four 96-wells plates were used with three concentrations (high, medium, and low) per drug.

Anti-KRAS testing

For this part, all chemogram steps previously described were applied. Drugs were tested alone and in combination. For all combined drugs, a first step was performed to determine concentrations to use for synergy test (always $<C_{max}$). For combined drugs, at least 2 different concentrations were combined with 2 concentrations of MRTX1133, an anti $KRAS_{G12D}$ drug (26), to calculate synergy. Synergy score was calculated using SynergyFinder 3.0(27), which allows simultaneous analysis and visualization of drug combinations assessed with Bliss score. A score >10 is in favor of a synergy(27). All experiments were performed in triplicates.

Sensitivity screening (scoring system)

Average value of triplicate wells (viability from luminescence reads) was calculated for each condition and normalized to the average value of the control wells of the plate. The Area Under the Curve (AUC) for each PDO lines and each of the 25 drugs was calculated. For each drug, the AUC of the average response of all PDO lines was divided by the AUC of the PDO of interest. The result was named AUC score (AUC_{allPDO}/AUC_{PDO}). The direct response of the PDO to each drug to the 3 concentrations tested was also tested and called the sensitivity score. This score was 0.5 when the viability was less than 50 % at the 3 concentrations tested, of 0.2 when the viability was less than 50 % at only the 2 highest concentrations tested, of 0 when the viability was less than 50 % at only the highest concentrations tested and of -0,5 when the viability was higher than 50 % at the 3 concentrations tested. The AUC score was summed to the sensitivity score to give rise to the final score used in this study. This method determines how each specific PDO responded to a specific drug as compared to the cohort and how deep was the response to the drug. A hit for a specific drug was defined when the score was over 1.5.

Clinical outcomes and efficacy evaluation

Overall survival (OS) from metastatic diagnosis was defined as time between metastases diagnosis and death, or the date of last follow-up. Progression-free survival (PFS) was defined as the time between treatment initiation and disease progression or death, or the date of last follow-up in patients alive without progression. Disease response was defined using RECIST1.1 criteria: progressive disease (PD), stable disease (SD), partial response (PR) or complete response (CR). The disease control rate was defined as the addition of patients with SD and PR. Growth modulator index (GMI) was defined as the ratio of time-to-progression (TTP) (TTP_n, *e.g.* after PDO sampling) to TTP before PDO sampling (TTP_{n-1})(28). A GMI ≥ 1.3 was considered as relevant clinical benefit, meaning TTP_n is at least superior by 30% as compared to TTP_{n-1}(28).

Statistics

All variables were summarized as median [Interquartile range (IQR)] or mean [standard-deviation (SD)] or number and percentages. Quantitative variables were compared using a Student t-test or Wilcoxon test. Qualitative variables were compared using a Fisher exact test or Chi² test depending on applicability conditions. Correlations were estimated using Pearson method. Survival curves were based on Kaplan-Meier non-parametrical estimation. Univariate analysis was performed with Log-rank test. Multivariate analysis was performed with a proportional hazard Cox model. A p-value <0.05 was considered statistically significant and all the tests were bilateral. Statistical analyses were done using the R-4.0.2 (The R-Core-Team 2020, Vienna, Austria), pvalue.io(29) and GraphPad (Version 9.5.0, 2022).

Results

PDAC patients cohort characteristics

In the course of the PANORAMIC study, 87 patients were included. Forty-one patients (47%) were female, and the mean age at diagnosis was 60.0 [SD: 10.4]. Fifty-eight patients (67%) exhibited synchronous metastases and 23 metachronous metastases (26%). The main metastatic sites were liver (n=65, 75%), lung (n=15, 17%), peritoneum (n=18, 21%), nodes (n=3, 15%), bones (n=3, 3%) and other (n=2, 2%), with 33% of patients presenting more than one metastatic site. Twenty-six patients (30%) received neo- or adjuvant systemic therapy in case of non-metastatic disease. At time of sampling for PDO establishment, patients were mostly pretreated with a median number of previously received lines of 2 (range: 0-6) (Figure 1B). In the metastatic setting or not, the patients had previously received FOLFIRINOX regimen (n=80, 92%), gemcitabine (n=49, 56%) or paclitaxel (n=34, 39%). Their tumor mutational landscape was representative of PDAC cancer, including mutations in *KRAS* (87%), *TP53* (79%), *CDKN2A/B* (21%) and *SMAD4* (16%). Median OS was 22.8 months (IC95%: 18.2-28.0). The median OS from metastatic diagnosis was 18.5 months (IC95%: 17.2-22.6). A summary of the main patients' characteristics are presented in Table 1.

PDO generation

The PDO were established from different tumor sites and sampling methods: core needle biopsy (n=58), effusion (n=19), primitive surgical resection (n=4) and primitive needle cytopuncture (n=6) (see Figure 1C for a complete description). There were no serious adverse events during or after PDO sampling. In the case of core needle biopsy procedure, several samples were collected: 2 were dedicated to PDO derivation while the others were treated for histological assessment and cryopreservation. Core needle biopsies were mainly from liver metastases (n=50 liver metastases, n=3 lung metastases, n=2 peritoneum metastases, n=2 for sub-cutaneous metastases and n=1 ovary metastasis). The median delay between tumor cell retrieval to PDO preparation was 30 minutes (IQR: 15-70). Across tumor site and sampling method, the PDO average take-on rate was 62%. This greatly varied based on the sample type, ranging from 93% (14/15) for peritoneal effusions to 25% (1/4) for pleural effusion.

There was no difference between clinical characteristics of patients for whom PDO was established and patients for whom PDO was not established (Table 1). However, take-on rate was higher when patients were progressive at time of sample ($p < 0.001$). Take-on rate

considering only progressive patients was 72%. Median OS from PDO sampling was shorter in patients for whom PDO were established when adjusted on sample type, ECOG (0-1 vs ≥ 2 , at PDO sampling), presence of liver metastasis, stage at diagnosis and progression of disease at time of sample (2.7 months [95%CI:1.9-3.9]) than in patients for whom PDO were not established (7.8 months [95%CI:5.2-NR], $p=0.002$) (Figure 2A). Median OS from diagnosis (adjusted on the same variables) was also shorter in patients for whom PDO were established (independently from time of PDO sampling) (18.2 months [95%CI:17.2-23.5] vs 43.1 months [95%CI:26.2-NR], $p=0.043$) (Figure 2A).

Molecular and histological concordance

In order to evaluate how PDO recapitulate individual tumor characteristics, we performed histological and genomic analyses. After establishment of the line, PDO were embedded in cytoblocs to proceed to histological analysis and compared to tumor histology (performed on samples retrieved at the same moment of the PDO except for effusions). Similar morphologies could be observed (Figure 2B for representative examples) with consistent tumor grade, differentiation pattern and structure.

The genomic alterations were compared between tumors and matching PDO. The tumor molecular profiling obtained from liquid biopsies was part of routine care (FoundationOne® Liquid CDx, $n=48$ or from in-house panel, $n=3$) and was thus available for most patients. In parallel, whole exome sequencing (WES) was performed on all available PDO ($n=50$). Overall, there were 47 matched tumor and PDO with available molecular profiles. We found a 91.5% concordance rate between PDO and tumor molecular alteration (Figure 2C). Overall, all codon-specific *KRAS* mutation (e.g. G12D, G12V, G12R, etc) were concordant. The main PDO molecular alterations were representative of PDAC molecular profile with most frequent mutations in *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*, and *ARID1A*(30). One patient had a microsatellite instable tumor (MSI) that was found in PDO (NGS analysis).

Chemogram method to identify ex vivo responders

Single-drug pharmacotyping was performed for each PDO with a library of 25 FDA-approved drugs (Figure 3A). Among them, five were considered as standard-of-care drugs for PDAC patients (SOC) (5-fluorouracil, SN-38 e.g. irinotecan, oxaliplatin, gemcitabine and paclitaxel) and the 20 others were approved in other types of cancers. The chemogram was

performed after a median of three passages (range: 2-8) with a median turnaround-time to chemogram results of 6.8 weeks (6.1 weeks for ascites, 5.1 for surgery, 7.0 weeks for biopsy, 11.6 for aspiration).

To account for the specific distributions and profiles of each average dose-response curve, we implemented a two-step scoring method to assess the sensitivity of a specific PDO as compared to the PDO collection. Firstly, we determined the area under the curves (AUC) for the average and specific responses of the 25 PDOs for each drug (Supplementary Figure 2). In some cases, the AUC ratio was high, despite a modest reduction in viability at the chosen physiological concentrations. To account for this bias, we added a second step to evaluate a sensitivity score representing the direct response of the PDO to each of the three drug concentrations (see methods). The AUC and sensitivity scores are then summed to obtain the final score. Median score of all drugs for all PDO lines was 0.96 and 15% of all scores were over 1.5 (defined as a hit). As internal quality controls, the activity of drug targeting the same proteins were compared. We identified robust correlations between erlotinib and lapatinib (anti-EGFR and anti-EGFR/HER2, Pearson scores of 0.70); microtubules inhibitors (paclitaxel, docetaxel and vinorelbine, Pearson scores of 0.78 and 0.64), as well as between topoisomerase inhibitors (doxorubicine, SN-38 and etoposide, Pearson scores of 0.61 and 0.73, see Supplementary figure 1B for details). This robust correlation were an important internal quality control, thus validating our drugs concentrations, chemogram assay and scoring method.

Chemograms results at patient and cohort scales

The chemogram results obtained across the 50 patients showed a wide heterogeneity of PDO responses to drugs (Figure 3A and Supplementary figure 2 for raw data). We first considered results at the scale of each individual scale. The drug sensibility patterns were quite heterogeneous (Figure 3A & supplementary figure 2). Across the study, the median number of hits per PDO was three (range: 0-12). The number of hits was slightly lower for PDO derived from heavily pretreated tumor (≥ 2 lines) compared to PDO derived from patients at the onset of their treatments (0-1 line) (3.2 vs 4.5 hits, $p=NS$). Second, we considered the results at the population scale. At least one hit was identified in 91% of the PDO, which in 87% of cases correspond to a drug approved for other malignancies than PDAC. In chemotherapy

naïve PDO, a SOC hit was identified in four out of six cases (67%). Main identified hits were gemcitabine (n=18/54), docetaxel (n=18/54) and vinorelbine (n=17/54).

We also wondered whether sample type, drug type or number of previous treatment would influence the chemogram results. Therefore, heatmaps of the chemogram scores were also represented based on PDO sampling type (ascite, biopsy, surgery, aspiration or primitive or metastases), drugs types (SOC or not) and number of previously received treatments and no significant pattern could be observed (Supplementary figure 3). Last, we observed that the drug resistance was higher for gemcitabine when the patient had been pretreated by this drug (Figure 3B) ($p < 0.01$). However, this resistance was not found for 5-FU, irinotecan and oxaliplatin.

Clinical concordance

Of the 54 patients with available chemogram, 36 received subsequent systemic treatment after PDO sampling. Overall, 34 could be included in an analysis aiming at determining the clinical concordance between patient and PDO responses. The clinical characteristics of these 34 evaluable patients are reported in Supplementary Table 2. Three different approaches were used to evaluate the concordance with patient clinical response. First, we evaluated the concordance between PDO-based chemogram result and clinical benefit defined by the partial response or stable disease according to RECISTv1.1. In this assessment, we considered the treatment line following PDO sampling and, for combination therapy, we considered the best hit among combined drugs. In our 34 patients cohort, the sensitivity and specificity were respectively 83.3% and 92.9%, with positive predictive value and negative predictive value of 71.4% and 96.3%, respectively (Figure 4A). Importantly, the disease control rate (DCR, e.g. partial responses and stable diseases) was higher when the patients were treated with a drug that yielded as a hit in the chemogram ($p = 0.0004$).

Second, we used growth-modulator index (GMI), a metrics used in precision medicine (12,28). GMI is defined as the ratio between time-to-treatment of the subsequent line of treatment after PDO sampling (TTP_n) and the previous line (TTP_{n-1}). GMI is considered as clinically meaningful when scoring > 1.3 (i.e. TTP_n is over 30% of TTP_{n-1}). In our cohort, for the six patients who received a the treatment that matched the hit identified in the chemogram, the GMI was 2.02, significantly higher than those who received drugs that did not score *ex vivo* (0.66, $p = 0.0038$) (Figure 4B).

Third, we compared the survival of the two subgroups of patients. The progression free survival (PFS) of the patients treated with a chemogram hit (3.0 [95%CI: 0.68-4.0]) was higher than the other group (1.8 months [95%CI: 0.25-1.5], $p=0.043$) (Figure 4C). Finally, comparing the overall survival (OS) confirmed these results, and patients treated with a drug that score as a hit on PDOs lived longer than the others (6.0 months [95%CI: 0.77-13.2] vs 3.1 months [95%CI: 1.7-5.0], $p=0.049$) (Figure 4C).

Interestingly, PDO PGR21 chemogram revealed Paclitaxel as the best hit, a drug regimen received subsequently by the patient. This patient was diagnosed with a metastatic PDAC in January 2022 presenting uncomfortable peritoneal effusion and progressed rapidly under FOLFIRINOX. Liquid biopsy revealed undruggable mutations ($KRAS_{G12D}$, $TP53$ and CBL). PDO were then derived from peritoneal effusion and paclitaxel was the best hit among the chemogram. The patient then received gemcitabine and nab-paclitaxel as part of routine care. He presented a clear biological benefit with a normalization of CA19-9 and CEA (Supplementary figure 4A). He also experienced a clinical benefit with disappearance of peritoneal and pleural effusions while the primitive lesion was stable (Supplementary figure 4B). Thus, this patient-derived PDO exhibited a sensitivity to paclitaxel, in line with the patient response to paclitaxel-based regimen he received after derivation of PDO. The patient eventually progressed after 12 months under treatment.

PDO as preclinical models

In addition to the clinical interest in FPM, PDO collections can be exploited as a preclinical platforms to determine drug activity at the population scale. $KRAS$ is the main oncogenic driver in PDAC cancer and has long been thought to be undruggable. We used our PDO collection to test MRTX1133, a promising innovative inhibitor specifically designed against $KRAS_{G12D}$. A log range of six MRTX1133 concentrations were tested across PDOs with and without $KRAS_{G12D}$ mutations (Figure 5A). A high variability in the response to MRTX1133 was detected among G12D lines ($SD>20\%$) (Figure 5A) with four $KRAS_{G12D}$ PDO lines over 10 primarily less sensitive to MRTX1133. Especially, when treated at nanomolar range, as MRTX1133 was previously used *in vitro* (26), cell viability was over 90%. At the maximum concentration tested in our single-agent experiment (e.g. 1 μM), mean viability was 48% for $KRAS_{G12D}$ PDOs vs 81% for other PDO lines ($p<0.0001$) (Figure 5A).

We then explored whether combinatorial therapies could compensate for the low and heterogeneous activity of MRTX1133. Among the drugs that could potentially induce a synergy with MRTX1133, we selected as the largest type of putative targets: EGFR (erlotinib), EGFR (osimertinib), HER2 (lapatinib, tucatinib), PI3KCA (alpelisib), PLC (U73122), CDK4/CDK6 (ribociclib), STAT3 (napabucasin), mTOR (everolimus), MEK (cobimetinib). This wide combinatorial analysis identified synergy in *KRAS*_{G12D} PDOs only with the drugs targeting EGFR (Bliss >10 vs <10 for all other drugs) (Supplementary figure 5). We next performed a screen on 19 PDOs (9 *KRAS*_{G12D} /10 no-*KRAS*_{G12D}) where we tested a larger number of combinations including three different anti-EGFR (erlotinib, osimertinib and lapatinib), anti-PI3KCA (alpelisib), anti-MEK (cobimetinib) and anti-mTOR (everolimus). Again, only anti-EGFR induced a synergy with MRTX1133, and only *KRAS*_{G12D} PDOs were sensitive to this combo (mean G12D bliss score for anti-EGFR: 25.8 (osimertinib), 21.3 (erlotinib) and 14.1 (lapatinib)) (Figure 5C & D). Thus, we conclude that only anti-EGFR induced a reproducible synergistic effect with MRTX1133, and this synergistic effect was observed only in *KRAS*_{G12D} PDO, giving preclinical data for combination strategy in the clinics.

Discussion

Here, we report the largest prospective study aiming at implementing PDO-based functional precision oncology for PDAC patients. Our cohort was representative of the population of patients with PDAC, in terms of clinical characteristics, mutational landscape, despite a high OS from metastatic diagnosis (18.2 months compared to 12-14 months usually observed in this population(2,3)), indicating that the patients referred to this cohort were selected by clinicians probably because of their longer survival. There was a very high morphological and molecular similarity between PDO and their corresponding tumors, as reported in the literature(18,19). Molecular analysis of PDO, as recommended in a recent protocol(31), allowed us to confirm that amplified cells were only tumor cells and not normal cells. Notably, the genetic background of the initial tumor was similar between established and non-established groups indicating our PDO cohort was not biased.

This pilot study was designed to implement FPM in the clinic and more specifically to meet feasibility: i) work with a limited amount of tumor material, ii) test the largest panel of drug and iii) provide results in a clinical turnaround time. Here, we report a PDO take-on rates of 62% after core needle biopsy, which is in the upper range when compared with scores reported in the literature, ranging from 17% to 66%(21,24,31–33). The failure in establishing PDO line was mostly due to a low number of tumor cells in the sample. In line with previous reports, cellularity of initial sample is a key parameter in the success of PDO establishment(22). The experience of the interventional radiology team was therefore fundamental in avoiding necrotic areas and favoring, within the limits of the imaging technics, the areas that appeared to be the most viable. Interestingly, we report much higher take-on rate from liver metastases biopsy over other metastases sites (62 vs 38 %). Thus, the success of PDO establishment depends on the tissue from which the sample was obtained, regardless of primary tumor type. For the first-time, we report establishing PDOs from the peritoneal effusion of PDAC patients and demonstrate, through molecular and pathological confirmation, that only tumor cells were amplified. Considering easy tissue availability and low risk for patients, especially for peritoneal effusions, this is a powerful strategy to establish PDOs. Therefore, despite being an heterogenous cohort of patients with various sampling methods, we could conclude that peritoneal effusions, surgery and liver core needle biopsy gave the best PDO take-on rates, with 93%, 75% and 60% respectively. This is an important finding since deciphering the best setting for clinical implementation of FPM is crucial.

In this study, we also demonstrated the feasibility to generate PDO-based chemograms in a clinically relevant turnaround time. This key parameter depends on multiple variables, including the quality and quantity of the initial tumor specimen, the growth rate of the PDO and the number of drugs tested. We provided a 25-drugs chemogram in 6.8 weeks. Very few PDAC-derived PDO studies reported delay to chemogram, with a median of 13 weeks in the HOPE trial(24). In CRC setting, median delay to chemogram from PDO sampling was 5 to 10 weeks(34–36). Our chemogram is generated in 6.8 weeks. Accounting for 2 to 3 months as the median delay between two CT-scan evaluations, the chemogram results will be available before patient evaluation and potential progression, and thus compatible with clinical management. To compare the test throughput we other studies, we report the number of drugs tested to the number of weeks necessary to obtain the results. The chemogram screening throughput (25 drugs in 6.8 weeks) is 4.6 and 2.2 times higher than those in SENSOR(35) and Tumorspheres Colrec studies(36), respectively. Thus, as compared to short-term culture of tumor sections or patient-derived xenografts, PDOs harbor higher take-on rate, stronger predictive power, shorter turnaround times and scalability(14,15,37).

The chemogram identifies 3 hits in average with at least one putative hit for 91% of the patients. In 87% of cases these hits were not SOC and 44% of PDO were insensitive to SOC treatments. This could result from either (i) an advanced and refractory population, (ii) SOC drugs having low activity in PDAC and (iii) previous treatments with SOC drugs that could induce acquired resistance. In support to this, we showed that previous treatments had an influence on PDO drug sensitivity since gemcitabine score were lower in PDO derived from patients eviously treated with this drug. Yet, this was not found for 5-FU, irinotecan and oxaliplatin. This finding is in line with the fact that a rechallenge with 5-FU-based chemotherapy, is a viable therapeutic option in the third line of treatment(38). A key finding is that a majority of hits were non-SOC drugs, and 87% of PDOs exhibited at least one non-SOC hit. This could offer PDAC patients with numerous alternative therapeutic options. Yet, whether such treatment could lead to actual tumor response in the clinic is not established yet and must be addressed in FPM clinical trials.

Interestingly, this study is the first to report a correlation between PDO take-on rate and patient survival. Indeed, we identified a higher OS in patients for whom the PDO was not established line as compared to patients for whom the PDO was established (in univariable and multivariable analysis after adjustment on main prognosis factors). In line with results

obtained from patient-derived xenografts (39), this poorer prognosis might be explained by intrinsic aggressive tumor features or tumor response to treatments received prior biopsy.

In a meta-analysis on PDO predictive value, Wensink et al.(40) critiqued the redundantly low number of patients involved in published reports. Indeed, previous studies included a low number of patients evaluable after PDO sampling, ranging from 6 to 11 patients in Tiriak et al(21), Sharick et al(41), Demyan et al(42), or Grossman et al(24), in various types of settings. Here, to our knowledge, we report the largest prospective cohort with all clinical data prospectively collected, with 34 PDO matched with patients' clinical response. This well characterized cohort allowed us to estimate clinical concordance based on ORR and DCR as previously reported (40), but also to explore more robust prognosis endpoints such as PFS, OS or even GMI. Considering these other surrogate markers for clinical benefit, we reported that best hits were predictive of a better patient response (both on PFS, OS, growth-modulator index and DCR) which indicate a potential efficacy of the approach. To the best of our knowledge, nobody ever combined all these parameters to evaluate patients responses in PDO studies. Moreover, in our cohort, sensitivity and specificity compared favorably with previously published studies, especially considering the high number of evaluable patients with post-sampling follow-up(22). With 83% sensitivity and 93% specificity, the scores we obtained were at least comparable, if not better, than the previous published pilot studies. Thus, this highlights the very good concordance between patients and their matching PDO and finally confirmed the clinical utility of this technology for FPM strategies.

Our study was non-interventional and clinical concordance was estimated based on treatments received as part of routine management. So far, only two interventional trials (SENSOR(35) and Tumorspheres Colrec(36) provided PDO-based guided treatment (meaning their *ex vivo* drug test results were used to orient patient's treatment), in the setting of CRC and none in the context of PDAC. The SENSOR trial yielded negative results, as only six patients were treated and did not show any clinical benefit(35). Conversely, the phase 2 Tumorspheres Colrec trial was positive considering its primary endpoint(36). However, out of the 34 patients who received treatment based on *ex vivo* drug tests, only half demonstrated progression-free survival at two months so the clinical relevance of these results is questionable. Altogether, these findings emphasize the need for further improvements in functional precision medicine strategies to effectively benefit cancer patients.

Finally, we have used our PDO collection as a platform to test novel drugs in preclinical conditions and we determined the sensitivity to single agent and combination therapies targeting the KRAS/MAPK pathway. We showed that only combination between the *KRAS*_{G12D} inhibitor MRTX1133 and anti-EGFR is synergistic and the only treatment that elicits consistent response across PDOs. This is in line with previous reports in CRC showing efficacy of anti-*KRAS*_{G12C} combination with cetuximab (anti-EGFR) and highlight the parallel pathways downstream of EGFR in digestive cancers(43). The FDA modernization act voted in January now approves phase I trials based on non-animal preclinical models. Beyond their potential as decision making tools to tailor patient treatment, PDO platforms harbor powerful advantages. First, while being ethically sustainable, PDO collections capture cancer complexity and heterogeneity at the population scale. Second, PDO-based in vitro drug tests are to date the most predictive as compared to other tumor avatars, but also scalable, time-efficient and cost-effective.

Conclusion

We report a large prospective study that aims to implement PDO-based functional precision oncology for PDAC. We could identify in a clinically relevant turnaround time at least one putative hit on the chemogram in 91% of cases, and in 87% of cases hits were not SOC, opening treatment horizons in a population with limited treatment options. Clinical correlation indicated a potential efficacy of the approach and this study paved the way toward implementation of PDO-based FPM in the clinics. These results warrant to be confirmed in a prospective randomized trial, and we aim to open ORGANOTREAT-02 pancreas, a prospective and multicenter study evaluating efficacy of PDO-based precision medicine in patients with advanced PDAC.

Acknowledgments:

We would like to thank Olivia Bawa from PETRA platform. We also would like to thank Julie Rivière and Maroussia Halter from CrispR-Cas9 platform. We would like to thank all member of INSERM U1279 unit and especially Jaulin lab. We would like to thank all members of the precision oncology team from Gustave Roussy for their help in the management and all other member of the GI team. We also would like to thank all patients and families.

Authors contributions:

Conceptualization : AB, FJ

Data curation : AB, NG, SB, JC, JM

Formal Analysis : AB, NG, JM

Funding acquisition : JM, MD, FJ

Investigation : FJ, MD, DM, AH, CS

Methodology : AB, JC, JM, FJ

Supervision : JC, JM, FJ

Writing – original draft: AB

Writing – review & editing: all authors

References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* janv 2022;72(1):7-33.
2. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 12 mai 2011;364(19):1817-25.
3. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 31 oct 2013;369(18):1691-703.
4. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 25 juill 2019;381(4):317-27.
5. Strickler JH, Satake H, George TJ, Yaeger R, Hollebecque A, Garrido-Laguna I, et al. Sotorasib in KRAS p.G12C-Mutated Advanced Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 5 janv 2023;388(1):33-43.
6. Collisson EA, Bailey P, Chang DK, Biankin AV. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(4):207-20.
7. Aguirre AJ, Nowak JA, Camarda ND, Moffitt RA, Ghazani AA, Hazar-Rethinam M, et al. Real-time Genomic Characterization of Advanced Pancreatic Cancer to Enable Precision Medicine. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1096-111.
8. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):508-18.
9. Singhi AD, George B, Greenbowe JR, Chung J, Suh J, Maitra A, et al. Real-Time Targeted Genome Profile Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Identifies Genetic Alterations That Might Be Targeted With Existing Drugs or Used as Biomarkers. *Gastroenterology.* 2019;156(8):2242-2253.e4.
10. Tsimberidou AM, Hong DS, Ye Y, Cartwright C, Wheler JJ, Falchook GS, et al. Initiative for Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy (IMPACT): An MD Anderson Precision Medicine Study. *JCO Precis Oncol.* 2017;2017.
11. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, Eggermont AM, Schilsky RL, Mendelsohn J, et al. Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J Clin Oncol.* 10 nov 2015;33(32):3817-25.
12. Massard C, Michiels S, Ferté C, Le Deley MC, Lacroix L, Hollebecque A, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov.* 2017;7(6):586-95.
13. Letai A, Bholra P, Welm AL. Functional precision oncology: Testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations. *Cancer Cell.* 10 janv 2022;40(1):26-35.
14. Veninga V, Voest EE. Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine. *Cancer Cell.* 13 sept 2021;39(9):1190-201.
15. van Renterghem AWJ, van de Haar J, Voest EE. Functional precision oncology using patient-derived assays: bridging genotype and phenotype. *Nat Rev Clin Oncol.* 13 mars 2023;
16. Kornauth C, Pemovska T, Vladimer GI, Bayer G, Bergmann M, Eder S, et al. Functional Precision Medicine Provides Clinical Benefit in Advanced Aggressive Hematologic Cancers and Identifies Exceptional Responders. *Cancer Discov.* févr 2022;12(2):372-87.
17. Malani D, Kumar A, Brück O, Kontro M, Yadav B, Hellesøy M, et al. Implementing a Functional Precision Medicine Tumor Board for Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* févr 2022;12(2):388-401.
18. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc.* sept 2016;11(9):1724-43.
19. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell.* 15 janv 2015;160(1-2):324-38.
20. Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med.* nov 2015;21(11):1364-71.
21. Tiriác H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1112-29.
22. Wensink GE, Elias SG, Mullenders J, Koopman M, Boj SF, Kranenburg OW, et al. Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *npj Precis Onc.* déc 2021;5(1):30.
23. Seppälä TT, Zimmerman JW, Suri R, Zlomke H, Ivey GD, Szabolcs A, et al. Precision Medicine in Pancreatic Cancer: Patient-Derived Organoid Pharmacotyping Is a Predictive Biomarker of Clinical Treatment Response. *Clin Cancer Res.* 2 août 2022;28(15):3296-307.
24. Grossman JE, Muthuswamy L, Huang L, Akshinthala D, Perea S, Gonzalez RS, et al. Organoid Sensitivity Correlates with Therapeutic Response in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 15 févr

2022;28(4):708-18.

25. Liston DR, Davis M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin Cancer Res.* 15 juill 2017;23(14):3489-98.
26. Hallin J, Bowcut V, Calinisan A, Briere DM, Hargis L, Engstrom LD, et al. Anti-tumor efficacy of a potent and selective non-covalent KRASG12D inhibitor. *Nat Med.* oct 2022;28(10):2171-82.
27. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res.* 5 juill 2022;50(W1):W739-43.
28. Von Hoff DD. There are no bad anticancer agents, only bad clinical trial designs--twenty-first Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Clin Cancer Res.* mai 1998;4(5):1079-86.
29. Medistica. pvalue.io, a Graphic User Interface to the R statistical analysis software for scientific medical publications. 2021. Available on: <https://www.pvalue.io/fr>.
30. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 8 janv 2019;47(D1):D941-7.
31. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nature protocols.* 2020;15(10):3380-409.
32. Tiriác H, Bucobo JC, Tzimas D, Grewel S, Lacombe JF, Rowehl LM, et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. *Gastrointest Endosc.* juin 2018;87(6):1474-80.
33. Lee JH, Kim H, Lee SH, Ku JL, Chun JW, Seo HY, et al. Establishment of Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids from Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsies. *Gut Liver.* 15 juill 2022;16(4):625-36.
34. Bruun J, Kryeziu K, Eide PW, Moosavi SH, Eilertsen IA, Langerud J, et al. Patient-Derived Organoids from Multiple Colorectal Cancer Liver Metastases Reveal Moderate Intra-patient Pharmacotranscriptomic Heterogeneity. *Clinical Cancer Research.* 2020;26(15):4107-19.
35. Ooft SN, Weeber F, Schipper L, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, et al. Prospective experimental treatment of colorectal cancer patients based on organoid drug responses. *ESMO Open.* juin 2021;6(3):100103.
36. Jensen LH, Rogatto SR, Lindebjerg J, Havelund B, Abildgaard C, do Canto LM, et al. Precision medicine applied to metastatic colorectal cancer using tumor-derived organoids and in-vitro sensitivity testing: a phase 2, single-center, open-label, and non-comparative study. *J Exp Clin Cancer Res.* 5 mai 2023;42(1):115.
37. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science.* 23 2018;359(6378):920-6.
38. Kobayashi S, Tezuka S, Yamachika Y, Tsunoda S, Nagashima S, Tozuka Y, et al. FOLFOX regimen after failure of fluorouracil and leucovorin plus nanoliposomal-irinotecan therapy for advanced pancreatic cancer: a retrospective observational study. *BMC Cancer.* 21 févr 2023;23(1):177.
39. Pergolini I, Morales-Oyarvide V, Mino-Kenudson M, Honselmann KC, Rosenbaum MW, Nahar S, et al. Tumor engraftment in patient-derived xenografts of pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with adverse clinicopathological features and poor survival. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182855.
40. Wensink GE, Elias SG, Mullenders J, Koopman M, Boj SF, Kranenburg OW, et al. Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *NPJ Precis Oncol.* 12 avr 2021;5(1):30.
41. Sharick JT, Walsh CM, Sprackling CM, Pasch CA, Pham DL, Esbona K, et al. Metabolic Heterogeneity in Patient Tumor-Derived Organoids by Primary Site and Drug Treatment. *Front Oncol.* 2020;10:553.
42. Demyan L, Habowski AN, Plenker D, King DA, Stranding OJ, Tsang C, et al. Pancreatic Cancer Patient-derived Organoids Can Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg.* 1 sept 2022;276(3):450-62.
43. Yaeger R, Weiss J, Pelster MS, Spira AI, Barve M, Ou SHI, et al. Adagrasib with or without Cetuximab in Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *N Engl J Med.* 5 janv 2023;388(1):44-54.

Figure legends

Figure 1. Study description and flow-chart

1A. Visual description of the study

1B. Cohort timeline of clinical course and longitudinal sample collection (in red framed: PDO take-on rate)

1C. Study flow chart

Figure 2. Concordance between PDO and matching tumor

2A. Overall survival (OS) from diagnosis (left panel) and OS from PDO sampling in the whole cohort (right panel) according to establishment of PDO line or not.

2B. Concordance between tumor histology, PDO histology, and PDO in matrigel (scale bar: 200 μ m)

2C. Oncoplot of the PDO cohort : concordance between tumor and PDO molecular alterations

MS : Missense mutation, Sp : Splicing site, NS : Nonsense, FS : Frameshift mutation

Figure 3. Drug sensitivity profile and correlation with previous treatments

3A. Heatmap of chemogram hits ranked according number of hits for the different drugs and the different PDO

Blue : predicted resistant PDO; Red : Predicted sensitive PDO

3B. Area Under Curve (AUC) of Standard-of-care drugs, depending on the patient history (treated or not treated)

Figure 4. Sensitive and specificity scores

4A. Correlation tables for evaluable patients that received treatment after PDO sampling
S: sensitive; R: Resistant

4B. Time-to-progression (TTP) after and before (grey) PDO sampling, ranked according to best score of the received treatments

Top in red square: patients with predicted hit >1.5; Left in grey: previous line (TTP(n-1)); Right: Subsequent line, with RECIST response (TTP(n)); † Patient death; arrow : ongoing treatment. GMI : Growth modulator index

4C. Progression-free survival of the treatment line after PDO sampling (left panel) and overall survival from PDO sampling according to the presence of a hit between received treatments or not.

Figure 5. PDO as preclinical models

5A. Efficacy of MRTX1133 alone in *KRAS*_{G12D} or no-*KRAS*_{G12D} PDO lines (left panel). Individual efficacy of MRTX1133 in *KRAS*_{G12D} PDO lines (right panel)

5B. Combination assays of MRTX1133 in *KRAS*_{G12D} lines, with Erlotinib, Osimertinib, Lapatinib, Alpelisib, Cobimetinib and Everolimus. Raw viability data and Bliss score matrix are shown for every combination assay.

5C. Bliss scores heatmap for all combination assays and all PDO lines (left panel) and mean bliss score for all combination assays depending on *KRAS*_{G12D} or no- *KRAS*_{G12D} PDO lines (right panel).

Supplementary figure 1

A. Maximum theoretical concentration within patients plasma and highest concentration tested in our chemogram.

B. Correlation of hits for drugs with same mechanisms (microtubules inhibitors, topoisomerase inhibitors or anti-EGFR) or not (lapatinib and etoposide)

Supplementary figure 2

Raw chemogram results of the 54 PDO lines tested with 25 drugs at 3 concentrations. For each drug, right panel shows the average response of the 54 PDO lines. Error-bars: SD.

Supplementary figure 3

A. Heatmap of chemogram hits, based on tumor sample (aspiration, surgery, effusion or biopsy) and type (primitive or metastases) and violin plot of number of hits depending on these variables (right panel).

B. Heatmap of chemogram hits, based on number of previous lines in the metastatic setting. PDO violin plot of number of hits depending on these variables (right panel).

C. Heatmap of chemogram hits, based on standard of care (SOC) or non SOC drugs

Supplementary figure 4

A. Lab value (number of normal lab value) of CEA and CA19-9 of patient PGR21 over disease course.

B. CT-scan of patient PGR21 at initiation of gemcitabine-nabpaclitaxel and at best response. In red: pleural effusion; In yellow: pancreas tail mass; blue arrows: peritoneal effusion.

Supplementary figure 5

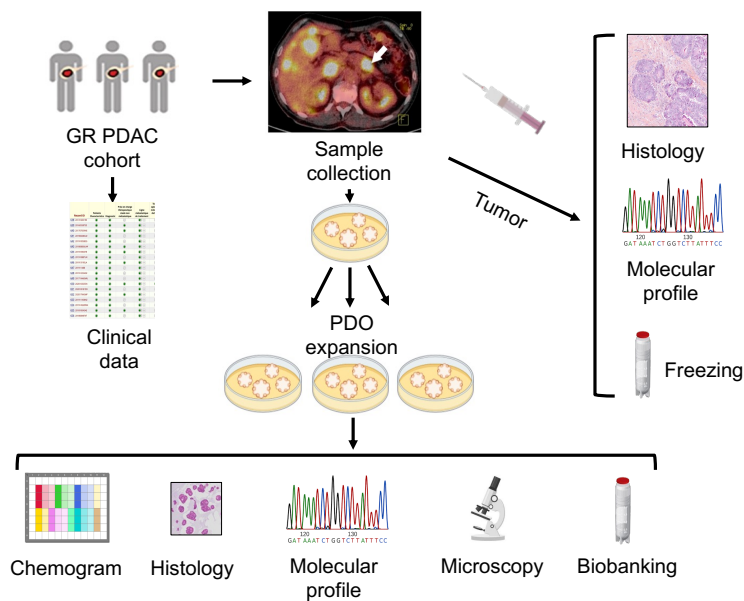
Raw viability data and Bliss score heatmap for the 11 drug testing in combination with MRTX1133.

Table 1. Characteristics of patients (n=87)				
Variables	PDO established (n=54)		PDO not established (n=33)	
	Age, years, mean (SD)	60.8	(10.6)	58.8
Sex (female) (n,%)	23	43%	18	55%
CA 19-9 at diagnosis (UI/mL), median (IQR)	1590	[61.2; 2894]	314	[195; 7387]
Surgical stage				
Resectable	8	(15%)	5	(15%)
Borderline	2	(4%)	4	(12%)
Locally advanced	5	(9%)	4	(12%)
Unknown	1	(2%)	0	(0%)
Metastatic	38	(70%)	20	(61%)
Primary tumor				
Primary tumor localization at diagnosis				
Head (n,%)	16	(30%)	14	(42%)
Body (n,%)	19	(35%)	9	(28%)
Tail (n,%)	19	(35%)	10	(30%)
Primary tumor resected (n,%)	10	(19%)	6	(18%)
Metastases				
Metachronous metastases (n,%)	14	(26%)	9	(27%)
Metastases sites				
Liver (n,%)	42	(78%)	23	(70%)
Lung (n,%)	9	(17%)	6	(18%)
Nodes (n,%)	5	(15%)	5	(15%)
Peritoneum (n,%)	12	(22%)	6	(18%)
Bone (n,%)	1	(2%)	2	(6%)
Other (n,%)	4	(7%)	1	(3%)
Previous systemic chemotherapy				
Non metastatic stage (n=23)				
Neoadjuvant chemotherapy (n,%)	8	(15%)	7	(21%)
Adjuvant chemotherapy (n,%)	8	(15%)	6	(18%)
Number of palliative chemotherapy lines prior PDO collection				
0 (n,%)	6	(11%)	3	(9%)
1 (n,%)	18	(33%)	10	(30%)
2 (n,%)	16	(30%)	9	(27%)
3 (n,%)	11	(20%)	7	(21%)
>=4 (n,%)	4	(7%)	3	(9%)
Treatments prior PDO collection				
FOLFIRINOX (n,%)	45	(83%)	26	(79%)
Gemcitabine (n,%)	27	(50%)	21	(64%)
Paclitaxel/nabpaclitaxel (n,%)	21	(39%)	13	(39%)
Non-progressive disease at time of PDO				
	2	(4%)	13	(39%)

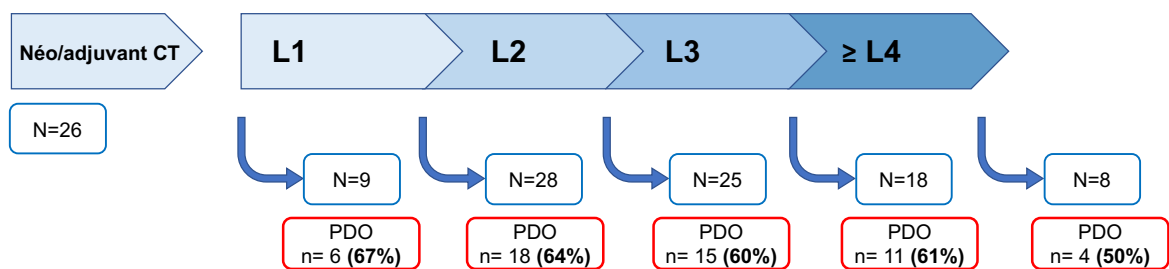
Performans status (ECOG) at time of PDO		
0-1	51 (94%)	25 (85%)
>=2	3 (6%)	8 (15%)
Tumor somatic molecular alterations		
<i>KRAS</i> (n,%) (n=81)	47 (90%)	24 (81%)
<i>G12D</i> (n,%)	23 (49%)	11 (38%)
<i>G12V</i> (n,%)	11 (23%)	4 (14%)
<i>G12R</i> (n,%)	8 (17%)	5 (17%)
<i>G12C</i> (n,%)	2 (4%)	0 (0%)
Other (n,%)	3 (6%)	4 (14%)
<i>TP53</i> (n,%)	43 (83%)	21 (72%)
<i>CDKN2A/B</i> (n,%)	12 (23%)	5 (17%)
<i>SMAD4</i> (n,%)	8 (15%)	5 (17%)
MSI status	1 (2%)	0 (0%)
Tumor mutational burden (median, IQR)	3.00 [0; 4.25]	2.76 [0; 4.00]

Figure 1

A



B



C

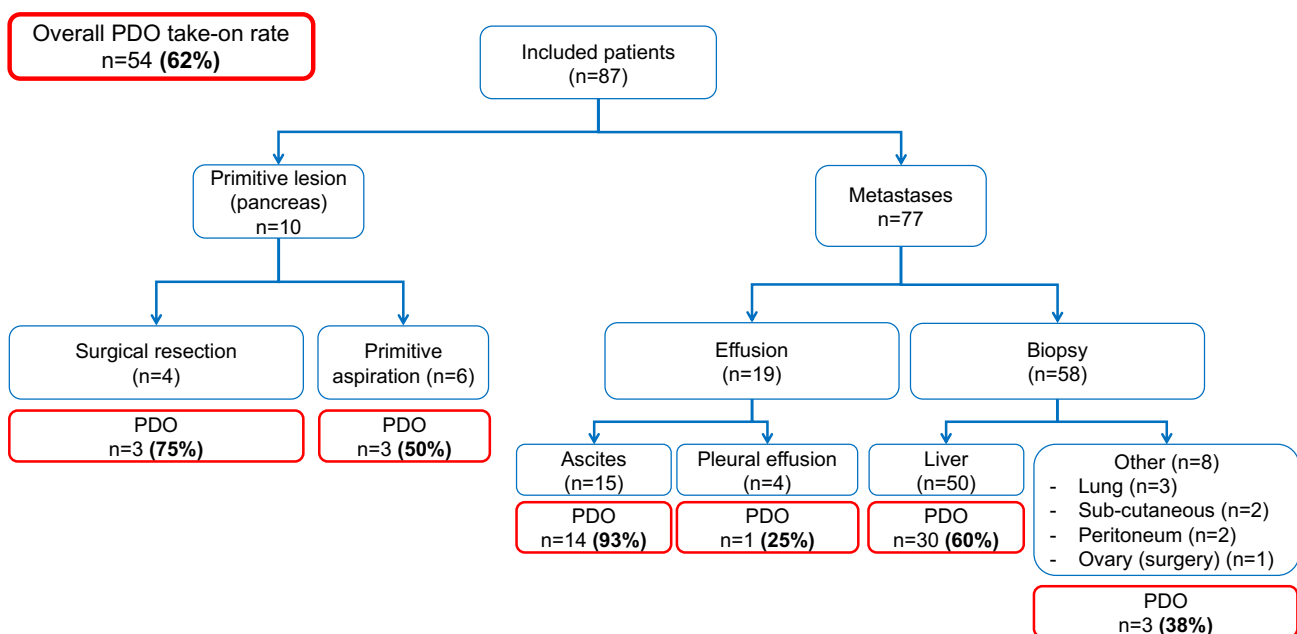
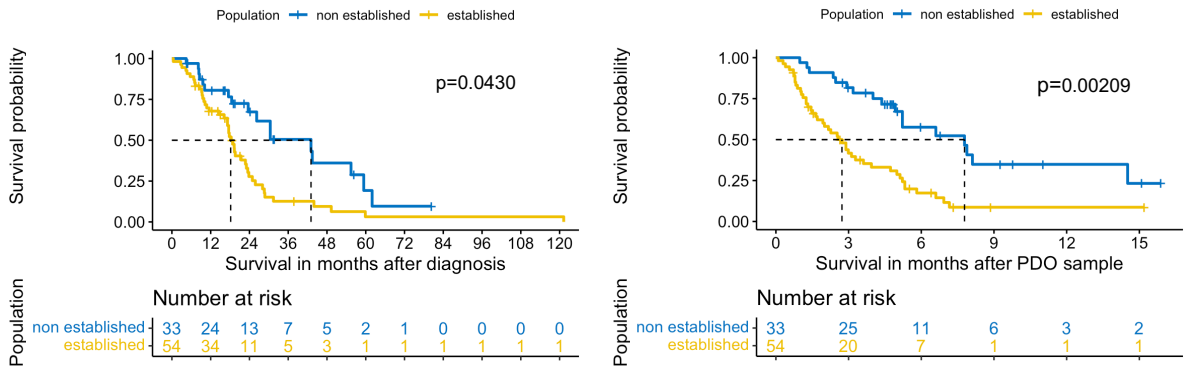
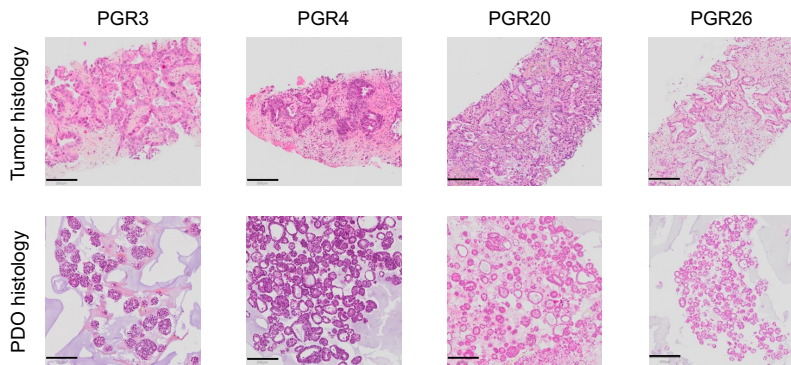


Figure 2

A



B



C

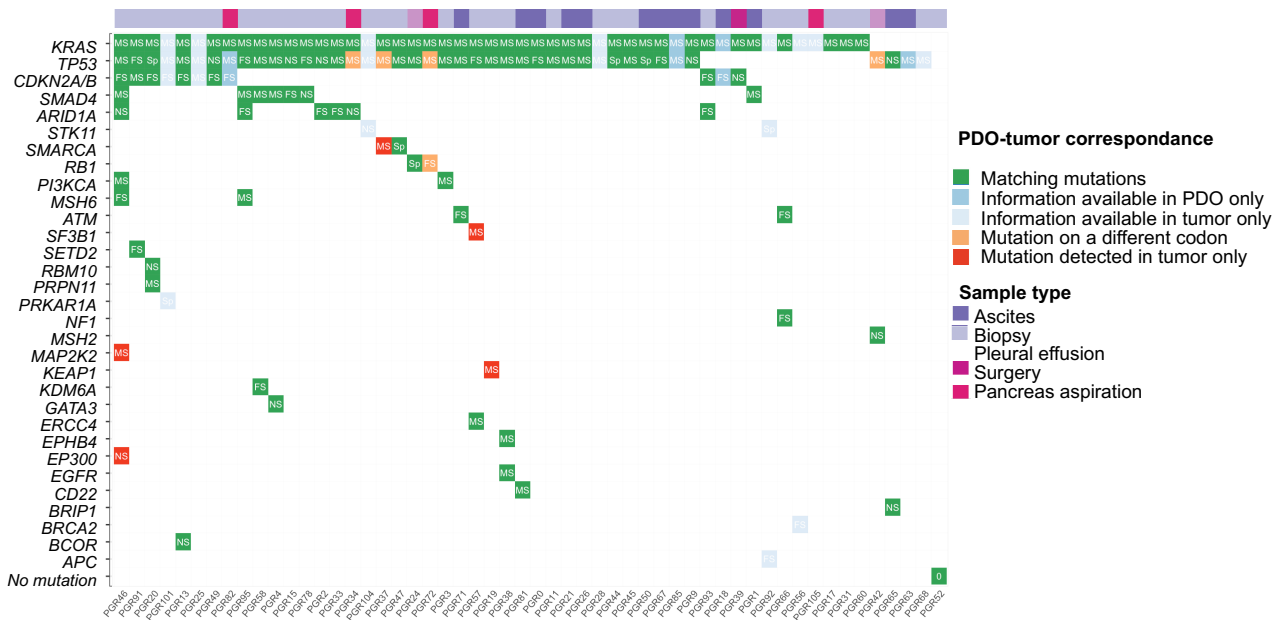
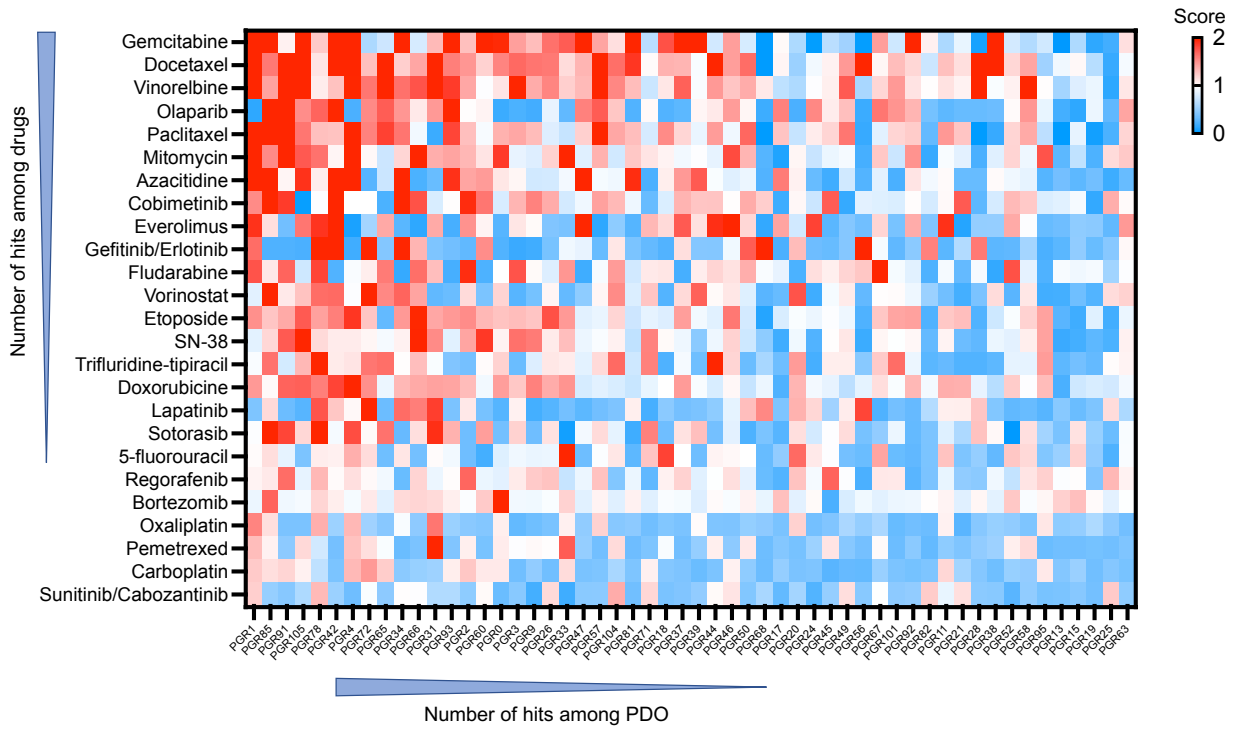


Figure 3

A



B

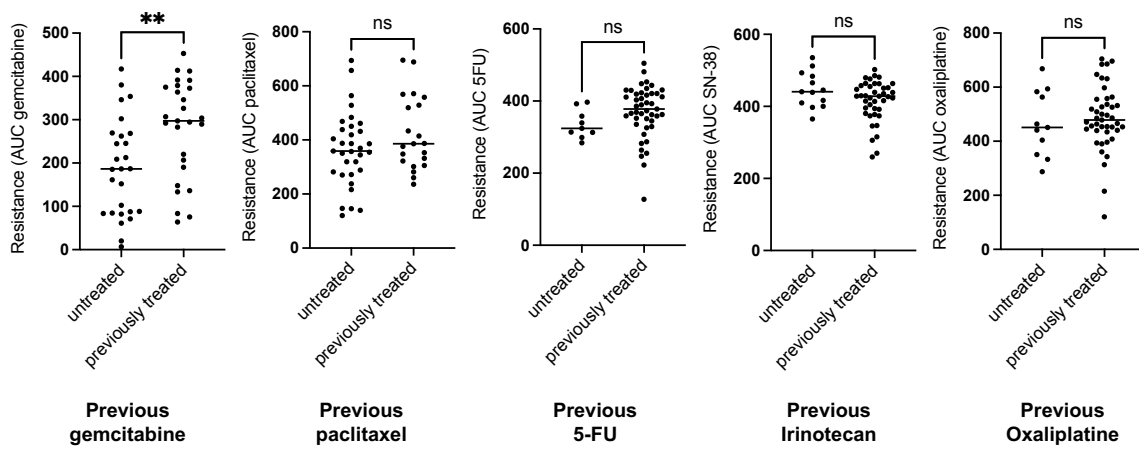


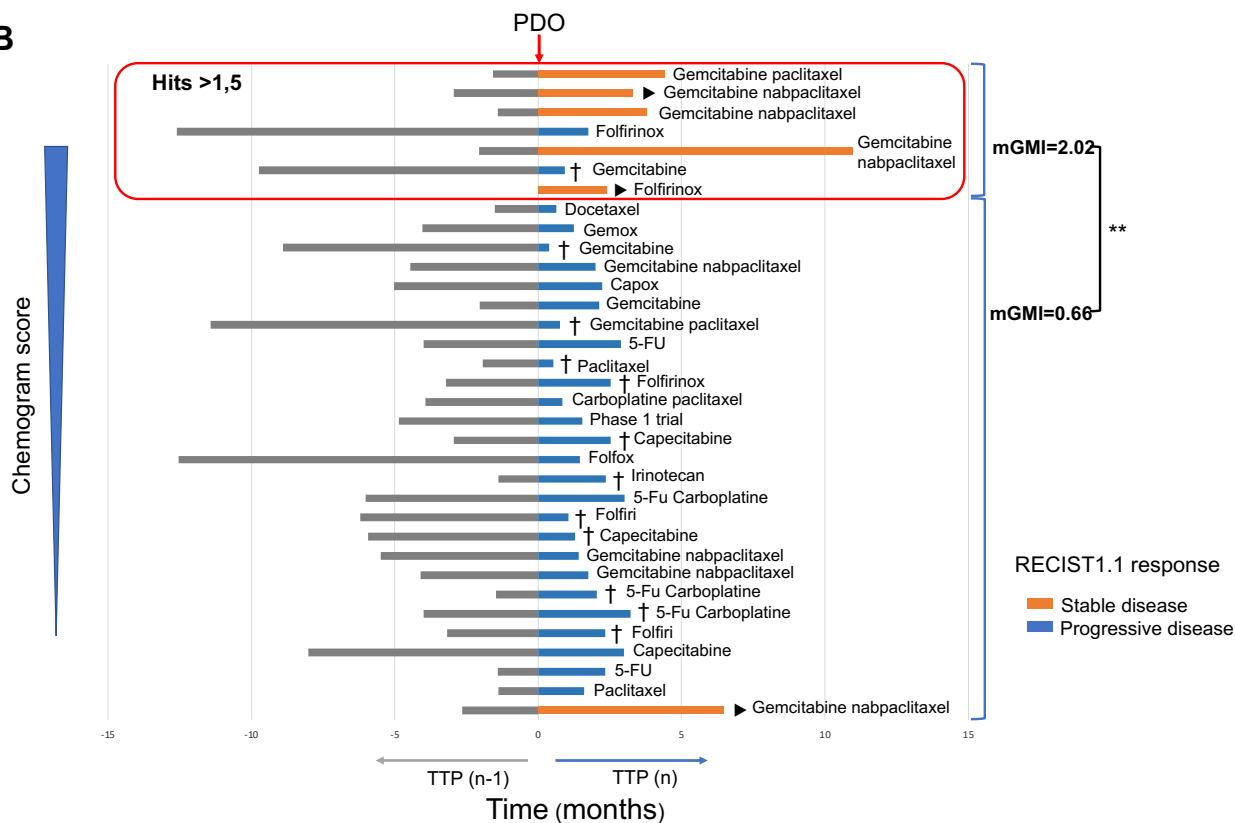
Figure 4

A

Correlation table	patient S	patient R	Total
PDO S (score >1,5)	5	2	7
PDO R	1	26	27
Total	6	28	34

Predictive positive value	71,4%
Negative predictive value	96,3%
Sensibility	83,3%
Specificity	92,9%

B



C

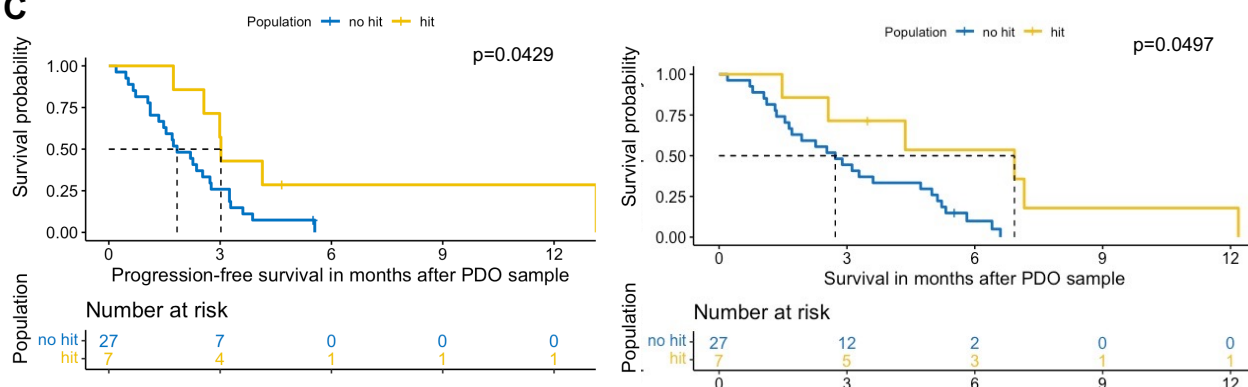
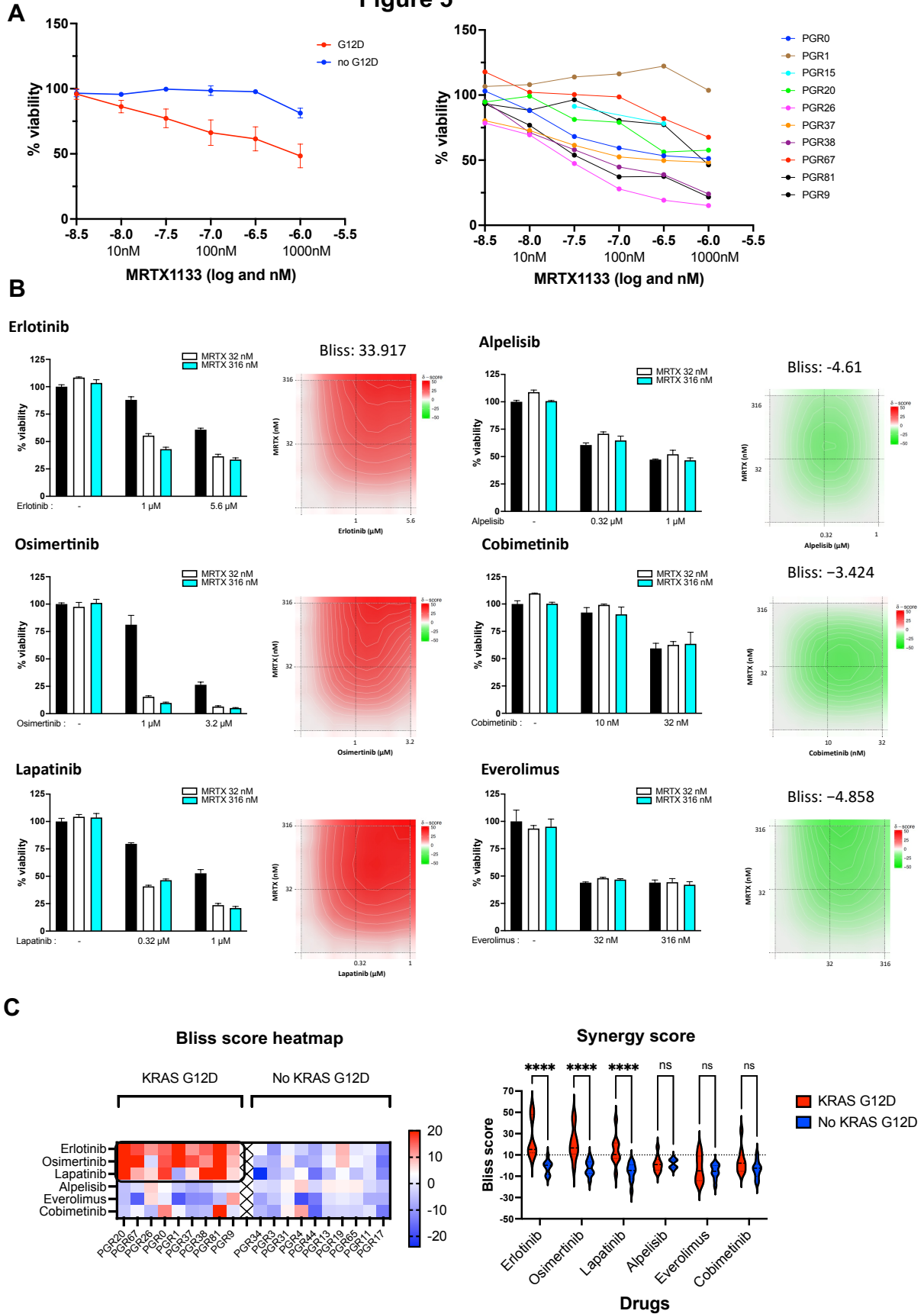


Figure 5



Supplementary material

Organoids isolation

Samples were harvested from hospital and immediately transferred to the lab (objective: <2h between sample collection and beginning of tumor digestion). Solid tumor samples were minced into small pieces and incubated for 1h while shaking in 5mL basal medium with 50µg/ml Liberase TH (Roche) and 10µM Y-27632 (Selleckchem). After and during incubation, vigorous pipetting was applied to improve cells dissociation (mechanical dissociation). For effusions, no digestion was performed and effusions were spun at 400g for 5 min. For both types of samples, 20 mL FCS (10%) medium was added, and the mix filtered through a 100µM cell strainer to remove debris and remaining stroma. Cells were spun at 400g for 5 min and the pellet resuspended in red blood cell lysis solution (Milteny Biotec) for 2 min, and then spun at 400g for 5 min (twice, and washed with basal medium) The pellet was resuspended in Cultrex Ultimatrix basement membrane extract (Ultimatrix, Trevigen) and plated in pre-warmed 6-wells plates. After Ultimatrix polymerization, cells were incubated at 37°C in culture media modified from Fujii et al.(1) and supplemented by Intesticult™ Organoid Growth Medium (Stemcell™ Technologies; 06010). Culture media was changed every two to three days, added with 10µM Y-27632 for the first 2 days.

PDOs were passaged every 7 to 14 days. Culture media was removed and PDOs were incubated for 3 to 20 min at 37 °C in 3mL TrypLE 1X (Thermo Fischer Scientific). PDO dissociated to single cells or small clusters (< 10 cells) by vigorous pipetting (p1000) every 5 min. After incubation, 10 mL 10 % FCS medium was added, and the cells were spun twice at 400g for 3 min. The pellet was resuspended in Ultimatrix and plated. After Ultimatrix polymerization, culture media containing 10µM Y-27632 was added and the culture plates incubated at 37°C. PDOs were biobanked in FBS containing 10% DMSO (Sigma- Aldrich). We considered PDO established when the organoids were sufficiently amplified to perform the patient's chemogram (>500 000 cells).

Molecular alteration analyses

Tumor molecular profiling was performed as part of patients' clinical management in an attempt to identify actionable molecular alteration. Molecular profile was obtained through liquid biopsy (FoundationMedicine ® panel including 324 oncogenes, tumor

suppressor genes or gene rearrangement as well as microsatellite stability status and tumor mutational burden).

PDO molecular profiling was performed after DNA extraction (DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN)) with whole exome sequencing (WES) outsourced to Novogene (UK). Briefly, DNA was sheared mechanically and prepared as library containing dual-indexed sequencing barcodes, then sequenced on a NovaSeq 6000 instrument (Illumina). Quality of read sequences was evaluated using FastQC v0.11.9 (and FastqScreen v0.15.1 to assess for DNA contamination by other species). Sequences were trimmed for their lower quality (BaseQ<20) and Illumina adapter sequences using fastp v0.23.2. All QC results were compiled to a user-friendly report using multiqc v1.14. Mapping was performed against human hg19 genome sequence (using bwa mem v0.7.17). Duplicate reads marking and base quality recalibration were performed using GATK v3.8-1-0(2). Germline variant/indel calling was performed with VarScan mpileup2cns v2.4.3(3), using the default parameters. Called variants were then filtered in using bcftools v1.9 according to the following criteria: 1) AD>=10; 2) Freq>5%; 3) Func_refGene=='exonic,splicing'; 4) gnomAD_exome>1e-03; 5) ExonicFunc_refGene!='synonymous_SNV'; 7) ExonicFunc_refGene!='unknown'. Filtered variants quality was assessed using bcftools stats.

Immunostaining

PDOs embedded in BME were incubated with 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature for 1h. PDO in PFA were then gently harvested and spun 3 min at 100g. Pellet washed in PBS and spun 3 min at 100g. After one more washing step, the PDO pellet was dehydrated with ethanol and embedded in paraffin and then stained for hematoxylin eosin and Safran. Tumor and PDO pathological samples were reviewed by an expert pathologist.

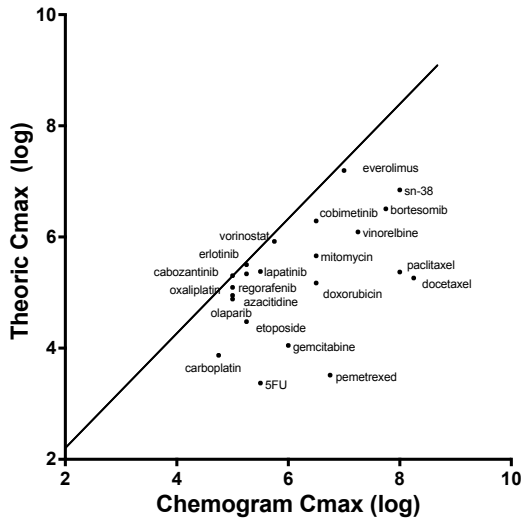
1. Fujii M, Matano M, Toshimitsu K, Takano A, Mikami Y, Nishikori S, et al. Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. *Cell Stem Cell*. 6 déc 2018;23(6):787-793.e6.
2. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33.
3. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. mars 2012;22(3):568-76.

Supplementary table 1. Drug concentrations used in this study						
Drugs	Concentration (log)			Concentration (nM)		
	5FU	-7	-6,25	-5,5	100,0	562,3
azacitidine	-6,5	-5,75	-5	316,2	1778,3	10000,0
bortezomib	-9,25	-8,5	-7,75	0,6	3,2	17,8
carboplatin	-6,25	-5,5	-4,75	562,3	3162,3	17782,8
cobimetinib	-8	-7,25	-6,5	10,0	56,2	316,2
docetaxel	-9,25	-8,75	-8,25	0,6	1,8	5,6
doxorubicin	-8	-7,25	-6,5	10,0	56,2	316,2
etoposide	-6,75	-6	-5,25	177,8	1000,0	5623,4
everolimus	-8,5	-7,75	-7	3,2	17,8	100,0
fludarabine	-8	-7,25	-6,5	10,0	56,2	316,2
erlotinib	-6,75	-6	-5,25	177,8	1000,0	5623,4
gemcitabine	-7,5	-6,75	-6	31,6	177,8	1000,0
lapatinib	-7	-6,25	-5,5	100,0	562,3	3162,3
mitomycin	-8	-7,25	-6,5	10,0	56,2	316,2
olaparib	-6,5	-5,75	-5	316,2	1778,3	10000,0
oxaliplatin	-6,5	-5,75	-5	316,2	1778,3	10000,0
paclitaxel	-9	-8,5	-8	1,0	3,2	10,0
pemetrexed	-8,25	-7,5	-6,75	5,6	31,6	177,8
sotorasib	-5	-5,5	-4,5	10000,0	3162,3	31622,8
regorafenib	-6,5	-5,75	-5	316,2	1778,3	10000,0
sn-38	-9	-8,5	-8	1,0	3,2	10,0
cabozantinib	-6,75	-6	-5,25	177,8	1000,0	5623,4
trifluridin- tipiracil	-6,5	-5,75	-5	316,2	1778,3	10000,0
vinorelbine	-8,75	-8	-7,25	1,8	10,0	56,2
vorinostat	-6,75	-6,25	-5,75	177,8	562,3	1778,3
sunitinib	-7	-6,5	-6	100,0	316,2	1000,0
gefitinib	-7,5	-6,75	-6	31,6	177,8	1000,0

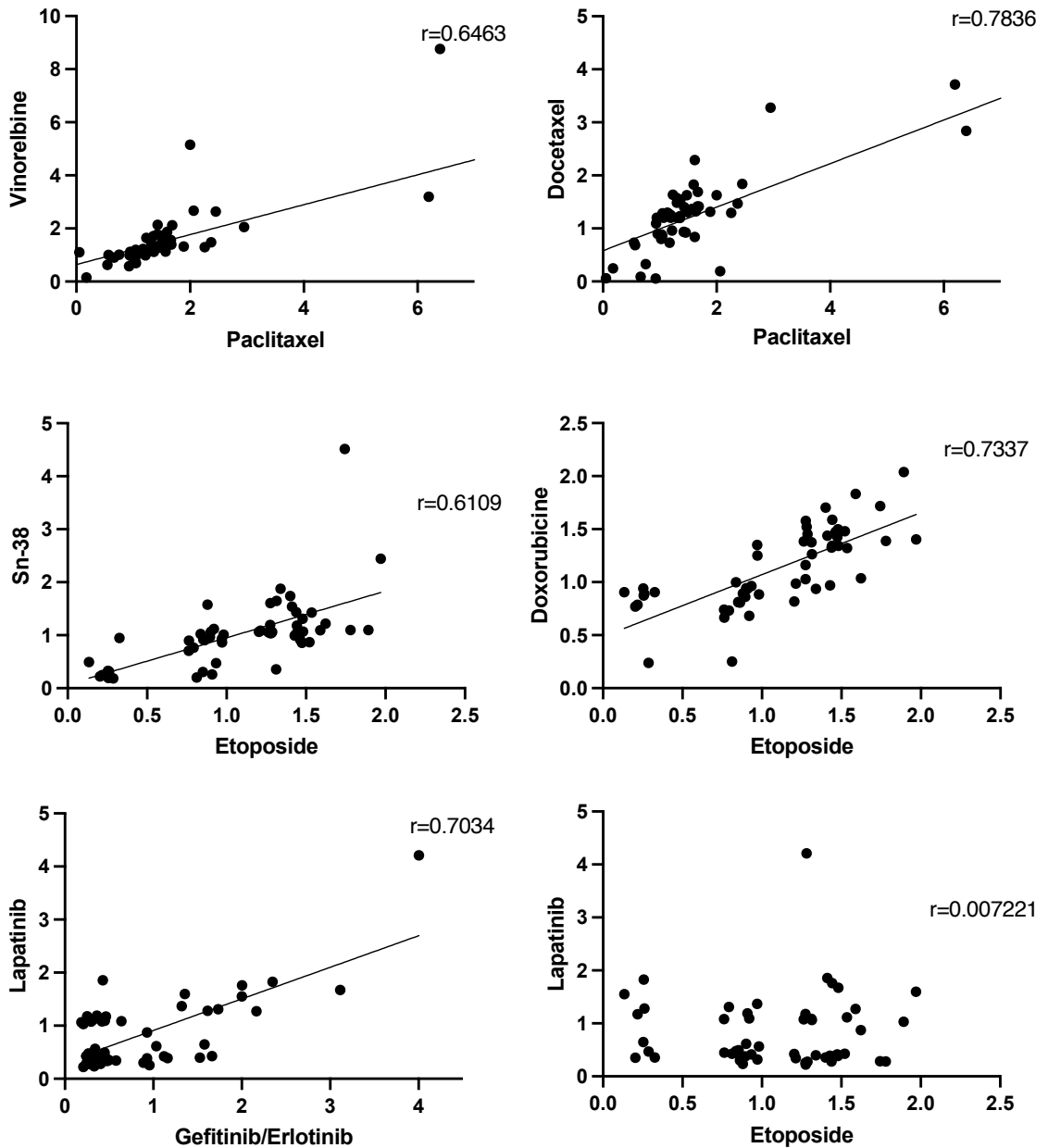
Supplementary table 2. Characteristics of evaluable patients (n=34)		
Variables	Treated with a “non-hit” drug (n=27)	Treated with a “hit” drug (n=7)
Age, years, mean (SD)	60.0 (10.3)	56.7 (10.4)
Sex (female) (n,%)	12 (44%)	2 (29%)
CA 19-9 at diagnosis (UI/mL), median (IQR)	2343 (217-2000)	1794 (456-2311)
Surgical stage		
Resectable	5 (19%)	0 (0%)
Borderline	1 (4%)	0 (0%)
Locally advanced	1 (4%)	1 (14%)
Metastatic	20 (74%)	6 (86%)
Metastases		
Metachronous metastases (n,%)	7 (26%)	1 (14%)
Metastases sites		
Liver (n,%)	23 (85%)	5 (71%)
Lung (n,%)	4 (15%)	2 (29%)
Nodes (n,%)	4 (15%)	0 (0%)
Peritoneum (n,%)	5 (19%)	2 (29%)
Bone (n,%)	1 (4%)	0 (0%)
Other (n,%)	3 (11%)	0 (0%)
Number of palliative chemotherapy lines prior PDO		
0 (n,%)	0 (0%)	1 (14%)
1 (n,%)	7 (26%)	5 (71%)
2 (n,%)	13 (48%)	1 (14%)
3 (n,%)	5 (19%)	0 (0%)
>=4 (n,%)	2 (7%)	0 (0%)
Treatments prior PDO collection		
FOLFIRINOX (n,%)	27 (100%)	6 (86%)
Gemcitabine (n,%)	19 (70%)	1 (14%)
Paclitaxel/nabpaclitaxel (n,%)	16 (59%)	0 (0%)
Performans status (ECOG) at time of PDO		
0-1	27 (100%)	5 (71%)
>=2	0 (0%)	2 (29%)
Tumor somatic molecular alterations		
KRAS (n,%)	24 (89%)	6 (86%)
TP53 (n,%)	21 (78%)	6 (86%)
CDKN2A/B (n,%)	8 (30%)	1 (14%)
SMAD4 (n,%)	4 (15%)	0 (0%)

Supplementary figure 1

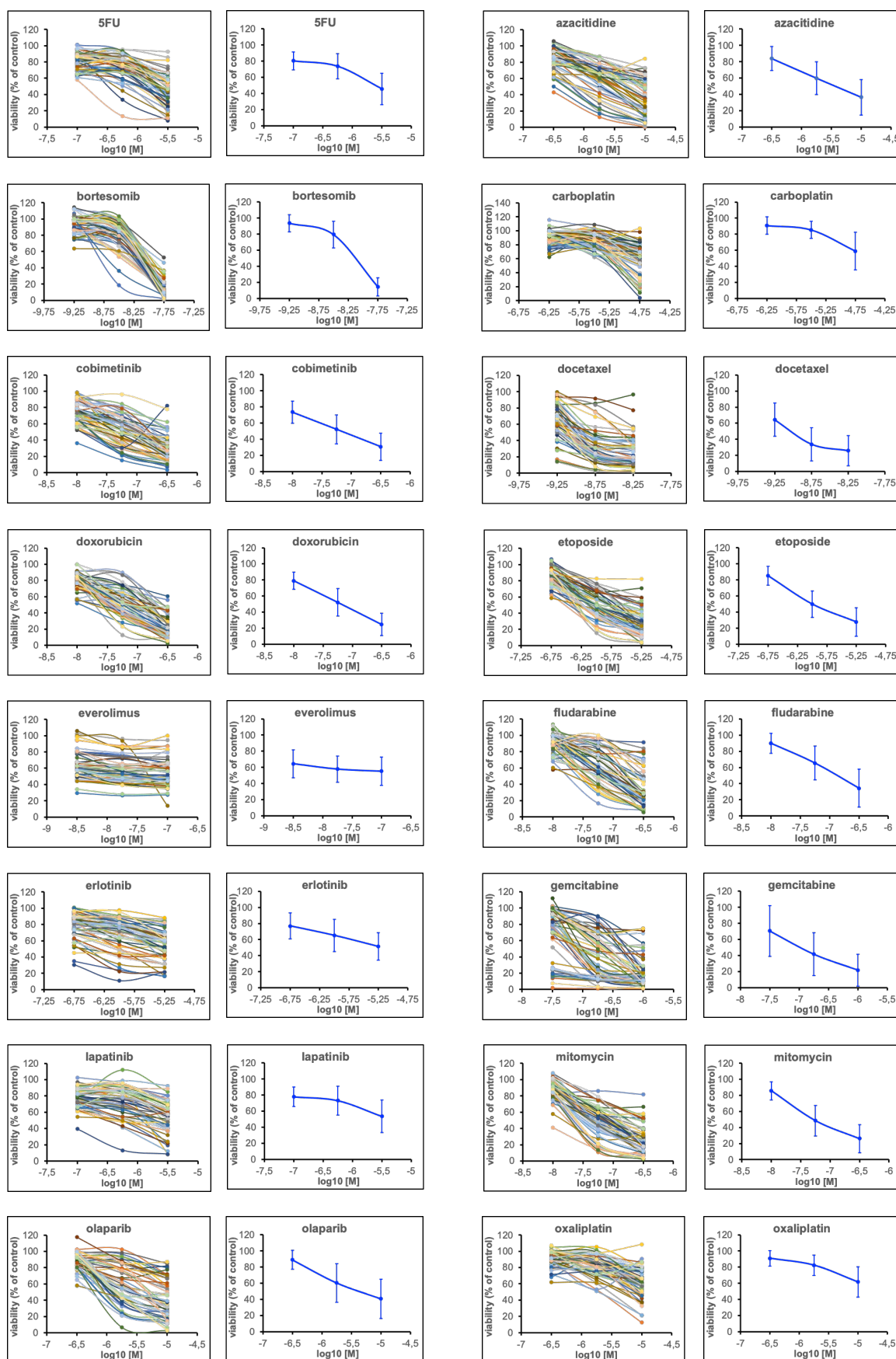
A

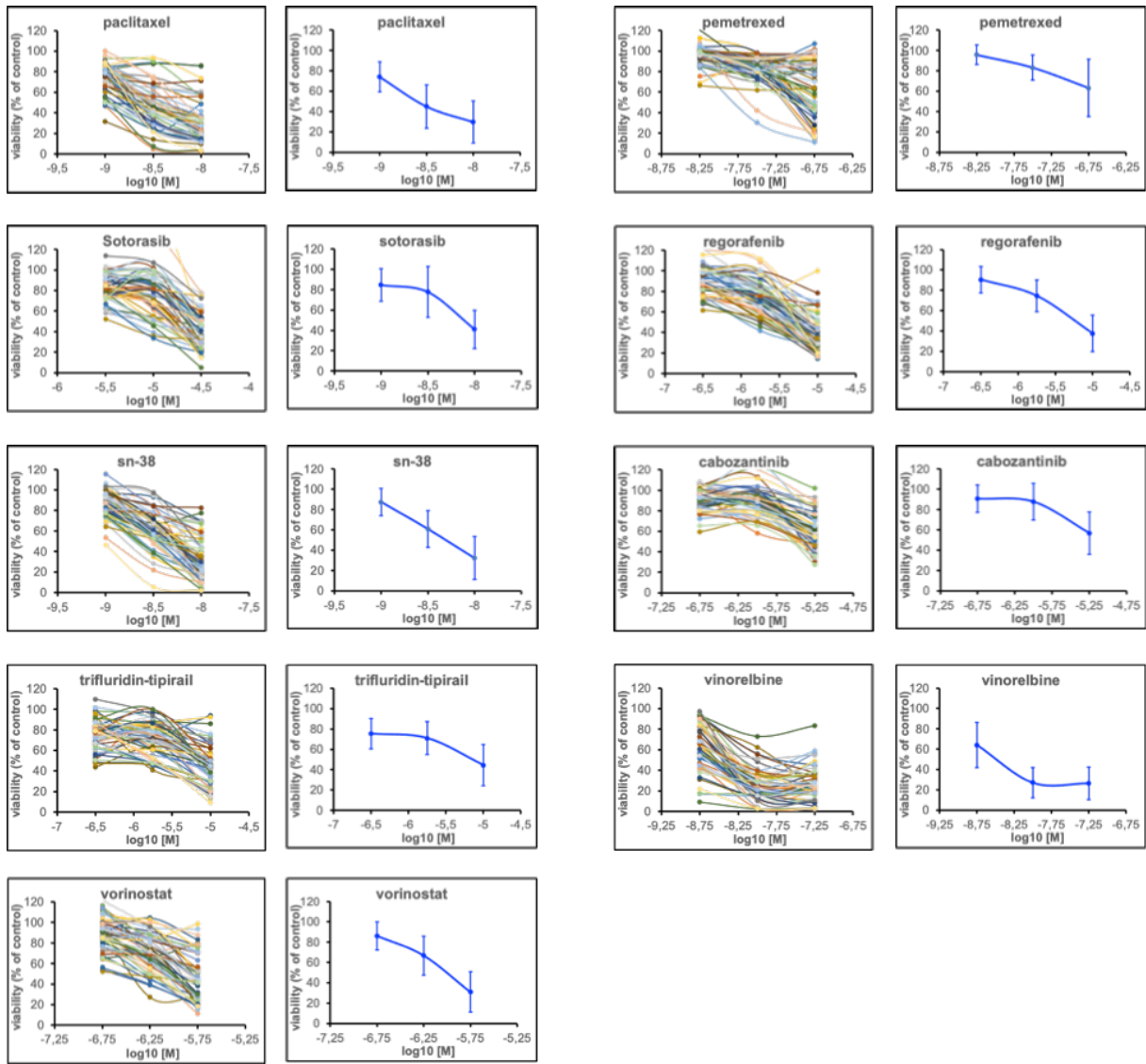


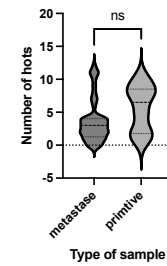
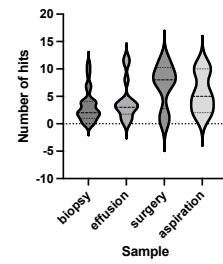
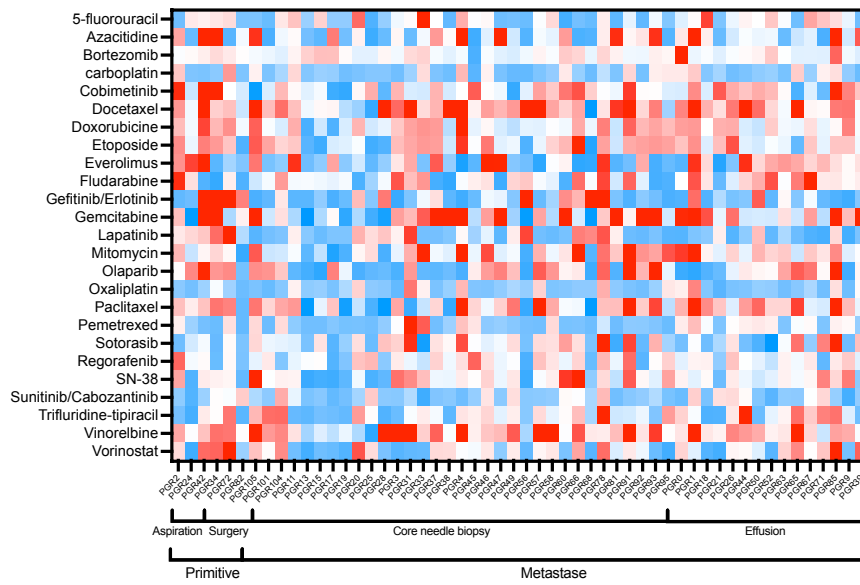
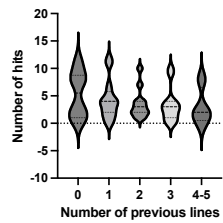
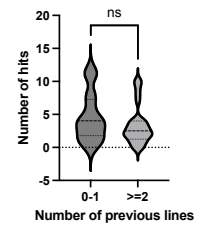
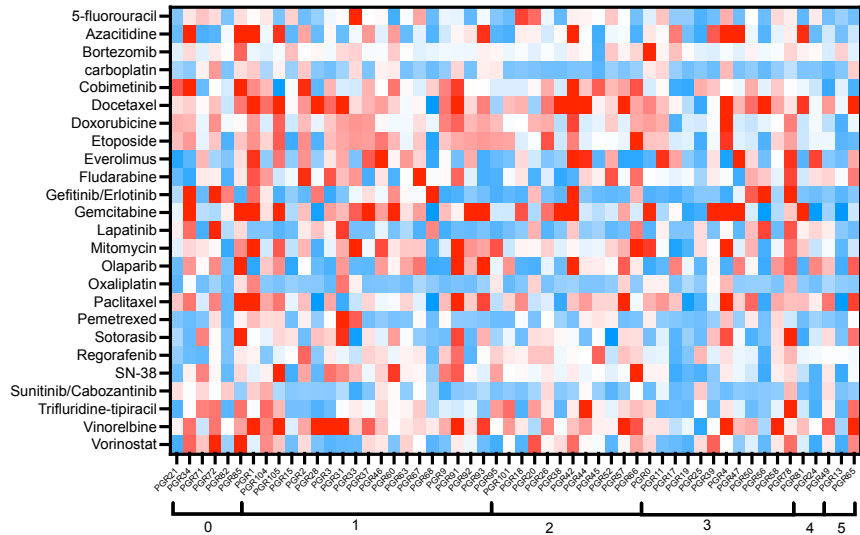
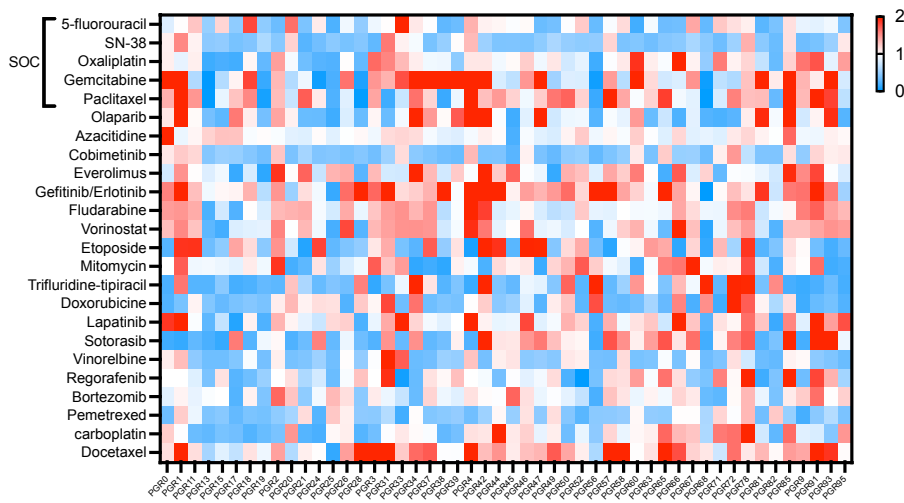
B



Supplementary figure 2

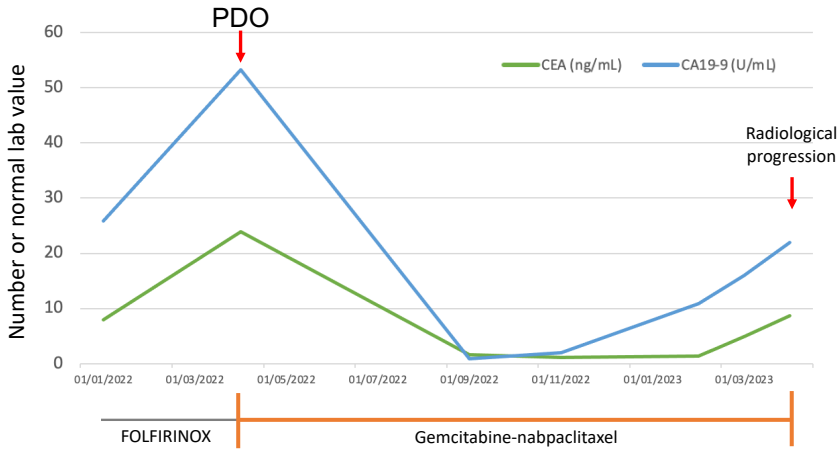




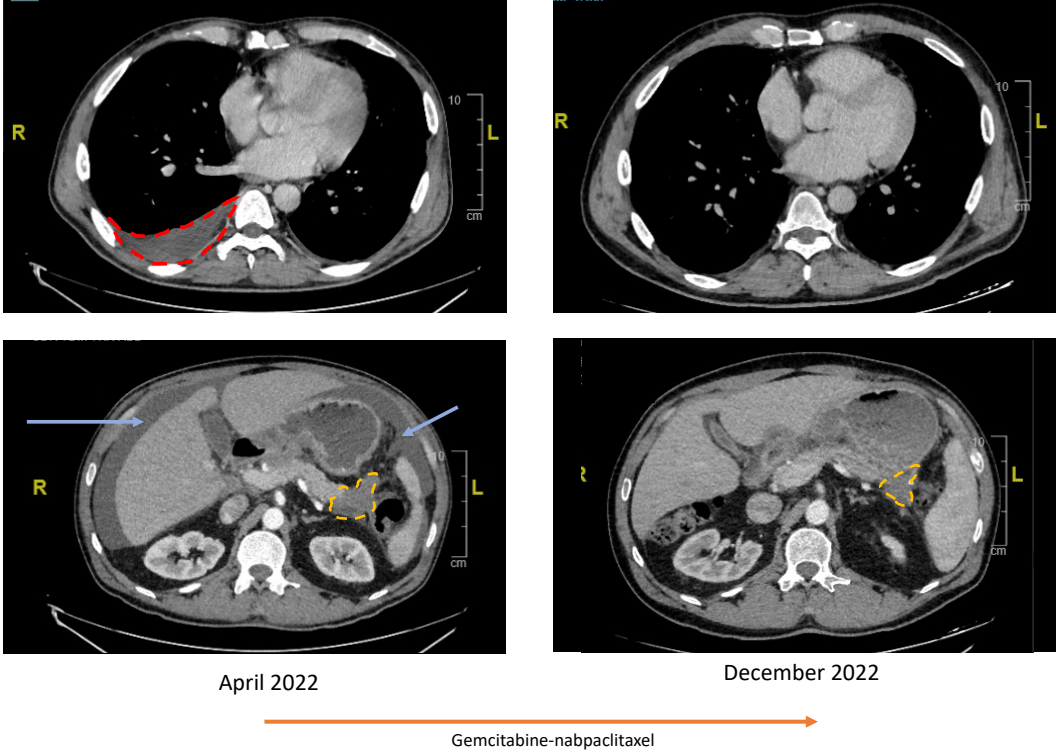
A**Supplementary figure 3****B****C**

Supplementary figure 4

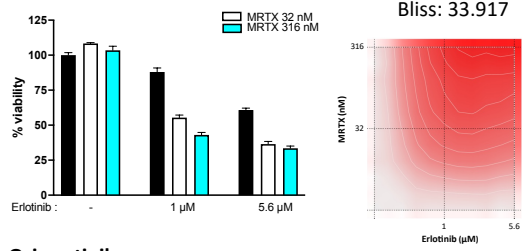
A



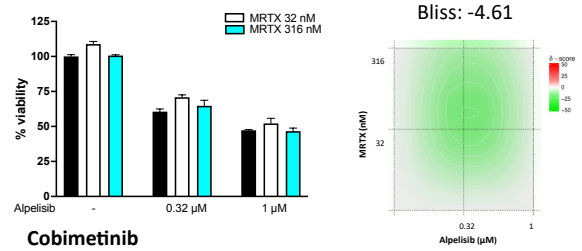
B



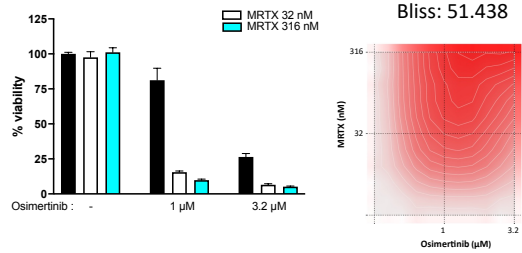
Erlotinib



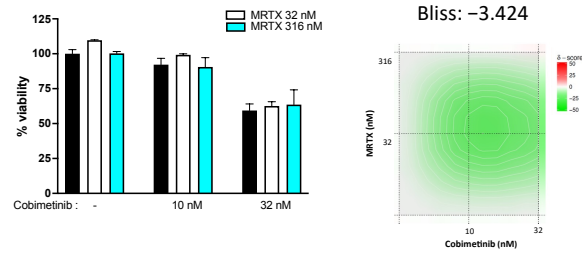
Alpelisib



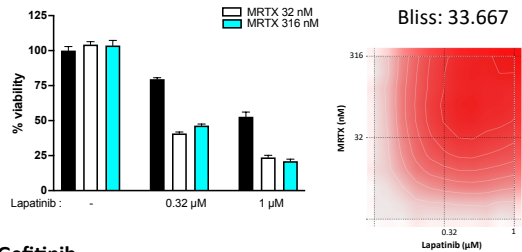
Osimertinib



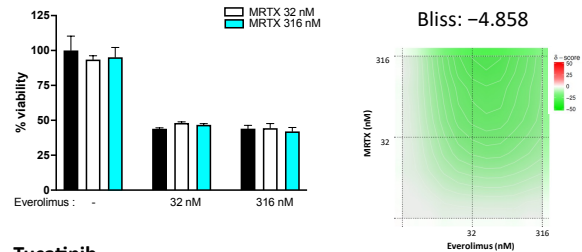
Cobimetinib



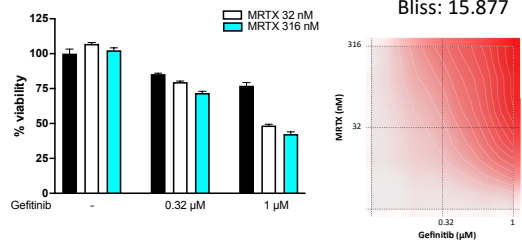
Lapatinib



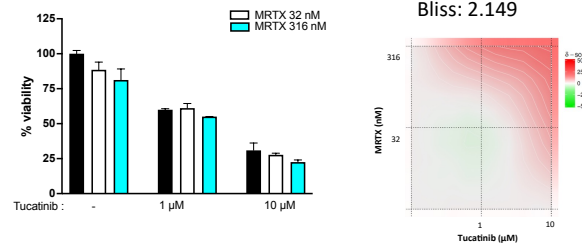
Everolimus



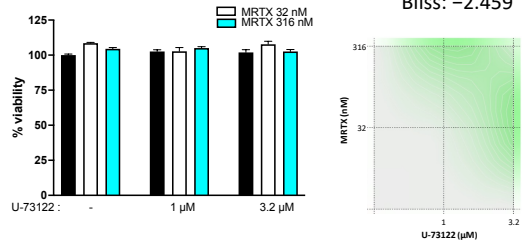
Gefitinib



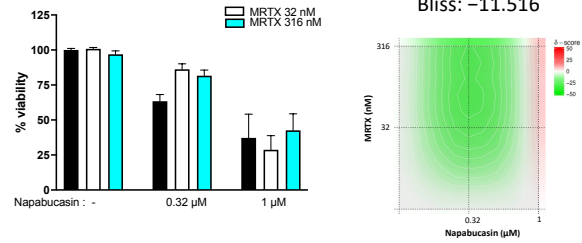
Tucatinib



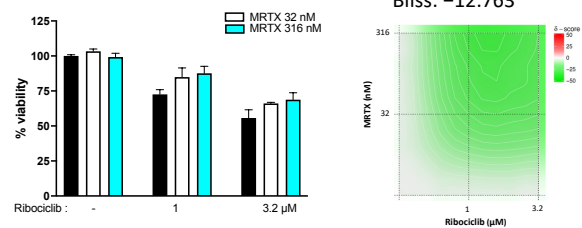
U-73122



Napabucasin



Ribociclib



Supplementary figure 5

II. LES ORGANOÏDES EN PRE-CLINIQUE

Contexte :

Les organoïdes pourraient jouer un rôle dans les essais précliniques, notamment pour tester rapidement et facilement des molécules, seules ou en combinaison. Nous avons testé ainsi un inhibiteur de KRAS_{G12D}, le MRTX1133 (165,166), une molécule prometteuse pour la prise en charge du PDAC, aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec d'autres inhibiteurs. La FDA a maintenant approuvé les essais de phase I basés sur des modèles précliniques tels que le PDO (sans passer forcément par un modèle murin), et l'approche basée sur le PDO pourrait permettre de gagner du temps (choisir la bonne combinaison) et de l'argent, ainsi que d'être éthiquement favorable (donner aux patients la meilleure combinaison).

Principaux résultats :

- La collection de PDO a pu servir de plateforme préclinique pour déterminer l'activité des médicaments à l'échelle de la population (grâce à des lignées primaires tumorales représentant l'hétérogénéité des tumeurs).
- Parmi les concentrations testées de MRTX1133, au moins quatre lignées de PDO KRAS_{G12D} sur dix se sont révélées peu sensibles au MRTX1133.
- Dans les expériences en monothérapie, à la concentration maximale testée de 1 µM, la viabilité moyenne des PDO KRAS_{G12D} était de 48% contre 81% pour les autres lignées de PDO.
- Des thérapies combinatoires ont été explorées pour compenser l'activité faible et hétérogène du MRTX1133, et une synergie a été observée uniquement avec les médicaments ciblant l'EGFR dans les PDO KRAS_{G12D}.
- La synergie entre les médicaments anti-EGFR et le MRTX1133 a été confirmée dans un échantillon de 19 lignées de PDO, où seul les anti-EGFR a induit un effet synergique, spécifiquement dans les lignées KRAS_{G12D}.
- Ces résultats suggèrent que les médicaments anti-EGFR, en combinaison avec le MRTX1133, pourraient être une stratégie thérapeutique potentielle pour les PDO KRAS_{G12D} dans le cadre clinique.

Résultats complémentaires (non intégrés dans la publication):

Afin d'élucider le mécanisme de la synergie entre le MRTX1133 et les anti-EGFR, j'ai réalisé deux expériences complémentaires.

1. Phospho-ome de la voie EGF : puce Full Moon (269)

L'activation des voies de l'EGFR a été évaluée à l'aide de phospho-anticorps de la voie de l'EGF comprenant 214 anticorps (Full Moon, Biosystems, CA), dans une approche de type « omique ». Les organoïdes d'une lignée *KRAS_{G12D}* ont été traités 24h avec du MRTX1133 seul, de l'erlotinib seul, la combinaison des deux ou rien, avec les concentrations donnant une synergie maximale selon les tests de chimiosensibilité. Les organoïdes ont alors été récupérés et stockés à -80°C avant d'être envoyés directement au laboratoire Full Moon®. Le test en lui-même a été externalisé et réalisé par Full Moon® sur des puces spécifiques sur lesquelles sont fixés les anticorps. Sur ces puces, il existe deux types d'anticorps, les anticorps phospho et les anticorps non phospho, tels que p53 (Phospho-Ser15) et p53 (Ab-15). L'anticorps non-phospho détecte les niveaux endogènes de la protéine totale. L'anticorps phospho détecte les niveaux endogènes uniquement lorsqu'elle est phosphorylée. Dans la plupart des cas, les anticorps phospho-spécifiques et leurs paires non-phospho sont inclus dans le réseau.

L'analyse des voies en aval de la signalisation de l'EGF a révélé une diminution significative de l'activation de composants de signalisation spécifiques de la voie JNK, qui joue un rôle majeur dans la morphogenèse épithéliale ainsi que dans l'immunité, la mort cellulaire, la cicatrisation, la régénération et plusieurs cancers chez l'homme. Néanmoins, d'autres facteurs en amont tels que MEK étaient réactivés, ce qui peut être expliqué par une boucle de rétrocontrôle. Nous n'avons pas poussé plus loin les analyses car un article, paru à la même période, reprenait les mêmes idées et, par soucis de temps et pragmatisme, l'étude n'a pas été poursuivie pour le moment (157).

2. Test d'inactivation de *KRAS*

Au vu de la synergie du MRTX1133 avec les anti-EGFR, nous nous sommes demandé si le mécanisme pouvait être lié à la signalisation par l'allèle sauvage de *KRAS*. Nous avons donc, avec l'aide de la plateforme CRISPR de Gustave Roussy (Julie Rivière et Maroussia Halter), créé

des lignées d'organoïdes en inactivant spécifiquement l'allèle muté ou l'allèle sauvage ou l'ensemble du gène *KRAS* (Figure 31).

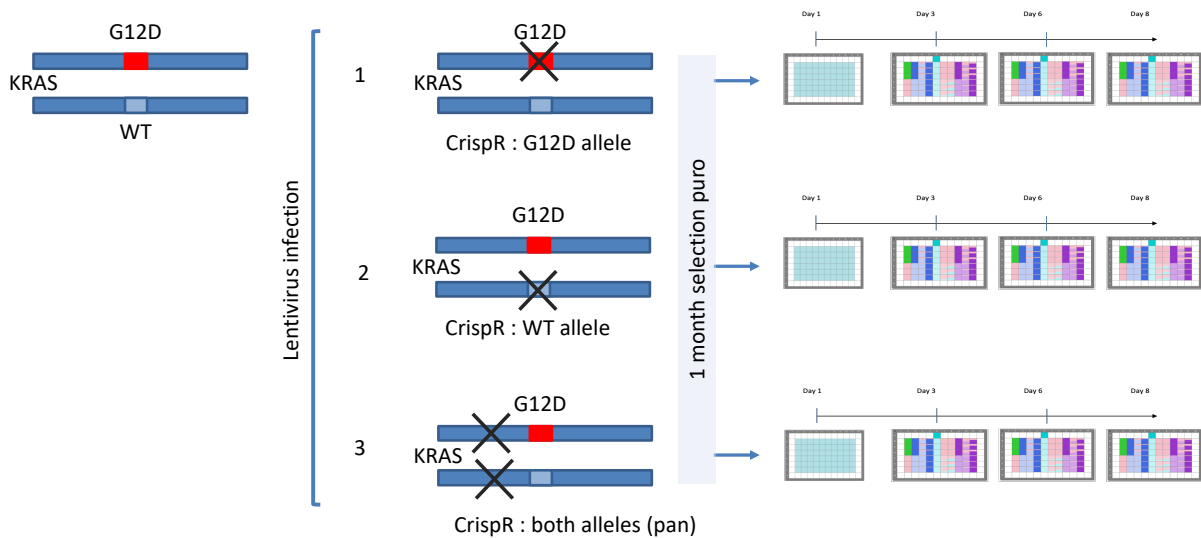


Figure 31: Principe du test d'inactivation de *KRAS*

Après infection lentivirale et un mois de sélection par puromycine, nous avons testé le MRTX1133 seul puis en combinaison avec les anti-EGFR (erlotinib, osimertinib et lapatinib), anti-PI3K (alpelisib), anti-mTOR (everolimus) et anti-MEK (cobimetinib). En mono-thérapie, l'effet du MRTX1133 n'a pas été augmenté en inactivant l'allèle WT de *KRAS* (WT), et diminué en inactivant l'allèle muté (G12D). L'inactivation des 2 allèles de *KRAS* (pan) a également diminué l'effet du MRTX1133 (Figure 32).

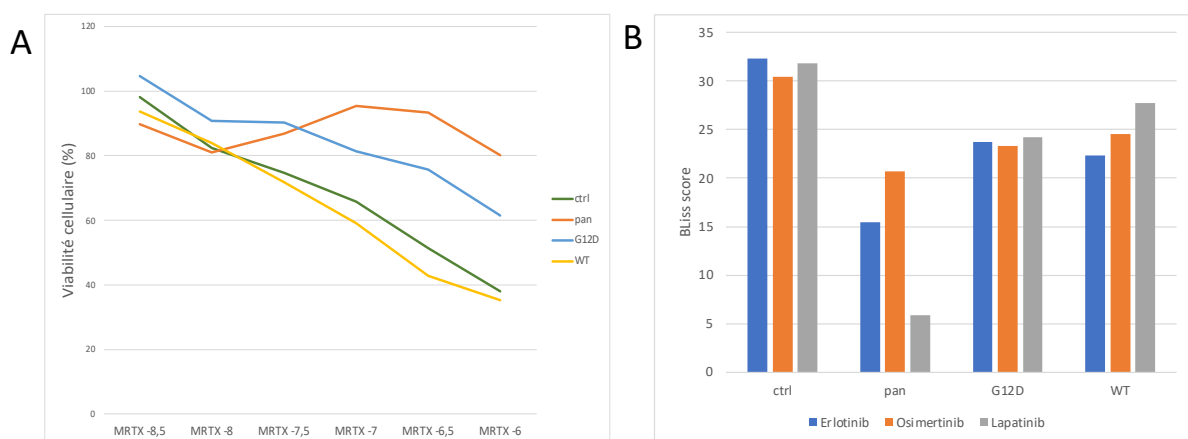


Figure 32 : Expérience de Knock-out de différentes formes de *KRAS* (ctrl : Contrôle, pan : effet sur la forme mutée ou non de *KRAS*, G12D : cible seulement la mutation G12D, WT : cible seulement la forme sauvage). A. Effet sur la viabilité cellulaire du MRTX1133 en monothérapie ; B. Score de synergie (Bliss score) entre MRTX1133 et anti-EGFR pour les 4 formes mutées.

En combinaison, les scores de synergie étaient largement diminués pour la lignée « pan-KRAS » avec KO de la forme mutée et de la forme sauvage de KRAS. L'effet était plus modéré pour la lignée G12D et WT. A noter qu'une étude investiguant la même hypothèse, à savoir que la synergie passait via la signalisation par les isoformes non mutées de *KRAS* (incluant *HRAS* et *NRAS*) est parue pendant que la sélection antibiotique était en cours (157). Nous avons donc choisi de ne pas poursuivre les investigations et avons ajouté la partie de tests de sensibilité du MRTX1133 dans le manuscrit sur la cohorte d'organoïdes de pancréas en partie d'ouverture. Les knock-out n'ont donc pas été confirmés ni en séquençage ni en Western Blot.

III. MEDECINE DE PRECISION POUR LES CANCERS DU PANCREAS *KRAS* SAUVAGE

Contexte :

En dehors du groupe de patients présentant une mutation *KRAS*, un sous-groupe de 8 à 10 % des PDAC a une forme sauvage *KRAS* (non mutée, ou *KRAS* WT) et présentent des caractéristiques cliniques et moléculaires spécifiques (146,270). Ces patients semblent présenter un meilleur pronostic que les PDAC mutés *KRAS* (*mKRAS*) (146,270). Ce sous-groupe pourrait présenter un paysage génétique plus varié avec plusieurs cibles potentiellement exploitables, notamment des mutations faux-sens activatrices de *BRAF* ou des fusions de gènes RTK impliquant notamment *FGFR2*, *NRG1*, *NTRK1* ou *RET* (271). Dans cette étude rétrospective monocentrique, nous avons analysé les caractéristiques cliniques, la survie et les co-mutations des patients atteints de PDAC en fonction de la présence d'une mutation *KRAS* ou pas, ainsi que la réponse aux principaux schémas de chimiothérapie et l'impact de l'utilisation de thérapies ciblées et adaptées au profil moléculaire. Nous avons également étudié le profil d'expression des gènes par séquençage d'ARN.

Principaux résultats :

- Sur les 342 patients inclus, 54 (16%) présentaient une forme sauvage de *KRAS* et 288 (84%) une forme mutée de *KRAS*.
- Les patients *KRAS*_{WT} présentaient moins souvent des métastases hépatiques au diagnostic de métastases dans notre cohorte.
- La survie médiane globale depuis le diagnostic métastatique était plus longue chez les patients *KRAS*_{WT} que chez les patients *KRAS*_m, avec une médiane de 32.8 mois, IC95%[25.9-NR] vs 21.5 mois, IC95%[18.8-24.9] (p<0.05 après ajustement).
- On retrouvait plus d'altérations ciblables dans les tumeurs avec une forme sauvage de *KRAS*, définies comme une altération ESCAT I à III (37% vs 17%), avec un enrichissement en altération de *BRAF*, *FGFR2*, *NRG1*, *RET* notamment et en altérations de la voie DDR (*DNA Damage Repair*).
- Le traitement par thérapies ciblées a montré une amélioration de la survie à la fois chez les patients *KRAS*_m et les patients *KRAS*_{WT}.

(Travail accepté à *European Journal of Cancer* le 12/12/2023)



Original research

Precision medicine for *KRAS* wild-type pancreatic adenocarcinomas

Imen Ben-Ammar^{a,b}, Adrien Rousseau^{a,c,d}, Rémy Nicolle^{e,1}, Anthony Tarabay^{a,1},
Valérie Boige^a, Marine Valery^a, Thomas Pudlarz^a, David Malka^a, Maximiliano Gelli^f,
Elena Fernandez-De-Sevilla^f, Alina Fuerea^e, Marie-Laure Tanguy^d, Etienne Rouleau^g,
Rémy Barbe^h, Jacques R.R. Mathieuⁱ, Fanny Jaulin^{i,j}, Cristina Smolenschi^{a,k},
Antoine Hollebécq^{a,k}, Michel Ducreux^{a,i,j}, Alice Boileve^{a,i,j,*}

^a Gustave Roussy, Département de Médecine, 94800 Villejuif, France^b Sorbonne Université, Faculté de Médecine, 75005 Paris, France^c Oncostat INSERM U1018, Gustave Roussy, Ligue Contre le Cancer, Université Paris-Saclay, Villejuif, France^d Gustave Roussy, Département de Biostatistiques et D'épidémiologie, Université Paris-Saclay, Villejuif, France^e Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI), INSERM, U1149, CNRS, ERL 8252, Université Paris Cité, Paris, France^f Gustave Roussy, Département de Chirurgie, 94800 Villejuif, France^g Gustave Roussy, Département de Génétique Médicale, 94800 Villejuif, France^h Gustave Roussy, Département de Radiologie, 94800 Villejuif, Franceⁱ INSERM U1279, Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France^j Université Paris Saclay, 91471 Orsay, France^k Gustave Roussy, DITEP, 94800 Villejuif, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Pancreatic adenocarcinoma
Precision medicine
KRAS
Actionable molecular alterations

ABSTRACT

Background: *KRAS* mutation is the most common molecular alteration in pancreatic adenocarcinoma (PDAC), and around 10% of patients harbor *KRAS* wild-type tumors (*KRAS*_{WT}).

Methods: A retrospective chart review of clinical/molecular data was performed including all PDAC patients with a determined *KRAS* status (tumor molecular profiling on tissue or liquid biopsy).

Results: 342 patients were included with 54 *KRAS*_{WT} PDAC (16%) compared to 288 patients with *KRAS*_m PDAC. Median age was 61 years [IQR:54.0;67.0] and 164 pts (48%) were female. At diagnosis, *KRAS*_{WT} patients (63%) were more frequently diagnosed at a non-metastatic stage compared to *KRAS*_m patients (41%) ($p = 0.003$). Regarding metastatic sites, liver was less frequent in *KRAS*_{WT} (39%, $p < 0.0001$).

Median overall survival (mOS) from initial diagnosis was significantly higher in the *KRAS*_{WT} group compared to *KRAS*_m (50.8 months, CI95% [32.0-NR] vs 21.1 months, CI95% [18.9–23.4] ($p < 0.004$ after adjustment on age, ECOG and stage at diagnosis). In first-line systemic treatment, (mostly FOLFIRINOX) progression-free survival (PFS) was also higher in *KRAS*_{WT}.

Based on ESCAT classification, a putative actionable alteration (ESCAT I-III) was identified in 19 (36%) *KRAS*_{WT} pts and 46 (16%) *KRAS*_m patients ($p < 0.0001$) with more alterations in *FGFR2*, *BRAF*(V600E), *NRTK* and more MSI tumors. *KRAS*_{WT} harbored also fewer alterations in *TP53*, *CDKN2A*, and *SMAD4*. 12 *KRAS*_{WT} patients received a molecularly-matched treatment with clinical benefit and improved outcomes compared to *KRAS*_m patients.

Conclusions: *KRAS*_{WT} patients display distinct disease characteristics and outcomes with prolonged overall survival. *KRAS*_{WT} patients also harbor more actionable molecular alterations, leading to higher survival rates after receiving molecularly matched treatments.

* Correspondence to: 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.

E-mail address: Alice.boileve@gustaveroussy.fr (A. Boileve).¹ Co-third authors<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.113497>

Received 30 October 2023; Received in revised form 7 December 2023; Accepted 12 December 2023

Available online 15 December 2023

0959-8049/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

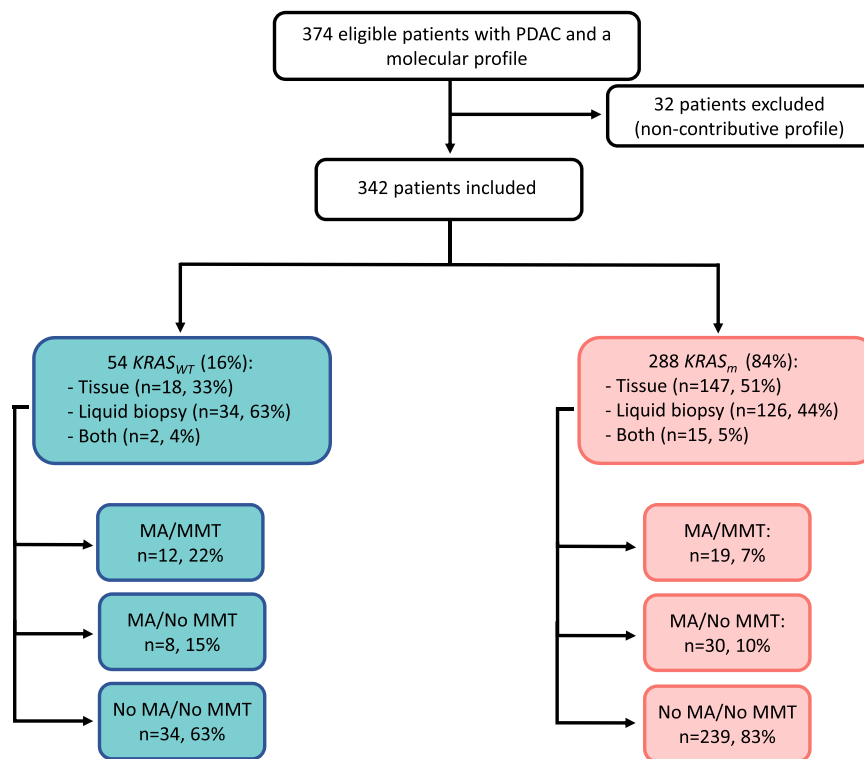


Fig. 1. Flow chart of the study. *KRAS* status and other molecular alterations were determined on tumor molecular profiling as part of routine care using an in-house panel or Foundation Medicine NGS either on tumoral tissue, liquid biopsy or both.

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is currently the fourth-highest contributor to cancer-related death [1]. However, its incidence is rising, and it is predicted to become the second cause of cancer-related death in 2030–2040 in industrialized countries [2]. With a 5-year overall survival rate of less than 10% considering all disease stages [1], PDAC is listed as a highly lethal solid tumor with limited therapeutic options mainly based on palliative chemotherapy regimens. Besides, PDAC did not benefit significantly from novel therapeutic advances such as immunotherapy or targeted therapies [3].

KRAS is a key oncogenic driver involved very early during tumor formation [4] that drives the elevation of active *KRAS* protein bound to GTP, leading to activation of oncogenic pathways downstream *KRAS* and thus promoting cell proliferation and survival [5]. Alongside *KRAS*, which is observed in more than 90% of pancreatic cancers, loss of tumor suppressor genes such as *TP53*, *SMAD4*, and *CDKN2A* are also frequently observed [6].

Apart from this large group of *KRAS* mutant tumors, a subgroup of 8 to 10% of PDAC harbor a *KRAS* wild-type (*KRAS*_{WT}) status and have specific clinical and molecular features [7,8]. These patients exhibit in most studies a better prognosis than *KRAS*-mutated PDAC (*KRAS*_m) [7, 8]. Interestingly, this subgroup exhibits a larger genetic landscape with several potentially actionable targets including activating *BRAF* mutations [7,9] or receptor tyrosine kinase (RTK) gene fusions [7–12]. Nevertheless, more studies are needed to confirm these findings, especially outcomes of *KRAS*_{WT} patients receiving molecularly-matched treatments (MMT).

In this study, we analyzed the clinical characteristics, outcomes and co-alterations of PDAC patients depending on *KRAS* status as well as MMT outcomes in a precision-medicine approach. We also studied gene expression profile using RNA sequencing.

2. Patients and methods

2.1. Patients

All consecutive patients with a histologically-confirmed PDAC from 2015–2022 followed in our institution were eligible and included when a contributive molecular profile was available as part of MOSCATO (NCT01566019), MATCH-R (NCT02517892) or STING (NCT0493252) trials. Data were collected by hospital chart review and managed using *REDCap* electronic data capture tools hosted at Gustave Roussy. This retrospective study complies with the French MR004 methodology regarding general data protection regulation for non-interventional retrospective health research and was approved by our institutional review board (CSET N°2022–94), in compliance with Helsinki declaration.

2.2. Molecular alteration analyses

Unselected PDAC patients were offered molecular profiling as part of their routine clinical management through inclusion into our institutional precision medicine programs in an attempt to identify actionable molecular alterations. The different molecular panels included in-house panel on tumor tissue, or FoundationMedicine® (tumor tissue) or *FoundationOne Liquid CDx*® (liquid biopsy) panels (Supplementary Data 1). Classification of actionability of molecular alterations was performed based on ESCAT classification (Supplementary Table 1) [13]. Treatments were defined as matched (molecularly-matched treatment=MMT) if a molecular abnormality was linked to a specific and targeted therapy (including standard therapies, off-label therapies, and enrolment into specific clinical trials). MMT for homologous recombination deficiency (HRD) tumors (Supplementary Data 1) was defined only as small molecule inhibitors, including PARP inhibitors and ATR inhibitors (platinum being considered as unmatched). Methods for sample processing and transcriptomic analyses are described in the Supplementary Data 2.

Table 1
Characteristics of patients (n = 342).

Variables	<i>KRAS</i> _{WT} (n = 54)		<i>KRAS</i> _m (n = 288)		P-value
Age, years, mean (SD)	62.9	(11.3)	60.0	(10.2)	0.06
Sex (female) (n,%)	25	(46%)	139	(48%)	0.79
CA 19-9 at diagnosis (UI/mL), median (IQR) (NA: 134)	169	[91.0;2000.0]	950	[190.0;8000.0]	0.02
Smoking history (NA: 80)	11	(27%)	91	(41%)	0.08
Alcohol consumption (NA: 101)	15	(39%)	51	(25%)	0.06
Thrombosis history (NA: 37)	16	(31%)	89	(35%)	0.61
ECOG at diagnosis (NA: 74)					
≥ 2	0	(0%)	12	(5%)	0.13
0-1	47	(100%)	209	(95%)	
Stage at diagnosis					0.002
Metastatic (n, %)	20	(37%)	170	(59%)	
Non-metastatic (n, %)	34	(63%)	117	(41%)	
NA	0		1		
Lesion resectability at non-metastatic stage					
Resectable	11	(35%)	52	(47%)	0.18
Borderline	6	(19%)	28	(25%)	
Locally advanced	14	(45%)	31	(28%)	
NA	3		6		
Primary tumor localization at diagnosis					
Head (n, %)	24	(51%)	107	(44%)	0.55
Crochet (n,%)	2	(4%)	17	(7%)	
Body (n,%)	11	(23%)	53	(22%)	
Tail (n,%)	6	(13%)	53	(22%)	
Isthmus (n,%)	4	(9%)	14	(6%)	
Unknown	7		44		
Tumor size, mm, mean (SD)	36.0	(13.1)	38.6	(19.3)	0.82
Metastases					
Metachronous metastases (n,%)	16	(29%)	79	(27%)	0.0017
Metastases sites at metastatic diagnosis					
Liver (n,%)	21	(39%)	205	(71%)	< 0.0001
Lung (n,%)	7	(13%)	53	(18%)	0.32
Nodes (n,%)	6	(11%)	44	(15%)	0.42
Peritoneum (n,%)	13	(24%)	47	(16%)	0.17
Bone (n,%)	2	(4%)	11	(4%)	1.0
Adrenal	1	(2%)	5	(2%)	1.0
Ovarian	1	(2%)	4	(1%)	0.58
Other (n,%)	3	(6%)	5	(2%)	0.11

Baseline clinical, tumoral and biological patients' features. Any significant difference between groups is mentioned in bold.

2.3. Clinical outcomes

Only patients in whom at least one line of therapy in the advanced setting was initiated were included in the analyses of MMT effects. To reduce variability due to the timing of molecular profiling and sample obtainment, we calculated median overall survival (OS) defined as time from diagnosis to death from any cause after adjustment on stage, line of MMT and age, based on three categories: no molecular alteration (No MA/No MMT), molecular alteration but no MMT (MA/No MMT) and

molecular alterations and MMT (MA/MMT). We calculated median PFS from the date of initiation of MMT to progression or death, and if patient received no MMT, we considered the following line after molecular profiling (patients that did not receive a treatment after molecular profiling were excluded from PFS-MMT analysis). Growth modulator index (GMI) was defined as the ratio of progression-free survival (PFSn, e.g. during MMT line) to PFS of the line before MMT (PFSn-1) [14]. A GMI ≥ 1.3 was considered as relevant clinical benefit, meaning TTPn is at least superior by 30% as compared to TTPn-1 [14].

2.4. Statistics

Descriptive analysis was performed with Fisher's exact test and Pearson's Chi-squared test for factorial variables and with two sample t-test and Wilcoxon rank sum test for quantitative variables. Survival curves are based on Kaplan-Meier non-parametrical estimation and univariate analysis was performed with Log-rank test. Multivariate analyses were performed with a proportional hazard Cox model, adjusted on known prognosis factors (age, ECOG, stage at diagnosis, presence of liver metastases). Statistical analyses were performed with RStudio2022.12.0 + 353 "ElsbethGeranium" Release.

3. Results

3.1. Clinical features

In our cohort, out of 342 patients with a confirmed diagnosis of PDAC and a contributive molecular profile, 288 patients (84%) were *KRAS*_m and 54 (16%) were *KRAS*_{WT} (Figure 1). Median age at diagnosis was 61 years-old in the *KRAS*_m group and 64.5 years-old in the *KRAS*_{WT} group (p = non-significant (NS)) and ECOG status was 0-1 in 95% of patients. No significant differences were found regarding disease discovery mode and symptoms but *KRAS*_{WT} patients had less informative biomarker (CEA and CA19.9) (Table 1). *KRAS*_{WT} (63%) patients were more often diagnosed at non-metastatic stage compared to *KRAS*_m (41%) (p = 0.002). Among non-metastatic patients, there were 63 (44%) resectable disease, 34 (24%) borderline disease and 45 (32%) locally advanced disease (p = NS for *KRAS*_{WT} vs *KRAS*_m). Management of non-metastatic disease was not statistically different between groups (Supplementary Table 2). During the follow-up, metachronous metastases occurred in 16 (29%) patients in the *KRAS*_{WT} group and 79 (27%) patients in the *KRAS*_m group (p = 0.0017) (Table 1). In both groups, liver was the most frequent metastatic site (66% of cases), followed by peritoneum (18%), lungs (18%), and lymph nodes (15%) (Table 1). *KRAS*_m patients exhibit more often liver metastases compared to *KRAS*_{WT} patients (71% vs 39%, p < 0.0001).

3.2. Outcomes

Median OS from initial diagnosis was 50.8 months (95%CI:32.0-NR) in *KRAS*_{WT} and 21.1 months (95%CI:18.9-23.4) in *KRAS*_m (Figure 2A) (p < 0.0001). OS from metastases diagnosis was 35.4 months (95% CI:20.5-NA) in *KRAS*_{WT} patients, and 17.5 months (95%CI:15.5-19.2) in *KRAS*_m (Figure 2B) (p < 0.0001). In a multivariate analysis, after adjustment on ECOG, age at diagnosis and stage at diagnosis, hazard-ratio (HR) was 2.08 [95%CI:1.25-3.47], p = 0.0047 for OS from initial diagnosis. For OS from metastases diagnosis, HR was 2.22 [95% CI:1.39-3.54], p = 0.00072 after adjustment on sex, age at diagnosis and presence of liver metastases. In the metastatic setting, no significant differences were observed in the management of metastases, i.e., locoregional treatments (such as surgery of metastases, radiotherapy, or radiofrequency ablation) in addition with systemic therapy between the two groups.

Median PFS for first-line systemic chemotherapy was higher in *KRAS*_{WT} than in *KRAS*_m patients (9.7 months [95%CI:6.8-15.4] vs 5.5 months [95%CI:4.8-6.5], respectively, p = 0.0019), as well as PFS when

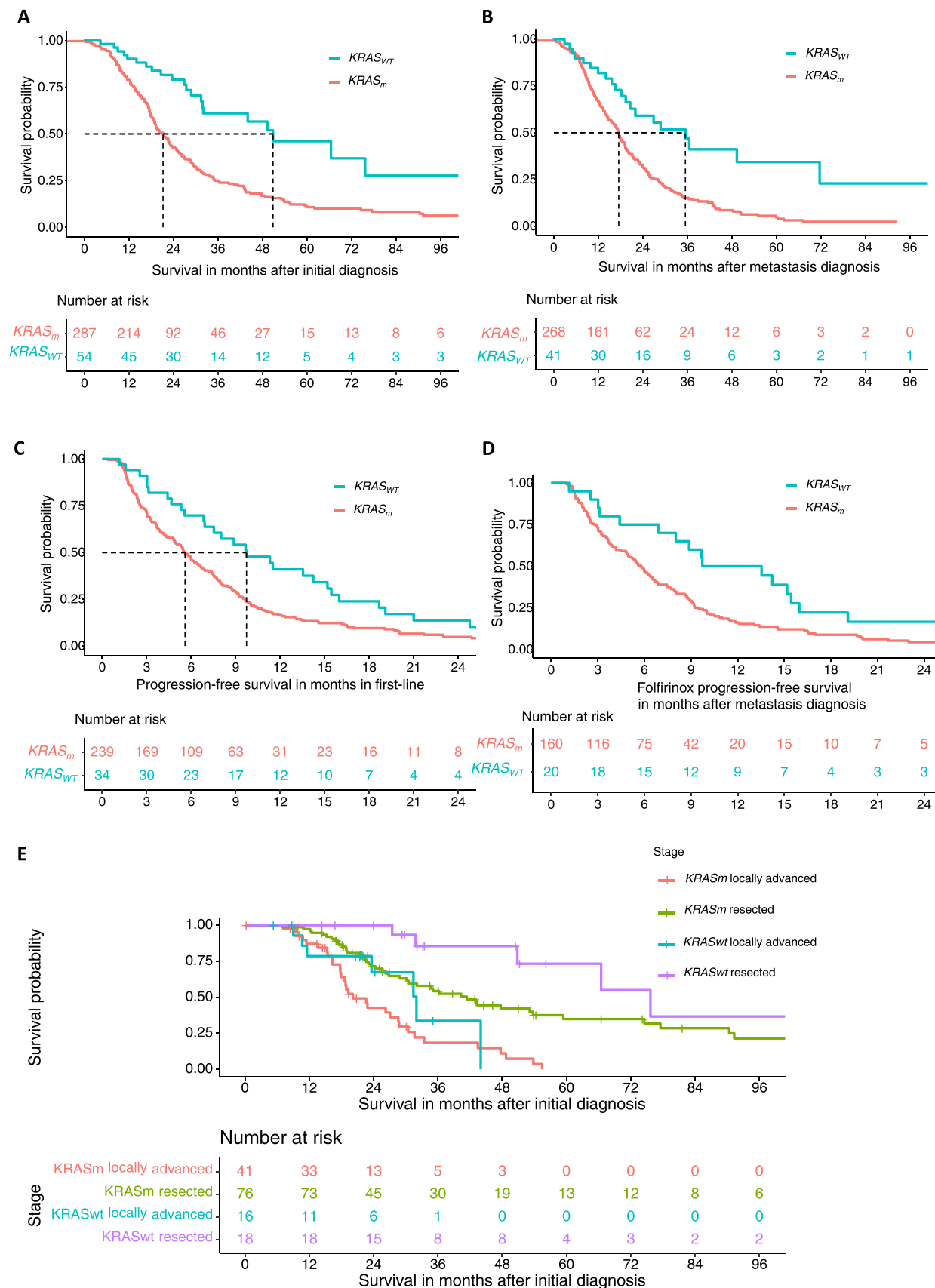


Fig. 2. Survivals. 2B. Overall survival from initial diagnosis depending on $KRAS$ status (with adjusted p-value). 2A. Overall survival from metastatic diagnosis depending on $KRAS$ status (with adjusted p-value). 2C. First-line progression free survival depending on $KRAS$ status. 2D. First-line progression free survival depending on $KRAS$ status for patients receiving FOLFIRINOX chemotherapy. 2E. Overall survival from initial diagnosis depending on $KRAS$ status and non-metastatic disease stage (resected or locally advanced).

Table 2
Main co-molecular alterations (n = 342).

Co-alterations (n, %)	Total	KRAS _{WT} (n = 54)	KRAS _M (n = 288)	Test (p-value)
AKT	12	0 (0%)	12 (4%)	0.22
ARID1A	23	3 (6%)	20 (7%)	1.0
ATM	22	4 (7%)	18 (6%)	0.76
BRAF	11	5 (9%)	6 (2%)	0.01
BRAFV600E	4	4 (7%)	0 (0%)	0.0006
BRCA1/2	25	5 (9%)	20 (7%)	0.56
CDKN2A	88	6 (11%)	64 (22%)	0.007
CDKN2B	66	2 (4%)	64 (22%)	0.001
CHEK2	13	7 (13%)	6 (2%)	0.001
EGFR	3	0 (0%)	4 (1%)	0.40
FGFR	17	4 (7%)	13 (5%)	0.32
GNAS	12	3 (6%)	9 (3%)	0.41
HER2/4	8	1 (2%)	7 (2%)	1.0
HRD-related alterations	73	16 (30%)	57 (20%)	0.10
MRE11A	2	2 (4%)	0 (0%)	0.02
MTAP	20	1 (2%)	19 (7%)	0.22
MYC	17	1 (2%)	16 (6%)	0.49
NRG1	1	1 (2%)	0 (0%)	0.15
NTRK	2	1 (2%)	1 (0.35%)	0.29
PALB2	1	1 (2%)	0 (0%)	0.15
PI3CA/B/D	10	2 (4%)	8 (3%)	0.66
PTEN	4	1 (2%)	3 (1%)	0.49
RET fusion	1	1 (2%)	0 (0%)	0.15
SMAD4	44	0 (0%)	44 (15%)	0.002
SMARCA	8	0 (0%)	8 (3%)	0.36
TP53	247	23 (43%)	224 (78%)	< 0.0001
Microsatellite status: MSI	4	3 (7%)	1 (0.53%)	0.02
Tumor mutational burden (mean, SD)	2.2	(2.3)	2.9 (3.6)	0.39
Actionable molecular alteration	69	20 (37%)	49 (17%)	0.0008
Molecularly-matched treatment received	31	12 (23%)	19 (7%)	0.0007

Here are listed the most frequent and other molecular alterations detected in a lesser extent in our cohort, as well as their frequencies in each subgroup. Any significant difference between groups is mentioned in bold.

Overall, among actionable alterations in PDAC, non-exhaustively:

BRAF mutations that are not V600E comprised: BRAF N486_P490del, BRAF R444W, BRAF V600R, BRAF T241M.

AKT alterations consisted in AKT2 amplifications.

ARID1A alterations consisted in frameshift mutations, duplication, and missense mutations.

ATM alterations consisted in frameshift mutations, duplication, and missense mutations.

BRCA1/2 alterations consisted in rearrangements, deletions, truncation, frameshift mutations, and missense mutations.

PALB2 alterations mainly consisted in frameshift mutations.

FGFR alterations consisted in FGFR2-CGNN1 fusion, FGFR1 amplification, FGFR4 amplification, FGFR2-INA fusion, FGFR2-KCTD1 fusion.

HER2/4 alterations consisted in ERBB2 amplifications, ERBB3/4 missense mutations.

PIK3CA/B/D alterations consisted in missense mutations and amplification.

RET rearrangement consisted in RET-ERC1 Fusion.

receiving FOLFIRINOX protocol as first-line therapy (Figure 2C & 2D). The mean number of metastatic lines received was 2.2 (SD:1.7) in KRAS_{WT} vs 2.6 (SD:1.5) in KRAS_M (p = 0.026). Objective response rate (ORR) and disease control rate (DCR) were comparable between groups for 1st-line treatment (Supplementary Table 3).

Patients diagnosed at a non-metastatic stage and who underwent surgical resection of their tumors seem had a better overall survival (median OS for resected KRAS_{WT} patients was 75.7 months (95%CI: 66.4-NR) and 41.4 months (95%CI: 30.5–75.5) for KRAS_M patients)

compared to patients who did not undergo surgery (Figure 2E).

3.3. Molecular alterations

Molecular profiling was performed on tumor tissue (n = 170, 50%) or through liquid biopsy (n = 155, 45%) or both (n = 17, 5%), mostly at metastatic stage (87%) (Figure 1). In the KRAS_{WT} group, the most frequently altered genes were TP53 (n = 23, 43%), CHEK2 (n = 7, 13%), CDKN2A (n = 6, 11%), BRCA1/2 (n = 5, 9%), BRAF (n = 5, 9%) and FGFR (n = 4, 7%) (Table 2). Microsatellite instability (MSI) tumors were more frequent in KRAS_{WT} patients (p = 0.022). In comparison, alterations in TP53, CDKN2A/B and SMAD4 were more frequently observed in the KRAS_M group than KRAS_{WT} (p < 0.007 for all) (Table 2). The median tumor-mutational burden (TMB) (2.5; SD: [0; 4.0]) did not differ between groups.

Regarding potentially actionable alterations, there were 19 (35%) ESCAT I-III in KRAS_{WT} group vs 46 (16%) in KRAS_M group (p < 0.0001) (Figure 3A). Specifically, BRAF mutations and FGFR2 fusions were more frequent in KRAS_{WT} tumors (Figure 3B). Other actionable alterations included RET, NRG1, NTRK, BRCA1/2, PALB2, HER2 amplification and PIK3CA. HRD alterations were more often observed in KRAS_{WT} (30%) tumors, though not reaching statistical significance (Figure 3B).

3.4. Oriented therapies

All results from molecular profiles were discussed in a tumor molecular board and 31 patients received a MMT during their disease course, with 12 KRAS_{WT} patients (representing 63% of KRAS_{WT} patients harboring an ESCAT I-III alteration), and 19 KRAS_M pts (41%) (p = 0.001) (Figure 4A). The most frequent molecular alteration was a germline or somatic BRCA1/2 pathogenic variant and these patients received Olaparib as MMT. Two KRAS_{WT} patients had an MSI tumor and received anti-PDL1 or anti-PD1 checkpoint inhibitors. Other MMT comprised (non-exhaustively) selpercatinib for RET fusions, erdafitinib for FGFR2 alterations, ATR-inhibitors for ATM and BRIP1 alterations, BRAF and MEK inhibitors for BRAFV600E alterations, and trastuzumab for HER2 amplifications (Figure 4A).

To explore the survival benefit of receiving a MMT, we divided patients into 3 categories: depending the presence of a molecular alteration and a received MMT. In the subgroup of patients that did not receive a MMT, KRAS_{WT} patients still had a longer OS than KRAS_M patients (p = 0.00015) (Figure 4B). There was no difference of survival in patients receiving a MMT regarding KRAS status (Figure 4C). We found no statistically significant differences, despite a trend in PFS, between MA/MMT, MA/No MMT and No MA/No MMT groups in KRAS_{WT} and KRAS_M groups respectively (Figure 4D & 4E) but the low number of events precluded any definitive conclusion. We then estimated the Growth Modulation Index (GMI), as a comparative measure of clinical activity of MMT versus prior systemic palliative lines. A GMI over 1.33 is usually considered as clinically meaningful. We found that KRAS_{WT} patients had a significantly higher GMI with a median of 3.1 vs 0.6 in the KRAS_M group (p = 0.0039).

We also analyzed survival rates based on KRAS and BRCA status from the initial diagnosis. We also compared the survival rates of patients who received an MMT according to their BRCA status (Supplementary Figure 1A & 1B), and we found no statistically significant differences (mOS was 34.8 months (95%CI: 25.6-NA) for BRCA wild-type patients receiving a MMT and 53.1 months (95%CI: 29.5-NA) for BRCA mutant patients, p = 0.7). We also analyzed OS from initial diagnosis based on KRAS status and stratified on TMB value (<5 or ≥5 Mut/Mb), available in Supplementary Figure 1C.

3.5. Transcriptomic analyses

To understand the difference between KRAS_{WT}/KRAS_M tumors, we performed RNA-sequencing on a subset of 85 consecutive PDAC (9

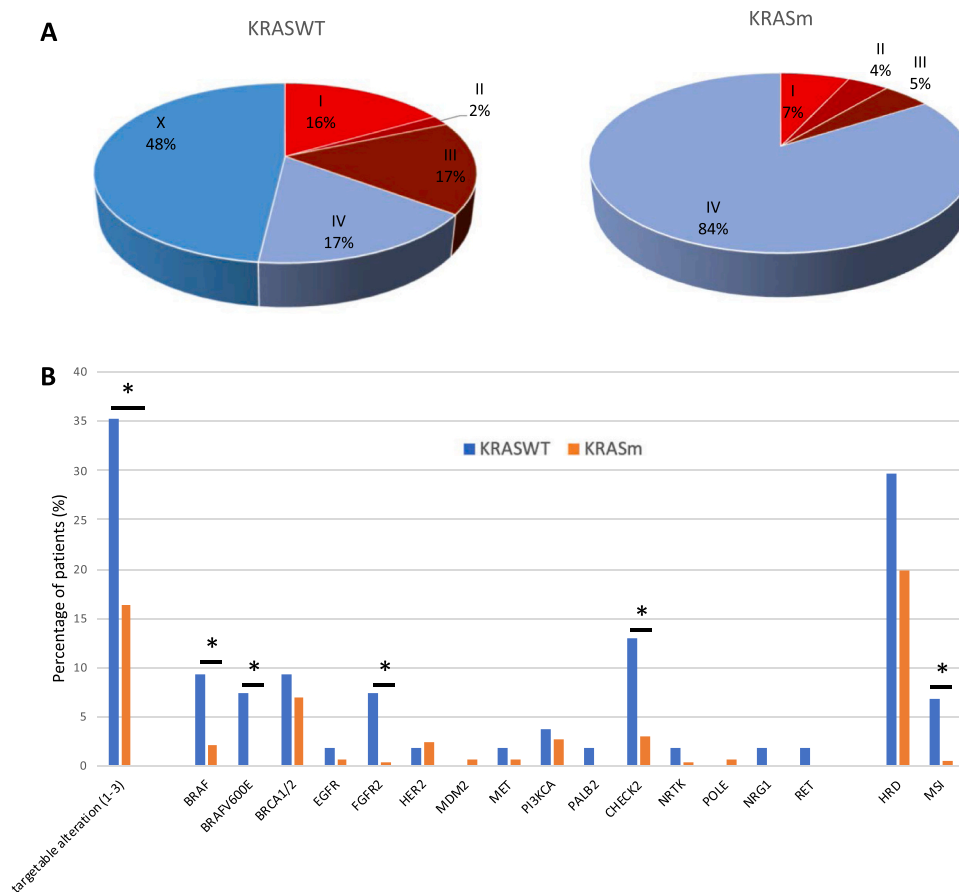


Fig. 3. Actionable alterations in PDAC patients. 3A. ESCAT classification for patients depending on their *KRAS* status. 3B. Actionable alterations and their relative frequency in the cohort. *: significant difference. HRD: homologous recombination deficiency. MSI: microsatellite instability.

*KRAS*_{WT} and 76 *KRAS*_m) (Figure 5A). Among the top differentially expressed genes, several genes upregulated in *KRAS*_m tumors were involved in cell adhesion (*CDH3*, *CDH17*, *CEACAM5*, etc) and extracellular matrix remodeling (*MMP7*, *MMP10*, etc). Conversely, genes upregulated in *KRAS*_{WT} were mostly involved in immune regulation (*CD4*, *IL10RA*, *CD7*, etc). After gene set enrichment analysis, we observed a significant upregulation of proliferation pathways (*MYC*, cell-cycle) in *KRAS*_m (Figure 5B) and in *KRAS*_{WT}, an upregulation of immune pathways and pathways involved in metabolism/catabolism. We assessed whether tumoral or stromal components were different and found that only the stromal component seemed modified, but very dependent on the biopsy site (Figure 5C). There was a trend, though not significant, for an enrichment in classical tumors in *KRAS*_{WT}. Overall, transcriptomic analysis was in favor of more aggressive *KRAS*_m tumors and more immune infiltration in *KRAS*_{WT} tumors.

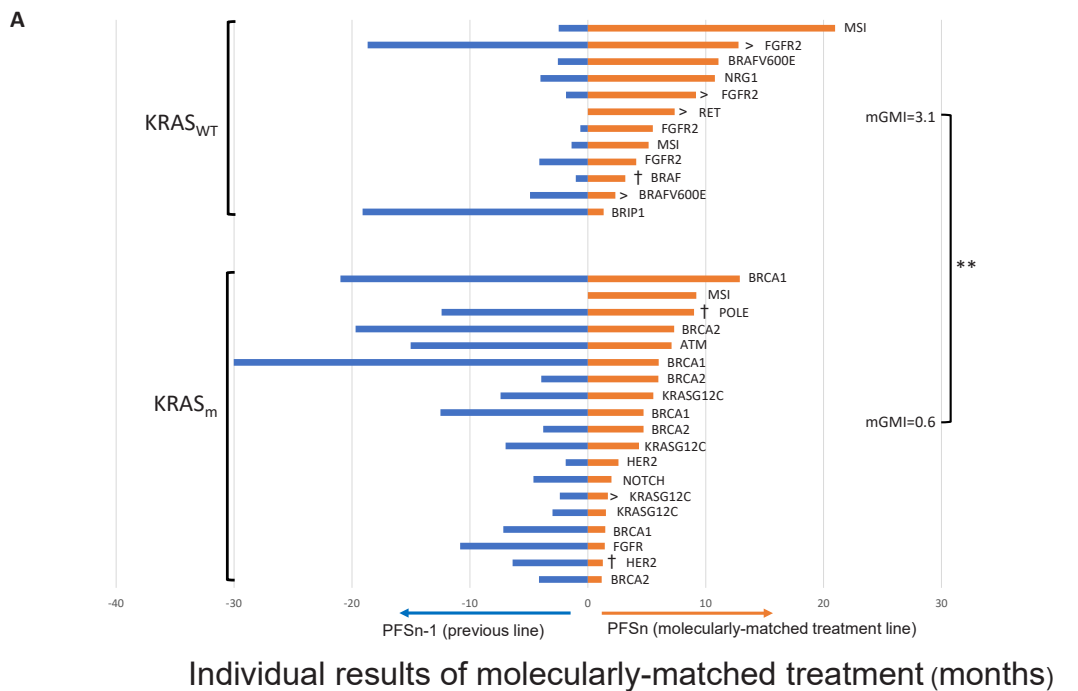
4. Discussion

In this study, we report for the first-time specific clinical outcomes of *KRAS*_{WT} patients receiving MMT and compared with *KRAS*_m patients. As described in previous studies, the presence of *KRAS* mutation is a negative and independent prognostic factor for OS and response to treatments [7–9,15]. *KRAS* encodes a GTPase protein, and is the most frequently mutated gene in PDAC found in around 90% of tumors [16, 17]. However, some tumors lack activating *KRAS* mutations, and here we described these tumors comparatively to tumors harboring *KRAS* mutation.

Interestingly, few studies describe clinical characteristics of *KRAS*_{WT} tumors [15]. Here, contrary to other studies, age at diagnosis and age at metastatic stage were not different between *KRAS*_m and *KRAS*_{WT}

patients [7–9]. However, we found that liver metastases were less frequent than in *KRAS*_m tumors, as already suggested in colorectal cancer with *KRAS* mutation driving liver metastases [18]. Since liver metastases are a negative prognosis factor in PDAC [19], one might wonder whether this is because they exhibit an overabundance of *KRAS* mutation. Moreover, OS was clearly higher in patients with *KRAS*_{WT} tumors (50.8 months), and not only because they received MMT, as OS was better in the restricted population that did not receive a MMT. First-line PFS and PFS under FOLFIRINOX were also higher in *KRAS*_{WT} patients. Importantly, OS of the overall cohort was higher than what is classically reported in the literature [20,21], probably because this study was conducted in a tertiary center, with specific patients' accrual and selection bias for whom a molecular profile was performed.

The utility of molecular profiling in patients with PDAC remains to be established, despite OS improvement when patients received a molecularly-matched treatment [22]. This is largely due to the low prevalence of actionable mutations in unselected cases as well as the difficulty to obtain adequate tumor tissue, especially in the locally advanced, or unresectable setting. Our data highlight the different genomic features of *KRAS*_{WT} tumors compared with *KRAS*_m PDAC, suggesting potentially different molecular carcinogenesis mechanisms with an interindividual tumor heterogeneity. Overall, molecular alterations and their frequencies in our data set seem to align with the literature available in this field (Supplementary Table 4 [7,8,23,24]). Key drivers like *TP53*, *CDKN2A* and *SMAD4* were found statistically significantly less frequently in *KRAS*_{WT} tumors. Conversely, alternative MAPK drivers such *BRAF* activating alterations or *RTK* fusions were found more frequently in our cohort with survival benefits for *FGFR2* inhibitors for example [10]. As previously described, *KRAS*_{WT} tumors



Individual results of molecularly-matched treatment (months)

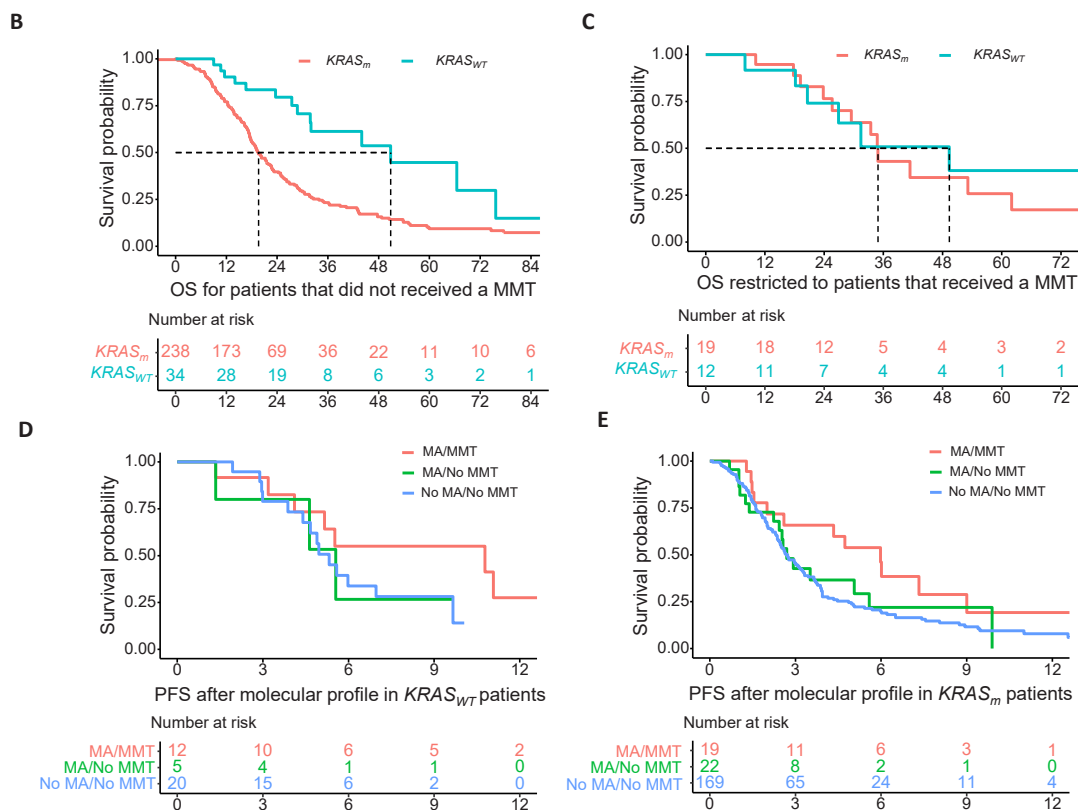
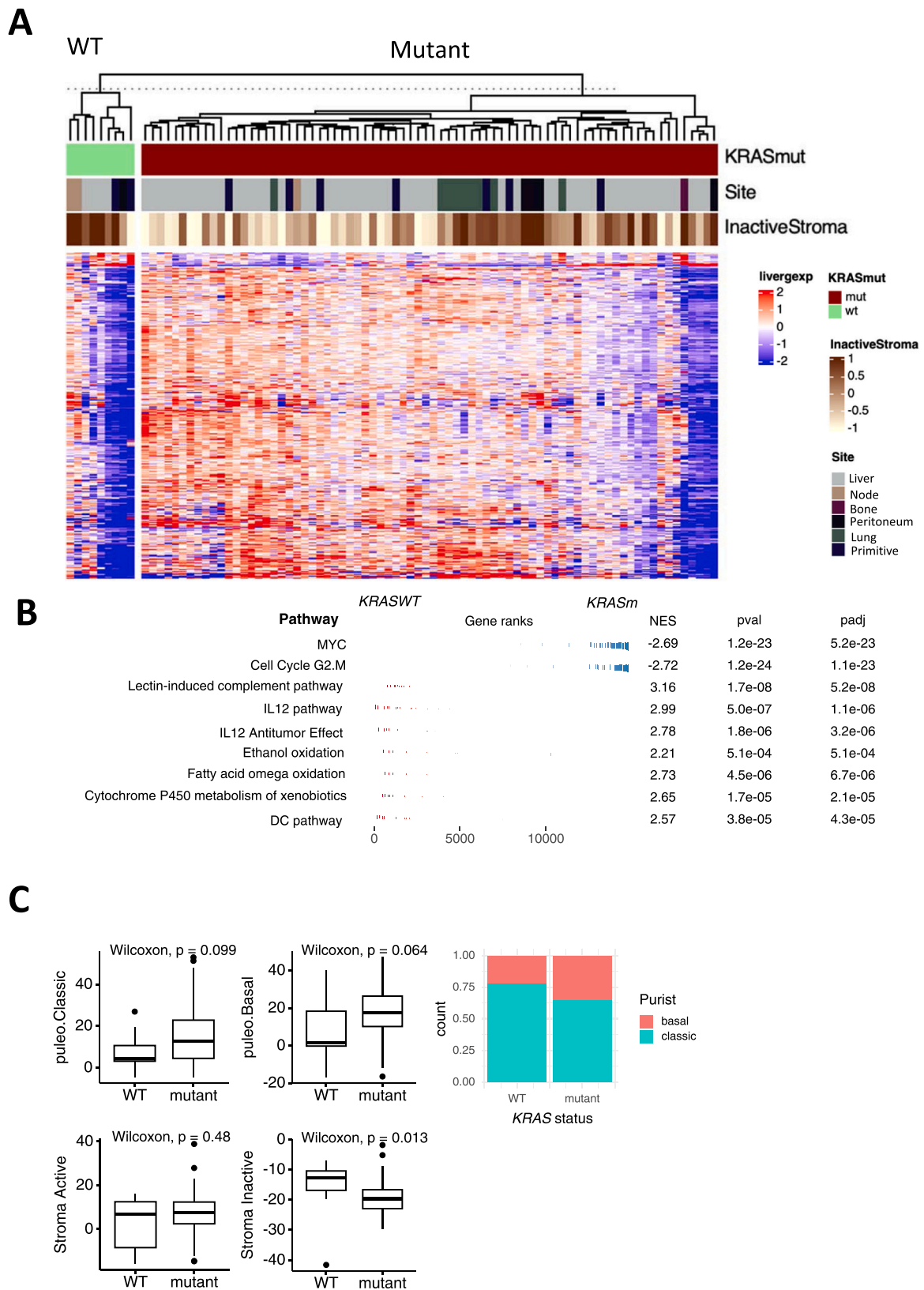


Fig. 4. Precision medicine in patients with an actionable alteration. 4A. Individual clinical benefit for each of the 31 patients who received a MMT along with the targeted alteration for each patient. PFSn-1: Progression-free survival under the treatment received prior to the MMT (blue bar) and PFSn: Progression-free survival under the MMT (orange bar). GMI: Growth modulator index. *: p-value < 0.005. 4B. Overall survival (OS) restricted to the patients that did not receive a MMT, depending on *KRAS* status. 4C. Overall survival restricted to the patients that did receive a MMT, depending on *KRAS* status. 4D. Progression-free survival (PFS) restricted to patients with a *KRAS_{WT}* tumor, for patients with a molecular alteration that received a matched treatment (MA/MMT), patients with an actionable molecular alteration that did not receive a matched treatment (MA/No MMT) and patients without an actionable alteration (No MA/No MMT). 4E. Progression-free survival restricted to patients with a *KRAS_m* tumor, for patients with a molecular alteration that received a matched treatment (MA/MMT), patients with an actionable molecular alteration that did not receive a matched treatment (MA/No MMT) and patients without an actionable alteration (No MA/No MMT).



also harbored more MSI tumors (7%) [7,8] with benefit from checkpoint inhibitors [25]. Conversely to other studies, *KRAS*_{WT} had not a different TMB than *KRAS*_m tumors [8]. On the contrary, patients in the *KRAS*_m group received more frequently Olaparib (for *BRCA1/2* mutation mostly), or specific *KRAS* G12C inhibitors. With 30–35% of actionable alterations in *KRAS*_{WT} patients, some have therefore suggested restricting extensive molecular profiling in this group [7]. Our data supports that direction considering the clinical benefit of *KRAS*_{WT} patients receiving MMT and the statistically significant higher GMI compared to *KRAS*_m. However, when considering the improved OS of *KRAS*_m patients receiving a MMT (Figure 4B), it suggests that molecular profiling should likely be offered to all PDAC patients. This would help identify the infrequent but existing patients with actionable alteration.

Importantly, about half of the molecular profiles were performed through liquid biopsy, as part of patients' routine management at advanced stages in real-life setting. This might explain the slight differences with previous studies. Also, we found in our cohort an enrichment in the proportion of *KRAS*_{WT} tumors with 15% of *KRAS*_{WT} PDAC compared with 10% in the literature [16,17]. Sensibility of liquid biopsy could partly explain these results. However, results of our real-life study are important since liquid biopsies represent an emerging technology which allow for non-invasive serial sampling of tumor material, that might become part of the management of PDAC [26]. In the next future, combining cohorts with genomic, transcriptional and clinical data would allow to better understand the specific molecular features and heterogeneity of *KRAS*_{WT} PDAC. As others [7], we performed whole transcriptome profiling that suggested immune microenvironmental differences between the *KRAS*_{WT} and *KRAS*_m cohorts with potential therapeutic opportunities.

Outcomes results are likely to evolve in the next years, with the recent emergence of *KRAS* inhibitors to target a mutation traditionally considered "undruggable". such *KRAS*_{G12C} and *KRAS*_{G12D} inhibitors [27,28] or pan-*KRAS* inhibitors [29]. Moreover, specific drugs could be used in *KRAS*_{WT} PDAC, such as nimotuzumab, an EGFR inhibitor that is now approved in Asian countries for *KRAS*_{WT} patients [30], that improved survival when combined with gemcitabine. The impact of these therapeutic revolutions on PDAC treatment landscape is still unknown but eagerly anticipated.

Our study has several limits. First, patients were mostly heavily pretreated when NGS was done with a selection bias on survival to get a molecular profile. Nevertheless, improved survival was observed with MMT despite the late setting and selection bias, and the recent trend in our institution is now to use molecular profiling earlier in the disease course. Second, this a monocentric study with a limited number of patients, but this is the first study reporting precision medicine outcomes in *KRAS*_{WT} patients, along with translational approaches. Last, accessibility to actionable treatments remains a key consideration, and patients receiving MMT were offered off-label or compassionate drugs, or were included in clinical trials. This raises the question of healthcare equity access among countries and hospitals [31]. Identifying actionable alterations without offering matched treatments would be both ineffective and unethical.

5. Conclusion

Patients with *KRAS*_{WT} PDAC constitute a distinct subgroup that exhibits improved survival rates compared to *KRAS*_m PDAC. This subgroup also showed benefit from molecular profiling with actionable alterations identified in more than one-third of cases, resulting in clinical benefits when patients receive molecularly-matched treatment. In a precision medicine approach, molecular profiling, including determination of *KRAS* status at initial diagnostic, should be an integral part of the routine management of PDAC.

Funding

We would like to thank PRISM (Gustave Roussy) for funding molecular profiles.

CRedit authorship contribution statement

Imen Ben-Ammar: Data curation, Writing – original draft. **Adrien Rousseau:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Rémy Nicolle:** Formal analysis. **Anthony Tarabay:** Data curation. **Valérie Boige:** Supervision. **Marine Valery:** Data curation, Supervision. **Thomas Pudlarz:** Supervision. **David Malka:** Supervision. **Maximiliano Gelli:** Data curation, Supervision. **Elena Fernandez-De-Sevilla:** Data curation. **Alina Fuerea:** Supervision. **Marie-Laure Tanguy:** Formal analysis, Validation. **Etienne Rouleau:** Supervision, Validation. **Rémy Barbe:** Supervision. **Jacques R.R Mathieu:** Software, Formal analysis. **Fanny Jaulin:** Investigation, Supervision. **Cristina Smolenschi:** Data curation, Writing – review & editing, Supervision. **Antoine Hollebecque:** Supervision, Writing – review & editing. **Michel Ducreux:** Investigation, Validation, Conceptualization, Supervision. **Alice Boileve:** Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Writing – original draft, Data curation, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Antoine Hollebecque: Amgen, AstraZeneca, Debiopharm, Eli Lilly and Company, Incyte Corporation, QED Therapeutics. David Malka: Roche, Amgen, Bayer, Sanofi, Merck Serono, Servier, Sanofi, Pierre Fabre, Viatrix, Bristol Myers Squibb, MSD Oncology, LEO Pharma, Incyte, AstraZeneca, Taiho Oncology, Pfizer. Fanny Jaulin: ORAKL. Valérie Boige: Amgen, AstraZeneca, Bayer Schering Pharma, Ipsen, Merck Serono, MSD Oncology, Roche/Genentech. Michel Ducreux: Merck Serono, MSD, AMGEN, Roche, Bayer, Ipsen, Pfizer, Servier, Pierre Fabre, HalioDx, Lilly, Sanofi, BMS. Alice Boilève: Merck Serono, Ipsen. Other authors report no conflict of interest.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ejca.2023.113497.

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023;73:17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.
- [2] Abboud Y, Samaan JS, Oh J, Jiang Y, Randhawa N, Lew D, et al. Increasing pancreatic cancer incidence in young women in the United States: a population-based time-trend analysis, 2001–2018. *Gastroenterology* 2023;164:978–989.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.01.022>.
- [3] Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(Suppl 5):v56–68. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv295>.
- [4] Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016;144:241–75. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.008>.
- [5] Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, Gurbani D, Gondi S, Westover KD. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated *KRAS* mutations. *Mol Cancer Res* 2015;13:1325–35. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>.
- [6] Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin W-C, Mansour J, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 2015;6:6744. <https://doi.org/10.1038/ncomms7744>.
- [7] Philip PA, Azar I, Xiu J, Hall MJ, Hendifar AE, Lou E, et al. Molecular characterization of *KRAS* wild-type tumors in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2022;28:2704–14. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3581>.
- [8] Singh H, Keller RB, Kapner KS, Dilly J, Raghavan S, Yuan C, et al. Oncogenic drivers and therapeutic vulnerabilities in *KRAS* wild-type pancreatic cancer. *CCR-22 Clin Cancer Res* 2023;3930. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-3930>.

- [9] Luchini C, Paolino G, Mattiolo P, Piredda ML, Cavaliere A, Gaule M, et al. KRAS wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma: molecular pathology and therapeutic opportunities. *J Exp Clin Cancer Res* 2020;39:227. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01732-6>.
- [10] Helal C, Valéry M, Ducreux M, Hollebecque A, Smolenski C. FGFR2 fusion in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there hope? *Eur J Cancer* 2022;176:168–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.09.016>.
- [11] Fusco MJ, Saeed-Vafa D, Carballido EM, Boyle TA, Malafa M, Blue KL, et al. Identification of targetable gene fusions and structural rearrangements to foster precision medicine in KRAS wild-type pancreatic cancer. *JCO Precis Oncol* 2021;5(5):PO.20.00265. <https://doi.org/10.1200/PO.20.00265>.
- [12] Jones MR, Williamson LM, Topham JT, Lee MKC, Goytain A, Ho J, et al. NRG1 gene fusions are recurrent, clinically actionable gene rearrangements in KRAS wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2019;25:4674–81. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0191>.
- [13] Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol* 2018;29:1895–902. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy263>.
- [14] Von Hoff DD. There are no bad anticancer agents, only bad clinical trial designs—twenty-first Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Clin Cancer Res* 1998;4:1079–86.
- [15] Windon AL, Loaiza-Bonilla A, Jensen CE, Randall M, Morrissette JJD, Shroff SG. A KRAS wild type mutational status confers a survival advantage in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2018;9:1–10. <https://doi.org/10.21037/jgo.2017.10.14>.
- [16] Lowery MA, Jordan EJ, Basturk O, Ptashkin RN, Zehir A, Berger MF, et al. Real-time genomic profiling of pancreatic ductal adenocarcinoma: potential actionability and correlation with clinical phenotype. *Clin Cancer Res* 2017;23:6094–100. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0899>.
- [17] Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 2016;531:47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>.
- [18] Steele CW, Whittle T, Smith JJ. Review: KRAS mutations are influential in driving hepatic metastases and predicting outcome in colorectal cancer. *Chin Clin Oncol* 2019;8:53. <https://doi.org/10.21037/cco.2019.08.16>.
- [19] Hang J, Wu L, Zhu L, Sun Z, Wang G, Pan J, et al. Prediction of overall survival for metastatic pancreatic cancer: Development and validation of a prognostic nomogram with data from open clinical trial and real-world study. *Cancer Med* 2018;7:2974–84. <https://doi.org/10.1002/cam4.1573>.
- [20] Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1817–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>.
- [21] Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013;369:1691–703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>.
- [22] Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol* 2020;21:508–18. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30074-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30074-7).
- [23] Allen MJ, Zhang A, Bavi P, Kim JC, Jang GH, Kelly D, et al. Molecular characterisation of pancreatic ductal adenocarcinoma with NTRK fusions and review of the literature. *J Clin Pathol* 2023;76:158–65. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207781>.
- [24] Singhi AD, George B, Greenbowe JR, Chung J, Suh J, Maitra A, et al. Real-time targeted genome profile analysis of pancreatic ductal adenocarcinomas identifies genetic alterations that might be targeted with existing drugs or used as biomarkers. *Gastroenterology* 2019;156:2242–2253.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.037>.
- [25] Taïeb J, Sayah L, Heinrich K, Kunzmann V, Boileve A, Cirkel G, et al. Efficacy of immune checkpoint inhibitors in microsatellite unstable/mismatch repair-deficient advanced pancreatic adenocarcinoma: an AGEO European Cohort. *Eur J Cancer* 2023;188:90–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.04.012>.
- [26] Bayle A, Peyraud F, Belcaid L, Brunet M, Aldea M, Clodion R, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting actionable alterations according to ESCAT in patients with advanced cancer: a study from the French National Center for Precision Medicine (PRISM). 04147-3 *Ann Oncol* 2022;S0923-7534(22). <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.08.089>.
- [27] Strickler JH, Satake H, George TJ, Yaeger R, Hollebecque A, Garrido-Laguna I, et al. Sotorasib in KRAS p.G12C-mutated advanced pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2023;388:33–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208470>.
- [28] The KRASG12D inhibitor MRTX1133 elucidates KRAS-mediated oncogenesis. *Nat Med* 2022;28:2017–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02008-6>.
- [29] Kim D, Herdeis L, Rudolph D, Zhao Y, Böttcher J, Vides A, et al. Pan-KRAS inhibitor disables oncogenic signalling and tumour growth. *Nature* 2023;619:160–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06123-3>.
- [30] Qin S, Bai Y, Wang Z, Chen Z, Xu R, Xu J, et al. Nimotuzumab combined with gemcitabine versus gemcitabine in K-RAS wild-type locally advanced or metastatic pancreatic cancer: A prospective, randomized-controlled, double-blinded, multicenter, and phase III clinical trial. LBA4011–LBA4011 *JCO* 2022;40. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.17_suppl.LBA4011.
- [31] Bayle A, Bonastre J, Chaltiel D, Latino N, Rouleau E, Peters S, et al. ESMO study on the availability and accessibility of biomolecular technologies in oncology in Europe. *Ann Oncol* 2023;0. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.06.011>.

IV. IMPACT DES SOUS-TYPES DE MUTATION *KRAS*

Contexte :

La manière dont les altérations distinctes de *KRAS* influencent précisément l'initiation tumorale, la réponse aux traitements et le pronostic reste peu comprise et étudiée dans le contexte du PDAC. Dans le PDAC, la majorité des mutations *KRAS* se produisent au niveau du codon 12, en particulier *KRAS*_{G12D}, *KRAS*_{G12V} et *KRAS*_{G12R}. Il n'existe que peu de données concernant les différences spécifiques au codon de *KRAS*, à l'exception d'une étude récente ayant montré un meilleur pronostic pour les patients avec *KRAS*_{G12R} par rapport à *KRAS*_{G12D} (272). Dans notre étude, nous avons analysé les caractéristiques cliniques, la survie et les co-mutations des patients atteints de PDAC en fonction du codon muté de *KRAS* (G12 ou autre). Nous avons également étudié le profil de sensibilité aux médicaments *in vitro* à l'aide d'organoïdes de PDAC et le profil d'expression des gènes par séquençage d'ARN.

Principaux résultats :

- Sur les 263 patients inclus, 91% présentaient des mutations *KRAS*_{G12} et 9% présentaient des mutations *KRAS* à d'autres codons (*KRAS*_{autre}).
- Les caractéristiques clinicopathologiques et les co-altérations étaient similaires entre les groupes *KRAS*_{G12} et *KRAS*_{autre}, à l'exception d'une prévalence plus élevée d'altérations de *BRAF* et de *GNAS* dans le groupe *KRAS*_{autre}.
- La survie médiane globale depuis le diagnostic métastatique était plus courte chez les patients *KRAS*_{G12} (16,7 mois) par rapport aux patients *KRAS*_{autre} (24,9 mois) ($p < 0.05$ après ajustement)
- La réponse au traitement de première ligne, ainsi que la sensibilité aux médicaments *in vitro* à l'aide d'organoïdes dérivés de patients n'étaient pas significativement différentes entre les groupes *KRAS*_{G12} et *KRAS*_{autre}.
- Les analyses transcriptomiques ont révélé une augmentation significative des voies immunitaires exclusivement dans les tumeurs *KRAS*_{G12}.
- L'étude suggère que les mutations *KRAS* spécifiques au codon ont des implications pronostiques différentes, avec des mutations *KRAS*_{G12} associées à de moins bons résultats dans le PDAC.

(Travail accepté à ESMO GI le 08/12/2023)

ORIGINAL ARTICLE

Codon-specific *KRAS* mutations predict survival in advanced pancreatic cancer

A. Boilève^{1,2,3*}, A. Rousseau^{3,4,5}, M. Hilmi^{6†}, A. Tarabay^{3†}, J. R. R. Mathieu¹, J. Cartry¹, S. Bedja¹, N. Goudarzi¹, C. Nicotra⁷, M. Ngo-Camus⁷, V. Boige³, M. Valéry³, T. Pudlzar³, M.-A. Bani⁸, P. Dartigues⁸, L. Tselikas⁹, A. Italiano⁷, S. Coscinea¹⁰, M. Gelli¹¹, E. Fernandez-de-Sevilla¹¹, D. Malka^{1,3}, M. Annereau¹², F. Jaulin^{1,2}, C. Smolenschi^{3,7}, A. Hollebecque^{3,7} & M. Ducreux^{1,2,3}

¹INSERM U1279, Gustave Roussy, Villejuif; ²Université Paris-Saclay, Orsay; ³Department of Medicine, Gustave Roussy, Villejuif; ⁴Department of Biostatistics and Epidemiology, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif; ⁵Oncostat INSERM U1018, Gustave Roussy, Ligue Contre le Cancer, Université Paris-Saclay, Villejuif; ⁶Department of Medical Oncology, Institut Curie, Saint-Cloud; ⁷DITEP, Gustave Roussy, Villejuif; Departments of ⁸Morphological Pathology; ⁹Interventional Radiology; ¹⁰Endoscopy; ¹¹Surgery; ¹²Therapeutic Pharmacy, Gustave Roussy, Villejuif, France

Available online xxx

Background: How distinct *KRAS* alterations in pancreatic adenocarcinoma (PDAC) influence tumor initiation and outcomes remains unclear. Moreover, *KRAS* is now partly targetable with novel specific inhibitors targeting *KRAS*_{G12} (G12C or G12D), but specific outcomes of these subgroups of patients is poorly described. In this study, we compared clinical/genomic characteristics and outcomes of PDAC depending on codon-specific *KRAS* mutant (G12 versus others), as well as gene expression profiles and *in vitro* drug sensibility using organoids.

Patients and methods: All metastatic patients with PDAC and available molecular profile from 2015 to 2022 were eligible, and patients with *KRAS* mutation were included. Transcriptomic data from 69 *KRAS*-mutated tumors were also analyzed.

Results: Overall, 263 patients were included—239 *KRAS*_{G12} (91%) and 24 (9%) *KRAS*_{other}. There was no difference between *KRAS*_{G12} and *KRAS*_{other} regarding clinicopathological characteristics and potentially actionable alterations, except for *BRAF* that was found in 13% of *KRAS*_{other} ($P = 0.01$). *G protein subunit alpha 5 (GNAS)* was found more altered in *KRAS*_{other} tumors ($P = 0.002$) suggesting potential intraductal papillary mucinous neoplasm precursors. The median overall survival from metastatic diagnosis was 16.7 months [95% confidence interval (CI) 14.3-18.3 months] in *KRAS*_{G12} and 24.9 months (95% CI 17.4-43.4 months) in *KRAS*_{other} [hazard ratio (ref: *KRAS*_{G12}) = 0.56 (0.34-0.94), $P = 0.04$ adjusted]. The first-line treatment response was not different between groups (overall response rate and progression-free survival), as confirmed with a similar organoid *in vitro* sensibility. Transcriptomic analyses showed a significant and exclusive up-regulation of immune pathways in *KRAS*_{G12} tumors.

Conclusions: Codon-specific *KRAS* mutations are not equal and we report that *KRAS*_{G12} patients have a worst prognosis than *KRAS*_{other} patients in PDAC. These results warrant to be confirmed in larger-scale studies.

Key words: precision medicine, *KRAS*, pancreatic cancer

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of cancer-related death projected to become the second leading cause of cancer-related death worldwide between 2030 and 2040, due to its increasing incidence.¹ A majority of patients are diagnosed with or eventually develop metastases, leading to a poor prognosis, with a

median overall survival (OS) of <12 months.^{2,3} Cytotoxic chemotherapy remains the primary treatment approach for metastatic PDAC (mPDAC), with two established first-line options: FOLFIRINOX [folinic acid, 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan and oxaliplatin] or nab-paclitaxel–gemcitabine.^{2,3} However, beyond the first-line setting, therapeutic alternatives are severely limited, yielding unsatisfactory survival outcomes. Notably, despite the significant advancements in targeted therapies and immunotherapies in cancer treatments, there have been minimal additions to the treatment arsenal for mPDAC.⁴

Among the key genetic alterations observed in PDAC, mutations in *KRAS* are the most prevalent, occurring in up to 90% of cases. From a biochemical perspective, oncogenic

*Correspondence to: Dr Alice Boilève, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France. Tel: +33-1-42-11-23-96

E-mail: Alice.boileve@gustaveroussy.fr (A. Boilève).

†These authors contributed equally to this work.

2949-8198/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society for Medical Oncology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KRAS mutations play a role in increasing the levels of active *KRAS* protein bound to guanosine triphosphate (GTP).⁵ However, various amino acid changes can significantly impact the kinetics of guanosine diphosphate/GTP exchange and GTP hydrolysis.⁵ These alterations in *KRAS* protein dynamics may have diverse implications for signaling processes in different cellular and tissue contexts. Moreover, accumulating clinical and preclinical evidence suggests that tumors carrying different *KRAS* variants exhibit varying levels of sensitivity to targeted therapies⁶⁻¹⁰ as well as different outcomes.^{11,12} Interestingly, the recent years have shown the development of codon-specific *KRAS* inhibitors such as adagrasib and sotorasib that specifically target *KRAS*_{G12C} mutations,^{13,14} whose frequency is very low in PDAC (~1%). Novel *KRAS* inhibitors are currently under investigation, such as MRTX1133 that targets *KRAS*_{G12D} mutation or pan-*KRAS* inhibitors.^{15,16} Therefore, codon-specific *KRAS* mutations are becoming predictive treatment biomarkers.

Despite the genetic and epidemiological evidence highlighting the functional importance of different *KRAS* mutations, our understanding of how distinct *KRAS* alterations precisely influence tumor initiation, response to treatments and outcomes remains unclear in the context of PDAC. In PDAC, the majority of *KRAS* mutations occur at codon 12, particularly *KRAS*_{G12D}, *KRAS*_{G12V} and *KRAS*_{G12R}. Codon-specific *KRAS* differences might induce a different signaling during tumor initiation and growth, as well as variations in gene expression and in cellular responses to oncogenic *KRAS*. In PDAC, data are scarce regarding *KRAS* codon-specific differences, except a recent study that found a better prognostic of *KRAS*_{G12R} versus *KRAS*_{G12D} patients¹⁷ and a study based on 109 cases.¹⁸ Recently, some studies in other digestive tumors suggest prognosis impact of *KRAS*_{G12} versus *KRAS*_{other} mutations.^{9,12} In this study, we analyzed the clinical characteristics, clinical outcomes and co-mutations of PDAC patients depending on codon-specific *KRAS* mutation as well as response to the main chemotherapy regimen. We also studied *in vitro* drug sensibility profile using PDAC organoids (PDOs) and gene expression profile using RNA sequencing.

PATIENTS AND METHODS

Main cohort

All consecutive patients with PDAC from 2015 to 2022 followed in our institution were eligible when a contributive molecular profile was available as part of MOSCATO (NCT01566019), MATCH-R (NCT02517892) or STING (NCT0493252) trials. Patients were included in our study when *KRAS* was found altered [patients with *KRAS* wild-type (WT) status were excluded]. All patients gave signed informed consent for genomic analysis. Clinical characteristics and treatment-related outcomes were collected by hospital chart review. Study data were collected and managed using REDCap electronic data capture tools hosted at Gustave Roussy. This retrospective study complies with the French MR004 methodology regarding general data protection regulation for non-interventional retrospective health research (Délibération n° 2018-155 du 3 mai 2018)

and was approved by our institutional review board (CSET N° 2022-94), in compliance with the Helsinki Declaration.

PDO cohort

PDOs were cultured from mainly metastatic tumor biopsies or peritoneal effusions of patients with PDAC, as part of the STING trial (NCT0493252). Five samples were available from primary lesion (surgery or cytopuncture). Overall, there were 49 *KRAS*_{G12} and 3 *KRAS*_{other} for the drug sensitivity part (3 *KRAS*-WT PDOs were excluded). All patients provided written informed consent for organoid culture and collection and analysis for research purposes. PDOs were cultured as previously described.¹⁹

Drug testing

Drug sensitivity testing was carried out as previously described,¹⁹ from a stock at 10 μM in dimethyl sulfoxide drugs. In brief, drug source plates (96 wells) were prepared at 10x desired concentration with D-300e digital dispenser (Tecan, Mannedorf, Switzerland) with control wells in each plate. PDO lines were incubated in TrypLE (ThermoFisher, Waltham, MA) 1X for 15-20 min at 37°C and dissociated to single cells by vigorous pipetting every 5 min. After washing, cells were then embedded in growth factor-reduced basement membrane extract (350 cells/μl) and plated (3 μl/well) in 96-well plates with a pipetting robot (Assist Plus, Integra, Hudson, NY). Culture media (125 μl) was added with a pipetting robot (Viaflo, Integra, Hudson, NY) and changed every 2 days with the addition of drugs at day 3 and day 5. At day 8, cell viability was assessed using Cell Titer Glo 3.0 (Promega, Madison, WI) and read with a Biotek Synergy H1 plate reader after 20 min of incubation. Each condition was tested in triplicate (three wells). Three concentrations (high, medium and low) were used per drug (Supplementary Table S1, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>). For each condition, the average viability value of triplicate wells from luminescence reads was normalized to the average value of control wells of the plate. Area under the curve for each PDO line and each of the drugs was estimated.

Molecular alteration analyses

Molecular profile and *KRAS* status were obtained through tumor tissue analysis (FoundationMedicine®) or liquid biopsy (FoundationOne Liquid CDx®), with a panel including 324 oncogenes, tumor suppressor genes or gene rearrangement as well as microsatellite stability status and tumor mutational burden. Whole-exome sequencing of PDO was outsourced to Novogene (UK) and compared with the tumor molecular profile to confirm good correlation.¹⁹

Sample processing and transcriptomic analyses

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks from 69 PDAC tumors were selected for combined RNA extraction: the presence of neoplastic cells was confirmed by pathological analysis after examination of hematoxylin and eosin

(H&E)-stained slides. For each case, whole-slide sections were reviewed to select tumor-enriched zones and for every FFPE block, three 10-mm slides were cut and manually microdissected to enrich for neoplastic cells. For all samples, RNA was extracted using the ALLPrep FFPE tissue kit (Qiagen®) and mRNA profiles were obtained using the Illumina NovaSeq 6000 Sequencing System after polyA enrichment. Differential expression analysis between cellular groups was carried out using the DESeq2 package. Adjusted P value <0.05 indicates significant differential gene regulation between the $KRAS_{G12}$ and $KRAS_{other}$ PDAC. Gene set enrichment analysis (GSEA) between $KRAS_{G12}$ and $KRAS_{other}$ PDAC was carried out using the fgsea package. PDAC tumoral (i.e. classical, basal-like) or stromal components (activated stroma, inflammatory, structural vascular, immune) were assessed.²⁰ Adjusted P value <0.05 and normalized enrichment scores above 2 or below -2 indicate significant differential signaling pathways between the $KRAS_{G12}$ and $KRAS_{other}$ PDAC.

Clinical outcomes

The primary endpoint was metastatic OS defined as the time between diagnosis and death or censorship. Secondary endpoints included progression-free survival (PFS) (defined as the time between treatment initiation and progression of disease or death or censorship) and OS from metastases diagnosis. Disease response was defined using RECISTv1.1 criteria: stable disease, partial response (PR) or complete response (CR). Disease control rate was defined as the addition of patients with stable disease, PR and CR. For external validation and replication of the results, an independent cohort was used for OS analysis (PACA-CA, ICGC Data Portal²¹).

Statistics

Descriptive analysis was carried out with Fisher's exact test and Pearson's chi-square test for factorial variables and with two sample t -tests and the Wilcoxon rank sum test for quantitative variables. Survival curves were based on Kaplan–Meier non-parametrical estimation, and univariate analysis was carried out with the log-rank test. Multivariate analysis was carried out with a Cox proportional hazards model, adjusted on Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS), age and presence of liver metastasis at diagnosis or stage at diagnosis. Proportional hazard assumption was checked by graphical verification of Schoenfeld's residuals, and log-linearity assumption was checked by graphical verification of Martingale's residuals. Multicollinearity was assessed by measuring the variance inflation factor. Statistical analyses were carried out with RStudio 2022.12.0+353 'Elsbeth Geranium' Release.

RESULTS

Patients' characteristics

Overall, 330 patients were eligible; of them 264 patients with $KRAS$ mutation identified were included (Figure 1A), with 239 (91%) $KRAS_{G12}$ and 24 (9%) $KRAS_{other}$. Patients'

characteristics are presented in Table 1 according to $KRAS$ status. Forty-nine percent of patients were female, and the median age at diagnosis was 63 years with 155 patients (59%) exhibiting synchronous metastases. Main metastases sites at diagnosis were liver ($n = 184$, 69%), lung ($n = 52$, 20%), peritoneum ($n = 43$, 16%) and nodes ($n = 38$, 14%). Primary localization was predominantly in the head of the pancreas ($n = 112$, 42%). At non-metastatic stage, 60 patients (23%) received neo-adjuvant systemic therapy and 63 patients (24%) received adjuvant systemic therapy; 45 (17%) had upfront resection of primary tumor. CA19-9 at diagnosis was 1064 UI/ml [interquartile range (IQR) 183–7111 UI/ml] in $KRAS_{G12}$ patients versus 669 UI/ml (IQR 63–756 UI/ml) in $KRAS_{other}$ patients [$P = 0.21$ (non-significant)]. Overall, there were no differences between $KRAS_{G12}$ and $KRAS_{other}$ regarding baseline characteristics (Table 1). We could note a tendency to exhibit more lung metastases in case of $KRAS_{other}$ without reaching statistical significance ($P = 0.09$). Alcohol and tobacco consumption were not different between $KRAS_{G12}$ and $KRAS_{other}$ patients.

Molecular characteristics

Molecular profiling was carried out on tumor tissue (54%) or through liquid biopsy (38%) or both (5%), mostly at advanced stages (89%). $KRAS$ mutation types were mostly $KRAS_{G12}$ ($n = 239$, 91%) including G12D ($n = 114$, 48%), G12V ($n = 64$, 27%), G12R ($n = 32$, 13%), G12C ($n = 11$, 5%), G12A ($n = 17$, 7%) and G12L ($n = 1$, 0.5%). There were 24 (9%) $KRAS_{other}$, including Q61H ($n = 13$, 5%), Q61R ($n = 5$), Q61K ($n = 1$), Q61L ($n = 1$), G13D ($n = 1$), P34L ($n = 1$), G10A11G ($n = 1$) and V14L ($n = 1$) (Figure 1B).

The most frequent co-molecular alterations were: $TP53$ (78%), $CDKN2A/B$ (30%) and $SMAD4$ (16%) for $KRAS_{G12}$ and $TP53$ (67%), $CDKN2A/B$ (29%), $SMAD4$ (17%) and G protein subunit alpha S ($GNAS$) (17%) for $KRAS_{other}$. $GNAS$ was found more altered in $KRAS_{other}$ tumors ($P = 0.002$) suggesting potential intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) precursors (Figure 1C and Supplementary Table S2, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>). Regarding potentially actionable alterations, there was no difference between $KRAS_{G12}$ and $KRAS_{other}$, except for $BRAF$ that was found in 13% of $KRAS_{other}$ and in 1% of $KRAS_{G12}$ ($P = 0.01$).

Outcomes

In our cohort, median OS from initial diagnosis was 26.3 months [95% confidence interval (CI) 18.8–55.5 months] in $KRAS_{other}$ and 20.1 months (95% CI 18.9–23.1 months) in $KRAS_{G12}$ (Figure 2A) ($P = 0.04$). Median OS from metastatic diagnosis was 24.9 months (95% CI 17.4–43.4 months) in $KRAS_{other}$ and 16.7 months (95% CI 14.3–18.3 months) in $KRAS_{G12}$ (Figure 2B) ($P = 0.04$). In a multivariate analysis, after adjustment on ECOG PS, age at diagnosis and stage at diagnosis to account for the variety of patients at inclusion, the hazard ratio (HR) was 0.56 (95% CI 0.33–0.94, $P = 0.029$) for OS from initial diagnosis. For OS from metastases diagnosis (taken into account only for metastatic patients), the HR was 0.50 (95% CI 0.30–0.86, $P = 0.013$) after

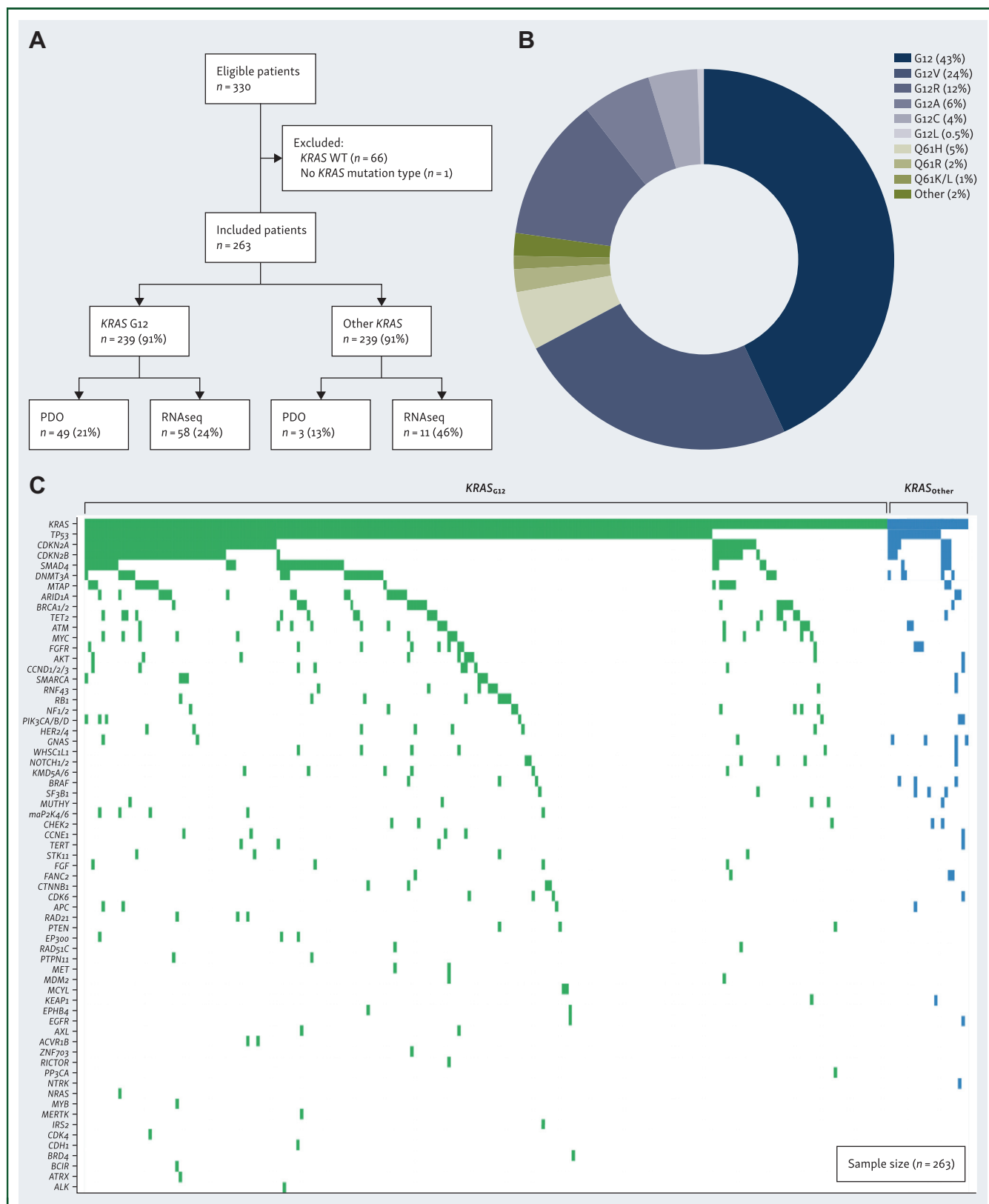


Figure 1. Flow chart of the study. (A) Study flow chart. (B) Repartition of codon-specific KRAS mutations in the cohort. (C) Oncoplot of the cohort depending on KRAS_{G12} or KRAS_{Other} status.
 PDO, pancreatic adenocarcinoma organoids; WT, wild-type.

Table 1. Characteristics of patients (n = 263)					
Variables	G ₁₂ (n = 239)		Other (n = 24)		P value
Age, years, mean (SD)	60.2	(10.0)	60.9	(11.3)	0.67
Sex (female) (n, %)	121	(51%)	8	(33%)	0.09
CA 19-9 at diagnosis (U/ml), median (IQR) (NA: 101)	1064	(183-7111)	669	(63-756)	0.21
Smoking history (NA: 63)	77	(43%)	8	(38%)	0.67
Alcohol consumption (NA: 78)	41	(25%)	3	(16%)	0.41
Thrombosis history (NA: 34)	83	(38%)	4	(19%)	0.08
ECOG at diagnosis					
≥2	19	(8%)	1	(0.5%)	1.00
0-1	220	(92%)	23	(99.5%)	
Surgical stage					
Resectable	45	(19%)	5	(21%)	0.14
Borderline	22	(9%)	2	(8%)	
Locally advanced	24	(10%)	4	(17%)	
Unknown	4	(1%)	0	(0%)	
Metastatic	142	(59%)	13	(54%)	0.61
Primary tumor					
Primary tumor localization at diagnosis					
Head (n, %)	100	(49%)	12	(54%)	0.73
Body (n, %)	56	(28%)	6	(27%)	
Tail (n, %)	47	(23%)	4	(18%)	
Unknown	36		2		
Metastases					
Metachronous metastases (n, %)	96	(41%)	11	(46%)	0.85
Metastases sites					
Liver (n, %)	168	(71%)	16	(67%)	0.61
Lung (n, %)	44	(18%)	8	(33%)	0.09
Nodes (n, %)	37	(16%)	2	(8%)	0.55
Peritoneum (n, %)	40	(17%)	3	(13%)	0.77
Bone (n, %)	10	(4%)	0	(0%)	0.61
Other (n, %)	10	(4%)	3	(13%)	0.37
Systemic chemotherapy					
Neoadjuvant chemotherapy (n, %)	54	(23%)	6	(25%)	0.98
Adjuvant chemotherapy (n, %)	57	(24%)	6	(25%)	1.00
Number of palliative chemotherapy lines at metastatic stage (mean, SD)	2.6	(1.4)	3.0	(1.6)	0.26

NA, not available; SD, standard deviation.

adjustment on sex, age at diagnosis and presence of liver metastases. The median OS was not different depending on the G12 codon among *KRAS*_{G12} patients (Figure 2C). These results were confirmed in an independent cohort (PACA-CA) of 217 PDAC patients with *KRAS* mutations, with improved survival of *KRAS*_{other} patients compared to *KRAS*_{G12} patients though not reaching statistical significance due to the limited number of patients (Supplementary Figure S1A, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>). The median OS was better in the *KRAS*_{WT} group compared to *KRAS*_{G12} and not statistically different from *KRAS*_{other} as shown in Supplementary Figure S1B and 1C, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>.

Median PFS for first-line systemic chemotherapy was similar between *KRAS*_{G12} and *KRAS*_{other} patients [5.5 months (95% CI 4.8-6.5 months) versus 6.1 months (95% CI 3.9-10.4 months), *P* = NS], as well as median PFS when receiving a 5-FU-based chemotherapy protocol as first-line line therapy (including FOLFIRINOX, FOLFOX or FOLFIRI as first-line therapy) or a gemcitabine-based chemotherapy protocol (including gemcitabine, gemcitabine–nab-paclitaxel and gemcitabine–paclitaxel) (Figure 2D). The mean number of metastatic lines received was 2.6 [standard deviation (SD) 1.4] in *KRAS*_{G12} versus 3.0 (SD 1.6) in *KRAS*_{other}, not different between the two groups.

Overall response rate and disease control rates were similar between groups for first-line PFS (Supplementary Table S3, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>), for the FOLFIRINOX regimen, for the gemcitabine-based regimen and we could not identify a specific chemotherapy sensitivity profile for *KRAS*_{other} patients. For patients with localized or borderline disease initially resected, median disease-free survivals were not different between the two groups (4.7 months in *KRAS*_{G12} versus 3.8 months in *KRAS*_{other}, *P* = 0.9).

Organoid drug sensitivity

Organoids were generated from metastases with core needle biopsy (*n* = 29), ascites (*n* = 13) or pleural effusion (*n* = 1) or from primary lesion (surgery resection: *n* = 3, pancreas aspiration: *n* = 2). Organoid concordance with tumor was verified and similar morphologies could be observed with consistent tumor grade, differentiation pattern and structure (Supplementary Figure S2A, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>). Overall, all *KRAS* mutation types were concordant for all PDOs for whom a molecular profile was available (Supplementary Figure S2B, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>).

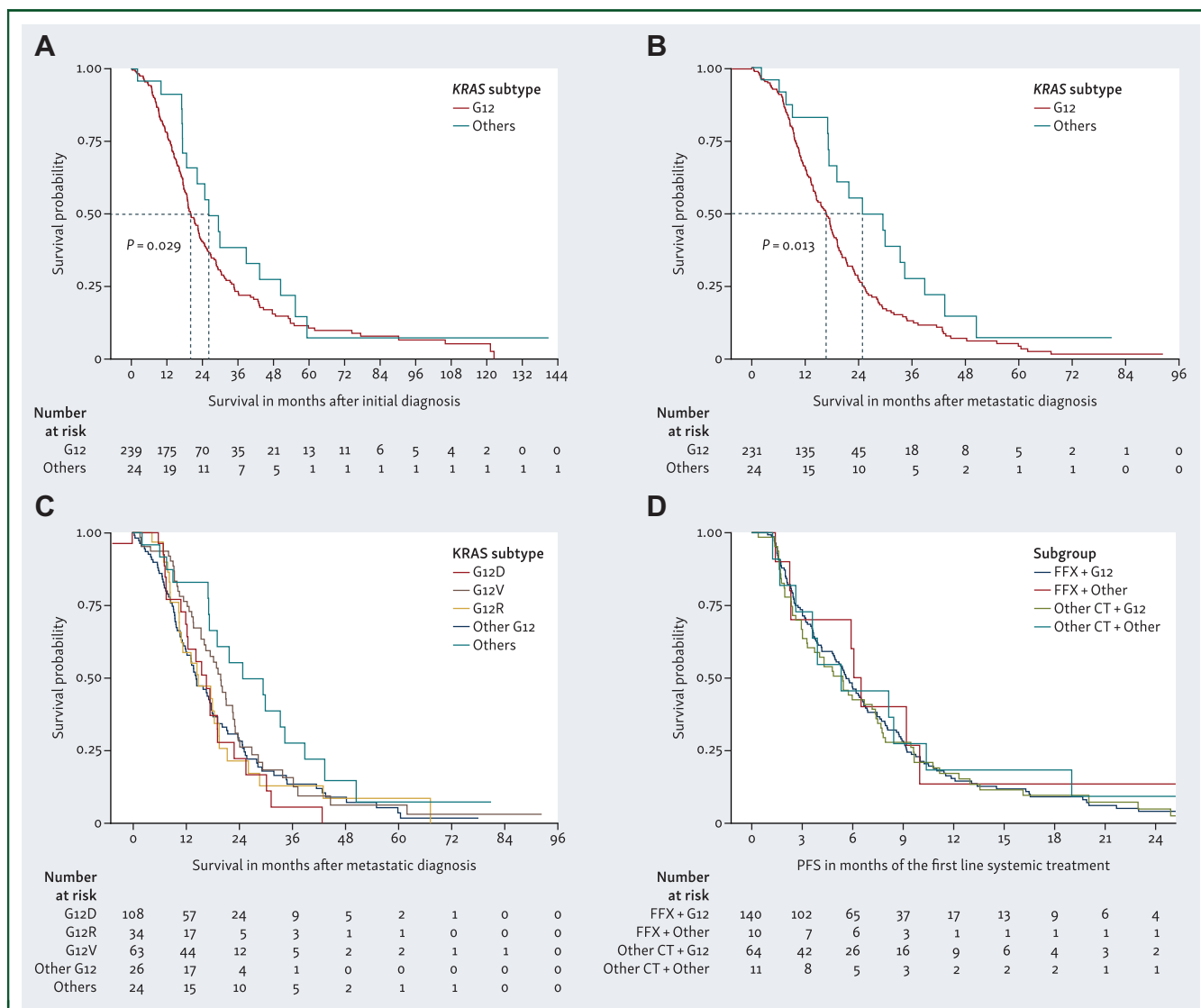


Figure 2. Overall survivals and progression-free survival depending on the KRAS mutation. (A) Overall survival from initial diagnosis depending on KRAS status (with adjusted P value). (B) Overall survival from metastatic diagnosis depending on KRAS status (with adjusted P value). (C) Overall survival from metastases diagnosis depending on KRAS_{G12} codon. (D) First-line progression-free survival depending on KRAS status. CT, chemotherapy; FFX, folfox.

Single-drug pharmacotyping was carried out for each PDO with a designed library of five standard-of-care (SOC) drugs (5-FU, irinotecan, oxaliplatin, gemcitabine and paclitaxel) and three other drugs tested targeting EGFR/RAS/MAPK pathway (erlotinib, cobimetinib, lapatinib) (Figure 3A). PDO sensitivity was not different between KRAS_{G12} and KRAS_{other} for SOC drugs (Figure 3B). These results for SOC are concordant with the similar PFS between both groups. When testing other drugs targeting EGFR/RAS/MAPK pathways, there was a trend (but not statistically significant) for a higher sensitivity of KRAS_{G12} lines to erlotinib but not for lapatinib cobimetinib.

Transcriptomic analyses

To understand the difference between KRAS_{other} and KRAS_{G12} tumors, we carried out RNA sequencing on a subset of 69 PDACs with a differential gene analysis between 11

KRAS_{other} and 58 KRAS_{G12} PDAC (Figure 4A). Clinical characteristics of those 69 patients were not different from those of the overall cohort. Among the top differentially expressed genes, several genes up-regulated in KRAS_{G12} were involved in cell adhesion (CDH17, CEA-CAM7), extracellular matrix remodeling (MMP8, MMP23), cell invasion (FGF20) and cell–cell recognition (GPA33). In comparison, genes up-regulated in KRAS_{other} were mostly involved in neuromodulation (NTS, MYT1L, MUSK, ARPP21, KCCN3, ATP1A2). After GSEA, we observed a significant and exclusive up-regulation of immune pathways such as cytokine signaling [interferon (IFN)-γ, IFN-α, interleukin (IL)-10, IL-6, IL-1, tumor necrosis factor (TNF)-α] and immune cell activation (T cell, mast cell, neutrophils) in KRAS_{G12} (Figure 4B). We assessed whether PDAC tumoral (i.e. classical, basal-like) or stromal components (activated stroma, inflammatory, structural vascular, immune) were different according to the KRAS status. Only

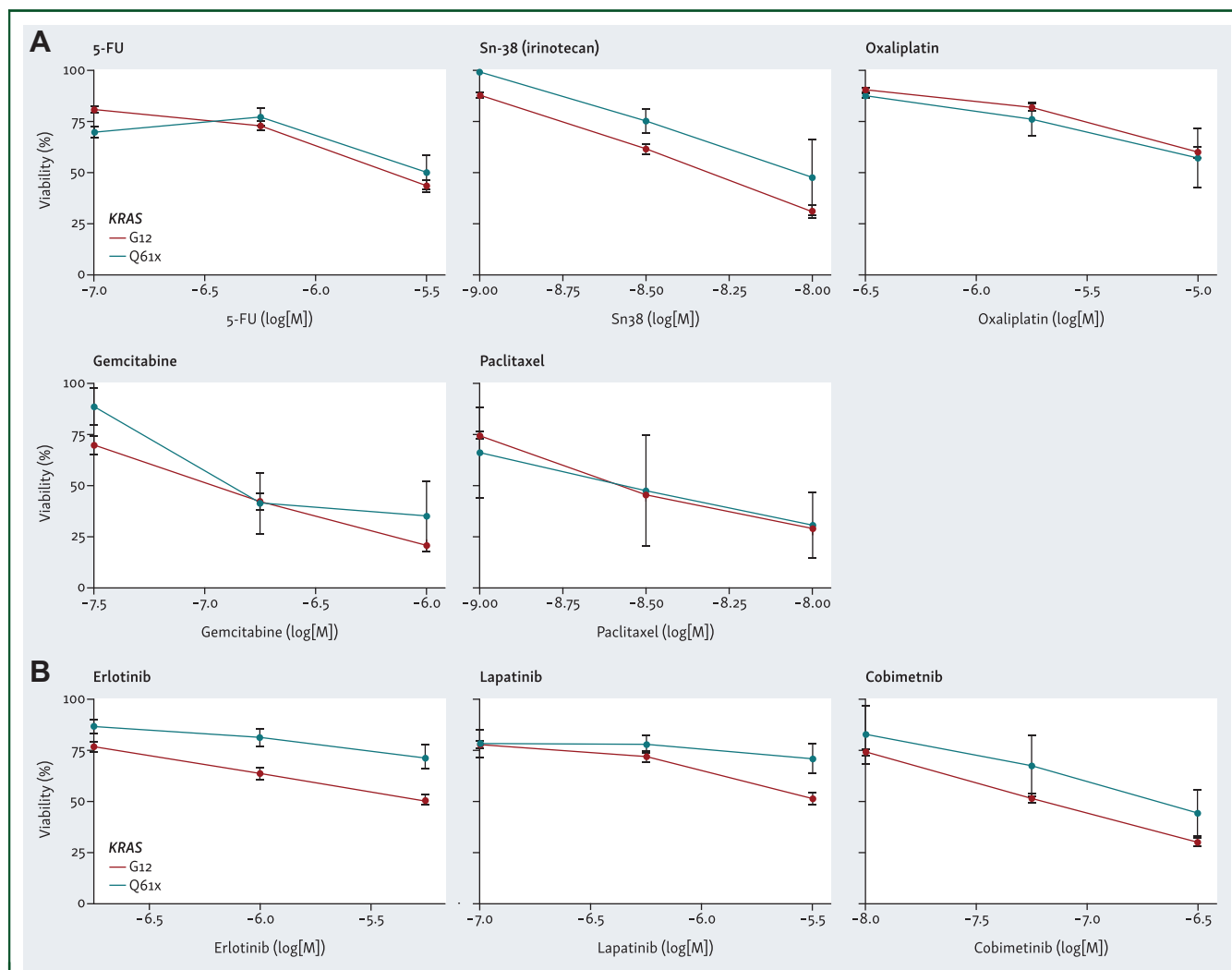


Figure 3. Organoid sensibility scores. (A) Normalized viability at three concentrations, for standard-of-care drugs 5-FU, oxaliplatin, SN-38 (irinotecan), gemcitabine and paclitaxel, for *KRAS*_{G12} and *KRAS*_{Other} organoid lines. (B) Normalized viability at three concentrations for erlotinib, lapatinib and cobimetinib. 5-FU, 5-fluorouracil.

the immune stromal component was present more in *KRAS*_{G12} ($P = 0.02$) (Figure 4C).

DISCUSSION

In this study, we report that codon-specific *KRAS* mutations are not equal and we describe that *KRAS*_{G12} PDAC patients have a worst prognosis than *KRAS*_{Other} PDAC patients. The presence of *KRAS*_{G12} mutation was a negative and independent prognostic factor for OS.

KRAS, which encodes a GTPase protein, is the most frequently mutated gene in PDAC and plays a crucial role in PDAC carcinogenesis. *KRAS* mutations lead to the constitutive activation of *KRAS* signaling, engaging downstream effectors such as the RAF-MEK-ERK and PI3K-AKT pathways. This results in uncontrolled cell proliferation, evasion of apoptosis, angiogenesis and metastasis.²²⁻²⁴ This sustained activation of *KRAS* signaling cascades contributes to the initiation and progression of PDAC.²³ Of note, some

patients with PDAC harbor a different disease with *KRAS*-WT tumor, which we chose to exclude due to their known different prognosis and characteristics,²⁵ as suggested in Supplementary Figure S1B and S1C, available at <https://doi.org/10.1016/j.esmogo.2023.100030>. We found ~20% of *KRAS*-WT patients in our cohort probably because of the liquid biopsy setting with a lack of sensibility of the technique and the selected population (with survival biases).

A recent revolution in cancer treatments is the emergence of novel *KRAS* inhibitors. Indeed, despite being traditionally viewed as ‘undruggable’, researchers have successfully developed inhibitors for specific *KRAS* mutations, such as *KRAS*_{G12C} and *KRAS*_{G12D}.^{13,26} Moreover, there are ongoing efforts to develop other *KRAS* inhibitors, including a highly promising pan-*KRAS* inhibitor.¹⁶ This non-covalent inhibitor that binds preferentially and to the inactive state of *KRAS* (while sparing NRAS and HRAS) was recently described, and blocked nucleotide exchange to prevent the activation of a large range of *KRAS* mutants,

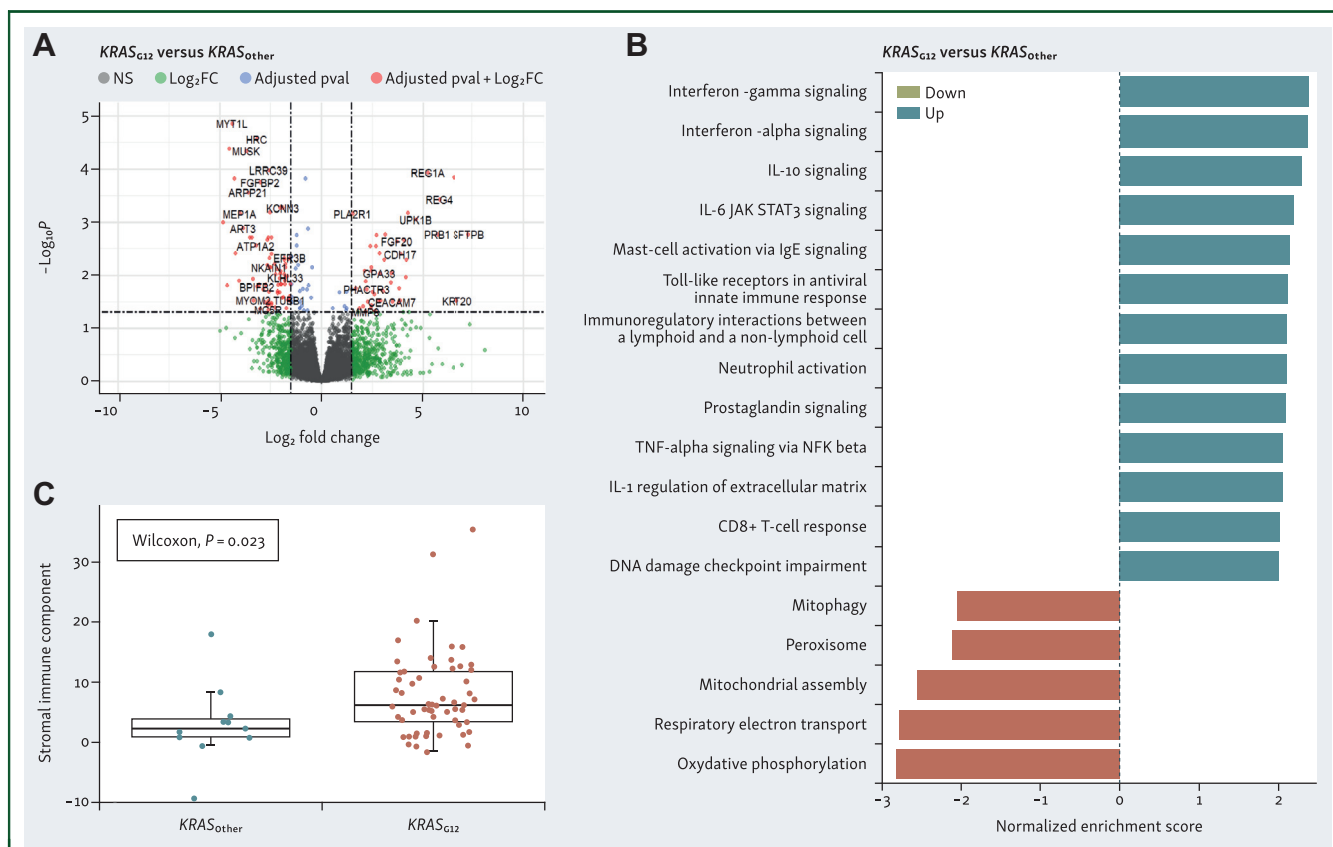


Figure 4. Gene expression analyses. (A) Volcano plots showing the differentially expressed genes between KRAS_{G12} and KRAS_{Other} tumors. Dashed lines indicate the threshold of significant gene expression, defined as log₂-transformed fold change ≤ -2.0 and ≥ 2.0 with an adjusted P value > 0.05 . (B) GSEA analysis showing the signaling pathways that are differentially regulated between KRAS_{G12} and KRAS_{Other} tumors and statistically significant (adjusted P value < 0.05). (C) Heatmap with normalized enrichment scores following GSEA analysis showing the differentially expressed signatures between KRAS_{G12} and KRAS_{Other} tumors. GSEA, Gene set enrichment analysis; IL, interleukin; NFK, nuclear factor-kappa B; NS, non significant; TNF, tumor necrosis factor.

including KRAS_{G12} A/C/D/F/V/S, and KRAS_{Other} G13C/D, V14I, L19F, Q22K, D33E, Q61H, K117N and A146V/T.

Codon-specific KRAS mutations exhibit distinct frequencies among colorectal cancer (CRC), lung cancer and PDAC in which KRAS is the most prevalent. With $\sim 40\%$ - 50% of KRAS mutations in CRC, the most prevalent KRAS mutations occur at codons 12 and 13 (KRAS_{G12D}: 12.5%, KRAS_{G12V}: 8.5%, KRAS_{G13D}: 7.4%).^{27,28} In lung cancer, the frequency of codon-specific KRAS mutations also varies with KRAS_{G12C} accounting for $\sim 40\%$ of KRAS mutations.^{27,28} In PDAC, the majority of KRAS mutations occur at codon 12, particularly KRAS_{G12D}, KRAS_{G12V} and KRAS_{G12R}, with scarce data regarding KRAS codon-specific differences, except a recent study that found a better prognostic of KRAS_{G12R} versus KRAS_{G12D} patients.¹⁷ Our study included less patients than in the study by Ardalan et al.,¹⁷ and a lack of power to detect differences between the G12 codon or different patient characteristics due to inclusion biases are possible. In biliary tract tumors,¹² the presence of KRAS_{G12} mutation was associated with poorer survival and an increased risk of recurrence in patients who underwent curative resection for intrahepatic cholangiocarcinoma. In late-stage metastatic CRC, codon-specific KRAS mutations could predict the OS benefit of patients treated with tipiracil–trifluridine.^{9,11} Patients with KRAS_{G12} mutations did not experience any

OS benefit from tipiracil–trifluridine, whereas patients with KRAS_{G13} mutations derive substantial OS from the treatment (HR = 0.29, 95% CI 0.15-0.55, $P < 0.001$).⁹ In our study, no specific treatment sensibilities were observed, either in the clinics or *in vitro* using organoids. This indicates that codon-specific KRAS would be a prognostic factor for survival rather than a predictive factor for chemotherapy response.

Differences between KRAS_{G12} mutations and KRAS_{Other} are probably due to several parameters. Firstly, the biology itself of the tumor cells can be different with activation of different cellular pathways at different activation levels. This might induce a different cell phenotype regarding proliferation, cell survival or cell polarity and movement due to cell-intrinsic mechanisms. Secondly, the stroma can be different, as suggested with our transcriptomic analysis with up-regulation of immune pathways such as IFN- γ or α signaling, IL-10 and IL-6 signaling, mast cell activation, innate immune response (mast cell or toll-like receptors), neutrophil and CD8+ T-cell activation. The activation of these pathways suggests immune-stimulating signature in KRAS_{G12} tumors. We did not analyze the fibroblast component *per se* but the type of fibroblasts present in the tissue could also be different. Thirdly, responses to treatments could be different with increased resistance to cytotoxic

effects as found with tipiracil—trifluridine in CRC patients with $KRAS_{G12}$ mutation. In our study we did not find any differences regarding treatment sensibility with FOLFIRINOX in the first line, or with our preclinical model using organoids. However, this was an exploratory analysis and we cannot exclude that the different codon-specific mutations can determine differences in drug-induced tumor evolution that manifest only at a more advanced stage than in the first line.

Preclinical models have been used to study the functional consequences and therapeutic implications of codon-specific $KRAS$ mutations, such as genetically engineered mouse models, cell line-based systems and organoids. Using high-fidelity CRISPR-based engineering, a team generated an allelic series of $KRAS$ -mutant mice and organoids, reflecting codon 12 and 13 mutations.¹⁰ When each allele of $KRAS$ was induced in either the colon or pancreas of mice, significant quantitative and qualitative differences were observed in their ability to drive the initial stages of transformation.¹⁰ Specifically, Q61-mutant tumors exhibit less MAPK activity compared with other mutants.¹⁸ Therefore, codon-specific $KRAS$ differences are a result, at least in part, of a different signaling during tumor initiation and growth, and of the variations in genes expression, in the function of codon-specific $KRAS$ proteins, and in cellular responses to oncogenic $KRAS$.

Interestingly, we also found an association between $KRAS_{Other}$ and $GNAS$ co-mutation, a gene encoding a G-protein alpha subunit, which is frequently mutated in pancreatic IPMNs.^{29,30} The combination of $GNAS$ and $KRAS$ is helpful for diagnosis of pancreatic cysts.^{31,32} Our data could suggest that $KRAS_{Other}$ might be associated with IPMN carcinogenesis, and further investigation is warranted since in our cohort, the low number of patients with IPMN history precluded any definite conclusion.

In our transcriptomic analyses, we found a significant and exclusive up-regulation of immune pathways such as cytokine signaling (IFN- γ , IFN- α , IL-10, IL-6, IL-1, TNF- α) and immune cell activation (T cell, mast cell, neutrophils) in $KRAS_{G12}$ and also found that the immune stromal component was present more in $KRAS_{G12}$ based on the Puleo study.²⁰ Interestingly, in mouse models, tumor microenvironment (including cancer-associated fibroblasts and immune cells) is modified by $KRAS_{G12D}$ inhibition with T-cell-dependent antitumor activity.¹⁵ Interestingly, a recent study showed enhanced effect of $KRAS_{G12D}$ inhibitor with immune checkpoints inhibitors and this might suggest some $KRAS$ tumors might be made sensitive to immune checkpoints inhibitors.¹⁵ On the contrary, genes up-regulated in $KRAS_{Other}$ were mostly involved in neuromodulation (NTS , $MYT1L$, $MUSK$, $ARPP21$, $KCCN3$, $ATP1A2$). Whether the localization of immune cells is different between $KRAS_{G12D}$ and $KRAS_{Other}$ tumors is unknown and spatial analysis of the tumors could be interesting. Transcriptomic data found no differences between $KRAS_{Other}$ and $KRAS_{G12}$ basal and classical components, which might partly explain the absence of difference in treatment response in our study. However,

more patients are needed to definitively conclude on molecular subtypes regarding $KRAS$ status.

Our study has, nevertheless, several limitations. Firstly, this is a monocentric retrospective study. Nevertheless, since $KRAS$ status is not mandatory for PDAC management, its assessment was possible thanks to institutional protocols hosted in our referral center. Secondly, patients tested were mostly fit patients, as shown by the low number of ECOG > 1 at diagnosis. Nevertheless, ECOG was not different between groups. Moreover, $KRAS_{Other}$ group comprised only 24 patients. This limited number of $KRAS_{Other}$ patients mostly implied low power and did not prevent statistical significance for OS. Thirdly, as stated previously, the population of patients is biased, since patients were included through a clinical trial, as reflected with the prolonged OS of 16 months compared to the 11-13 months of historical controls. Lastly, our *in vitro* drug sensibility assay was carried out on a limited number of samples, especially for $KRAS_{Other}$.

Conclusion

Our study reports codon-specific survival in PDAC patients, with a worst prognosis for patients harboring $KRAS_{G12}$ mutations compared to patients with $KRAS_{Other}$ mutations. $KRAS_{G12}$ appeared to be a prognostic factor, despite no differences in treatment sensibility *in vivo* and *in vitro*. Transcriptomic analyses showed a significant and exclusive up-regulation of immune pathways. These results warrant to be confirmed in larger-scale studies.

FUNDING

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) [grant number ANR-20-CE13-0031-01], Institut National du Cancer (INCa) [grant number 2020-1-PLBIO-04-IGR-1], Fundraising against CRC and Mars Bleu from the Gustave Roussy foundation, Inserm Cancer 3R program [grant number 20CRO46-00], Agence Nationale de la Recherche (ANR) [grant number ANR-21-RHUS-0003], PRISM (ANR-18-IBHU-0002), Philantropia and FERCM.

DISCLOSURE

LT: consultant: GE, Terumo, quantum surgical. AI: Research grant (AstraZeneca, Bayer, BMS, Merck, MSD, Pharmamar). AH: consultant or accomodation: Amgen, AstraZeneca, Debiopharm, Eli Lilly and Company, Incyte Corporation, QED Therapeutics. DM: consultant or accomodation: Roche, Amgen, Bayer, Sanofi, Merck Serono, Servier, Sanofi, Pierre Fabre, Viatrix, Bristol Myers Squibb, MSD Oncology, LEO Pharma, Incyte, AstraZeneca, Taiho Oncology, Pfizer. VB: consultant or accomodation: Amgen, AstraZeneca, Bayer Schering Pharma, Ipsen, Merck Serono, MSD Oncology, Roche/Genentech. MD: consultant or accomodation: Merck Serono, MSD, AMGEN, Roche, Bayer, Ipsen, Pfizer, Servier, Pierre Fabre, HalioDx, Lilly, Sanofi, BMS. All other authors have declared no conflicts of interest.

DATA SHARING

Datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33.
2. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1817-1825.
3. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 2013;369(18):1691-1703.
4. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26(suppl 5):v56-v68.
5. Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, Gurbani D, Gondi S, Westover KD. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations. *Mol Cancer Res*. 2015;13(9):1325-1335.
6. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Am Med Assoc*. 2010;304(16):1812-1820.
7. Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*. 2012;30(29):3570-3577.
8. Hobbs GA, Baker NM, Miermont AM, et al. Atypical KRASG12R mutant is impaired in PI3K signaling and macropinocytosis in pancreatic cancer. *Cancer Discov*. 2020;10(1):104-123.
9. van de Haar J, Ma X, Ooft SN, et al. Codon-specific KRAS mutations predict survival benefit of trifluridine/tipiracil in metastatic colorectal cancer. *Nat Med*. 2023;29(3):605-614.
10. Zafra MP, Parsons MJ, Kim J, et al. An in vivo kras allelic series reveals distinct phenotypes of common oncogenic variants. *Cancer Discov*. 2020;10(11):1654-1671.
11. Yoshino T, Van Cutsem E, Li J, et al. Effect of KRAS codon 12 or 13 mutations on survival with trifluridine/tipiracil in pretreated metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *ESMO Open*. 2022;7(3):100511.
12. Zhou SL, Xin HY, Sun RQ, et al. Association of KRAS variant subtypes with survival and recurrence in patients with surgically treated intrahepatic cholangiocarcinoma. *JAMA Surg*. 2022;157(1):59-65.
13. Strickler JH, Satake H, George TJ, et al. Sotorasib in KRAS p.G12C-mutated advanced pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2023;388(1):33-43.
14. Bekaii-Saab TS, Yaeger R, Spira AI, et al. Adagrasib in advanced solid tumors harboring a KRASG12C mutation. *J Clin Oncol*. 2023;41:4097-4106.
15. Kemp SB, Cheng N, Markosyan N, et al. Efficacy of a small-molecule inhibitor of KrasG12D in immunocompetent models of pancreatic cancer. *Cancer Discov*. 2023;13(2):298-311.
16. Kim D, Herdeis L, Rudolph D, et al. Pan-KRAS inhibitor disables oncogenic signalling and tumour growth. *Nature*. 2023;619(7968):160-166.
17. Ardalan B, Ciner A, Baca Y, et al. Prognostic indicators of KRAS G12X mutations in pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2023;41(suppl 4):735.
18. Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun*. 2015;6:6744.
19. Boileve A, Goudarzi N, Cartry J, et al. PD-10 Organoids as tools for functional precision oncology in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2023;34:S4-S5.
20. Puleo F, Nicolle R, Blum Y, et al. Stratification of pancreatic ductal adenocarcinomas based on tumor and microenvironment features. *Gastroenterology*. 2018;155(6):1999-2013.e3.
21. Zhang J, Bajari R, Andric D, et al. The International Cancer Genome Consortium Data Portal. *Nat Biotechnol*. 2019;37(4):367-369.
22. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2457-2467.
23. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;144:241-275.
24. Singh A, Greninger P, Rhodes D, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell*. 2009;15(6):489-500.
25. Philip PA, Azar I, Xiu J, et al. Molecular characterization of KRAS wild-type tumors in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2022;28(12):2704-2714.
26. Christensen JG. The KRASG12D inhibitor MRTX1133 elucidates KRAS-mediated oncogenesis. *Nat Med*. 2022;28(10):2017-2018.
27. Hofmann MH, Gerlach D, Misale S, Petronczki M, Kraut N. Expanding the reach of precision oncology by drugging all KRAS mutants. *Cancer Discov*. 2022;12(4):924-937.
28. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D945-D950.
29. Paniccia A, Polanco PM, Boone BA, et al. Prospective, multi-institutional, real-time next-generation sequencing of pancreatic cyst fluid reveals diverse genomic alterations that improve the clinical management of pancreatic cysts. *Gastroenterology*. 2023;164(1):117-133.e7.
30. Paolino G, Esposito I, Hong SM, et al. Intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN) of the pancreas: a distinct entity among pancreatic tumors. *Histopathology*. 2022;81(3):297-309.
31. Singhi AD, Nikiforova MN, Fasanella KE, et al. Preoperative GNAS and KRAS testing in the diagnosis of pancreatic mucinous cysts. *Clin Cancer Res*. 2014;20(16):4381-4389.
32. Wu J, Jiao Y, Dal Molin M, et al. Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(52):21188-21193.

V. ETUDE DU PHENOTYPE INVASIF DES PDAC

Contexte :

La progression métastatique est une problématique majeure qui est responsable d'une majorité des décès liés aux cancers. Ainsi, le pronostic défavorable des PDAC est notamment dû à un diagnostic tardif, souvent au stade métastatique. Éclaircir les voies de dissémination des PDAC est donc crucial. Dans les PDAC, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ne semble pas nécessaire à l'invasion tumorale (84). Récemment, un programme onco-morphogénétique a été identifié dans la dissémination métastatique d'un sous-groupe de cancers colorectaux (CRC) se développant à partir des précurseurs festonnés (*serrated*) (273). Ces CRC possèdent une morphologie en dent de scie (*serrated*) et ont la possibilité de former des intermédiaires tumoraux pluricellulaires (TSIP ou sphères tumorales à polarité inversée). Ils ont un profil moléculaire particulier où l'activation de RAS ou BRAF est un élément fondateur précoce. Il a également été montré que les tumeurs présentant un phénotype producteur de TSIP (TSIP+) étaient plus résistantes aux chimiothérapies (274).

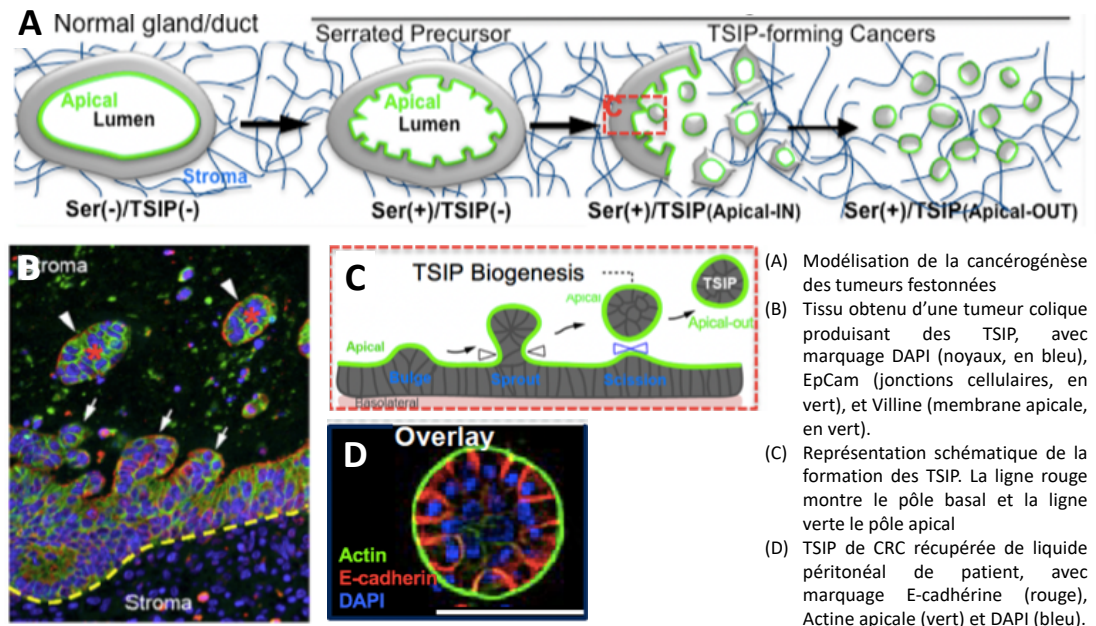


Figure 33: Biogenèse des TSIP dans les cancers colorectaux (273)

Les PDAC et les CRC festonnés partagent des caractéristiques morphologiques (avec l'existence de lésions endophytiques au sein des canaux pancréatiques) et moléculaires (activation de la voie RAS) communes. En dépit d'un intérêt croissant pour les aspects moléculaires de la

transformation oncogénique, peu d'études s'intéressent à leur impact sur la morphogenèse, la progression et la dissémination des cancers. Dans cette étude, nous nous demandions donc si le phénotype invasif des PDAC est médié par un programme onco-morphogénétique et si les TSIP sont des intermédiaires tumoraux de la dissémination des PDAC.

Principaux résultats :

- Des TSIP sont identifiées dans 28 % des PDAC (analyse pathologique confirmée par des colorations immunohistochimiques).
- Les caractéristiques cliniques principales ne sont pas différentes entre les patients présentant des tumeurs TSIP+ et TSIP-, tout comme la survie globale. La survie sans progression métastatique de première ligne est plus élevée chez les patients TSIP+ que chez les patients TSIP-.
- Les tumeurs TSIP+ présentent plus de mutations dans *CDKN2A*, *GATA6* et *GNAS*, et moins dans *TP53*.
- En transcriptomique, les tumeurs TSIP+ présentent une activation des voies liées au métabolisme des lipides et à la peroxydase. Les tumeurs TSIP+ sont plus classiques que basales et comportent moins de monocytes, moins de lymphocytes T et plus de stroma inactif, comme confirmé par l'immunohistochimie.
- En utilisant une cohorte d'organoïdes dérivés de patients atteints de PDAC (n=45), nous avons pu modéliser les tumeurs TSIP+ et TSIP-, en fonction de leur maintien d'une polarité apicale vers l'extérieur dans des gels de collagène-I. L'analyse transcriptomique basée sur les organoïdes a révélé une différence dans les voies d'oxydoréduction, mais aucune différence dans les traitements chimiothérapeutiques n'a été identifiée dans les organoïdes.
- En utilisant la transcriptomique spatiale, nous avons montré que le profil transcriptomique était homogène dans différentes parties des tumeurs TSIP.

(Travail en cours de préparation)

Tumor spheres with inverted polarity in pancreatic adenocarcinoma

Alice Boilève^{1,2,3}, , Mohamed-Amine Bani⁴, Marc Hilmi⁵, Joël Raingeaud¹, Jacques R. R. Mathieu¹, Christophe Desterke⁶, Dimitrios Papanikolaou⁷, Ali Mouawia¹, Negaar Goudarzi^{1,8}, Jérôme Cartry^{1,2*}, Sabrina Bedja^{1,2*}, Anthony Tarabay³, Cristina Smolenschi^{3,9}, Antoine Hollebecq^{3,9}, Florent Peglion¹, Michel Ducreux^{1,2,3}, Fanny Jaulin^{1,2,10}

1. INSERM U1279, Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France
2. Université Paris Saclay, 91471 Orsay, France
3. Gustave Roussy, département de médecine, 94800 Villejuif, France
4. Gustave Roussy, département de pathologie morphologique, 94800 Villejuif, France
5. Institut Curie, département de médecine, 92210 Saint-Cloud, France
6. Université Paris Saclay, INSERM, Modèles de Cellules Souches Malignes et Thérapeutiques (UMR1310), 94800 Villejuif, France
7. INSERM U1015, Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France
8. Gustave Roussy, plateforme organoïdes, 94800 Villejuif, France
9. Gustave Roussy, DITEP, 94800 Villejuif, France
10. Gustave Roussy, département de recherche, 94800 Villejuif, France

Funding:

Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant ANR-20-CE13-0031-01

Institut National du Cancer (INCa) grant 2020-1-PLBIO-04-IGR-1

Fundraising against CRC and Mars Bleu from the Gustave Roussy foundation

Inserm Cancer 3R program (20CR046-00)

This work has benefited from state financial aid, managed by the Agence Nationale de Recherche under the investment program integrated into France 2030, project reference ANR-21-RHUS-0005.

Philantropia

Keywords. Apicobasolateral polarity, Pancreatic cancer, Organoids, Spatial transcriptomic, metabolomic

Corresponding authors:

Fanny Jaulin, PhD

114 rue Edouard Vaillant,

94800 Villejuif

fanny.jaulin@gustaveroussy.fr

+33 1 42 11 23 96

Abstract

Cancer metastatic progression is a major issue in patient treatment and cancer-related deaths. Recently, a new mode of dissemination was described in colorectal cancer, in which large clusters of cancer epithelial cells, displaying a robust outward apical pole, were identified as tumor intermediates. These clusters were named tumour spheres with inverted polarity (TSIPs).

Here, we show for the first time the presence of TSIP in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tumors, based on a pathological analysis, confirmed by immunohistochemistry stainings. In a cohort of 188 PDAC tumors, 52 tumor harbored TSIP (28%). Main clinical characteristics at baseline were not different between TSIP+ and TSIP- patients as well as overall survival. First-line metastatic progression-free survival was higher in TSIP+ patients than in TSIP- patients. TSIP+ tumors harbored more mutation in *CDKN2A* and *GNAS*, and less in *TP53*.

A bulk tumor-based transcriptomic analysis revealed that TSIP+ tumors harbored an increase of lipid metabolism with differentiation of beta cell. TSIP+ tumors presented more classical transcriptomic component than basal component and harbored less monocytes, less T cells and more inactive stroma component, as confirmed by immunohistochemistry.

We could identify that TSIP tumors kept their inverted polarity with *in vitro* models using a patient-derived organoids cohort of PDAC (n=45), with a preserved apical-out polarity in collagen-I gels. Organoids-based transcriptomic assay revealed an increase of oxydoreduction pathways, but no difference to chemotherapeutic treatments was identified in organoids. Finally, we show that metabolomic profiles between TSIP+ and TSIP- tumors (using organoids) were different for glycolysis pathway, oxidoreduction and nucleobase pathway. Using tumor-based spatial transcriptomic (GEOMX[®]), we showed that transcriptomic profiles were homogeneous within different parts of TSIP tumors.

Thus, tumor intermediated names TSIP could be identified in PDAC patients, but their biological significance is still unclear.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) are diagnosed with or will develop metastases, and have a dismal prognosis, with a median overall survival (OS) of less than 12 months(1,2). PDAC is currently the fourth leading cause of cancer-related death in both men and women and, with increasing incidence, is expected to become the second cause of cancer-related death worldwide in 2030-2040 (3). Despite the heterogeneity of PDAC, invasion and dissemination have mostly been studied in the context of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). In this model, carcinoma progression and invasion are associated with the partial or complete loss of epithelial architecture as the EMT transcriptional program is activated to endorse cells with migratory and proteolytic activities. However, it is still unclear whether this transcriptional program is causative of invasion and metastases formation or if it enables other cell properties, such as chemoresistance (4).

In colorectal cancer (CRC), 3D reconstruction of histological specimens has shown that individual single cells are notably absent at the edges of the tumor. Instead, the focus has shifted to the presence of tumor "buds" or "clusters" as the intermediate forms leading the invasion at the tumor's front (5–7). In various types of cancer, research into functional aspects has revealed that collective behaviors among cancer cells predominantly contribute to the seeding of secondary metastatic lesions.(8–13) These tumor cell clusters possess heightened migratory and survival capabilities, enabling them to navigate through the tissue surrounding the tumor and even enter the lymphatic and blood circulatory systems to reach distant organs and thus induce metastases(8,14). However, the specific mechanisms driving the metastatic spread of digestive cancers, including PDAC, have not received sufficient attention. Understanding the oncogenic pathways and cellular components responsible for CRC dissemination remains a significant, unaddressed medical challenge.

Recently, a new type of tumor intermediates were described, named 'tumor spheres with inverted polarity' (TSIPs) (15). These spherical clusters comprised of hundreds of cells and have an unusual "apical-out" orientation, meaning that the apical pole, typically located on the inner lumen-facing surface of cells, surrounds the outer edge of the cluster and is in direct contact with patient fluids and tissues. These collective tumor intermediates exhibit a strong epithelial identity, a lack of mesenchymal markers, and a high level of cohesion, ensured by the presence of typical junctions found in organized epithelial cells.They originate within the primary tumor and maintain this inverted topology as they invade surrounding tissues,

initiating metastases, particularly in the peritoneum. TSIP were mainly identified from hypermethylated CRCs that originate from serrated precursor lesions and are often associated with poor patient prognosis. This TSIP-dependent collective behavior has demonstrated invasion capabilities and the ability to form metastases when reintroduced into mice, rendering them malignant tumor intermediates (15). In CRC, these tumor intermediates were also associated with a chemoresistance that could explain the worse prognosis(16).

Due to similarities between hypermethylated colorectal cancers (including RAS-MAPK pathway activation) and PDAC (in which *KRAS* mutations occur in 90% of cases), we wonder whether the invasive phenotype of PDAC could also be mediated by an onco-morphogenetic program, and whether TSIPs could serve as tumor intermediates in PDAC dissemination.

Material and methods

Main patients cohort

All patients with PDAC and available histology were retrospectively included from October 2015 to March 2020, in compliance with Helsinki declaration. Molecular profile was available for a majority of patients through including in Moscato trial (NCT). All patients gave signed informed consent for tumor analysis when performed. Study data were collected and managed using *REDCap* electronic data capture tools hosted at Gustave Roussy.

Molecular alteration analyses

Tumor molecular profiling was performed as part of patients' clinical management in an attempt to identify actionable molecular alteration. All patients gave signed informed consent for Next-generation-sequencing analyses (STING trial). Molecular profile was obtained through tumor tissue profiling (FoundationMedicine[®] panel including 324 oncogenes, tumor suppressor genes or gene rearrangement as well as microsatellite stability status and tumor mutational burden or in-house panel of 75 oncogenes and tumor suppressor genes).

Histology, immunostaining and immunofluorescence

All tumors embedded in paraffin were stained for hematoxylin eosin and Safran. Sections were immunostained for ezrin (1:100; 610603, BD Biosciences) or with anti-integrin B1 monoclonal antibody (Cell signaling 9699), CD10 (Sigma SAB5500035), GATA6 (proteintech 55435-1-AP), P63 (DAKO M7317), s100A2 (Sigma HPA062451), periostin (Proteintech 66491-1-Ig) and CDX2 (Roche 760-4380). Stainings were performed with Ventana BenchMark XT immunostainer (Ventana Medical Systems) using the UltraView DABv3 kit (Ventana). The chromogene was 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in all the stainings. Tumor pathological samples were reviewed by an expert pathologist.

For immunofluorescence, samples were washed twice in PBS supplemented with Ca²⁺ (0.1 mM) and Mg²⁺ (1 mM) and fixed in 4% PFA for 45 min. Permeabilization was performed in PBS supplemented with 0.5% Triton X-100 for 45 min. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C at the dilutions listed below in antibody diluent, PBS with 10% serum supplemented by 0.1% Triton X-100. Secondary antibodies used at 1:500 [Jackson ImmunoResearch, AffiniPure goat anti-mouse-IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (715-545-150), AffiniPure goat anti-rabbit-IgG conjugated to Cy3 (711-165-152) or Life Technologies goat anti-mouse-IgG conjugated to Alexa Fluor 647, A21241, donkey anti-rabbit-IgG

conjugated to Alexa Fluor 488, A21206)], phalloidin, 1:1000 (Life Technologies) and DAPI (1 µg/ml) were incubated overnight at 4°C or 2 h at room temperature.

Clinical outcomes and efficacy evaluation

Overall survival (OS) was defined as time between diagnosis and death, or the date of last follow-up. OS from metastatic diagnosis was defined as time between metastases diagnosis and death, or the date of last follow-up. Progression-free survival (PFS) was defined as the time between treatment initiation and disease progression or death, or the date of last follow-up in patients alive without progression. Disease response was defined using RECIST1.1 criteria: stable disease (SD), partial response (PR) or complete response (CR). The disease control rate was defined as the addition of patients with SD and PR.

Patients-derived organoids (PDO) cohort

Patients with PDAC were prospectively included from October 2021 to March 2023 in Gustave Roussy Cancer Profiling (STING) trial (NCT0493252), in compliance with Helsinki declaration. All patients gave signed informed consent for tumor sampling. Inclusion criteria were: at least one tumor site accessible to pathological sampling, *performans status* ECOG 0-1. Tumor tissues were obtained from Gustave Roussy hospital (primitive lesion: surgery or fine needle cytopuncture; metastases: core needle biopsy or pleural/peritoneal effusions). Based on published protocols, a PDAC-organoid biobank was generated and *in vitro* drug sensibility was estimated, as already described (17).

Organoid polarity was assessed in Collagen-I (Corning, 354236) neutralized with 1.0 M NaOH and 10× MEM (Life Technologies, 21430-02) according to the ratio: 1.0:0.032:0.1 (v/v/v). The concentration was then adjusted to 2 mg/ml with 1× DMEM, and the collagen-I was incubated on ice for 1–1.25 h. The organoids embedded in neutralized collagen-I were added on top of the pre-coated well at a concentration of 30–50 organoids/5 µl (ibidi 8-well chamber). The gel was allowed to polymerize for 45 min at 37°C. Organoids were then cultured in culture medium for up to 6 days.

Microarray

RNA was extracted using the RNeasy minikit (Qiagen, Cat. No. 74104) either from tumors or from PDO after 6 days in Matrigel, after careful washing of matrigel. PDO transcriptomic assays were performed with 3 biological replicates. Frozen tumor samples from 85 PDAC tumors were selected for combined RNA extraction; the presence of neoplastic cells was confirmed by pathological analysis. RNA was extracted for all samples using the RNeasy®

Micro Handbook kit (Qiagen®) and mRNA profiles were obtained using Illumina NovaSeq 6000 Sequencing System after polyA enrichment. Differential expression analysis between cellular groups was performed using the DESeq2 package. Adjusted p-value <0.05 indicates significant differential gene regulation between the TSIP+ and TSIP- PDAC. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) between TSIP+ and TSIP- PDAC was performed using the fgsea package. PDAC tumoral (i.e. classical, basal-like) or stromal components (activated stroma, inflammatory, structural vascular, immune) were assessed (18). Adjusted p-value <0.05 and normalized enrichment scores (NESs) above 2 or below -2 indicate significant differential signaling pathways between TSIP+ and TSIP- tumors.

GeoMx digital spatial profiling

Preparation of slides

Sections from 3 PDAC tumors (containing TSIP) were cut at 2.5µm and baked for 30 minutes at 60°C. The Leica BOND autostainer was employed to perform epitope retrieval (ER2, pH 9, 100°C) for 10 minutes and protein digestion using proteinase K (0.1µg/ml) for 15 minutes. The slides were then stored until required in 1x PBS.

In situ hybridization of RNA-directed DNA oligo probes (Immune Pathways Panel, Nanostring) was performed as per manufacturer's protocol and added to each slide. HybriSlip™ covers were applied prior to overnight incubation at 37°C for at least 16 hours (Thermo fisher). The following day, once coverslips were removed, slides were washed twice with a 1:1 ratio of 100% deionized formamide (Ambion) and 4x SSC (Sigma Aldrich) at 37°C for 25 minutes. Immunofluorescence staining was performed using primary conjugated antibodies (PanCK) and nucleic acid dye (DAPI) for 1 hour as per manufacturers protocol. Slides were then stored at 4°C for up to 6 hours in 2x SSC before being loaded on the GeoMx DSP instrument for region selection and collection (Fig).

Region of interest selection (ROI)

ROIs (max diameter 0.6 mm) were selected on the basis of fluorescently labelled anti-PanCK. TSIP+ region were selected based on PanCK and HES, containing TSIP regions. Intra-tumor regions were tumor regions with tumor cells but no identified TSIP. Four ROI were selected per condition (i.e. 4 ROI for TSIP- tumors containing only intra-tumor ROI, and 8 ROI for TSIP+ tumors containing 4 ROI TSIP and 4 ROI intra-tumor). After ROIs were selected, the GeoMx platform employs an automatically controlled UV laser to illuminate each ROI in turn, specifically cleaving barcodes within the ROI but not in surrounding tissue. A microcapillary

collection system collected the liberated barcodes from each region and plated them into an individual well on a microtiter plate. This process was repeated in turn for each ROI before processing using Nanostring MAX/FLEX nCounter system.

nCounter hybridization assay for photocleaved oligo counting

nCounter readout of GeoMx DSP-collected probes was performed according to manufacturer's protocol (Nanostring, MAN-10089-08). In brief, samples were resuspended in dH₂O prior overnight incubation (16–24 hours) with hybridisation codes (Hyb Codes) at 65°C and heated lid (70°C). These Hyb Codes include reporter and capture probes to enable formation of a tripartite hybridization complex with the DNO oligo probes in the panel. Samples were then pooled by column into 12-well strip tube before processing on Nanostring's MAX/FLEX system, using the high sensitivity protocol (Nanostring, MAN-10089-08). Data acquisition was performed by using the Nanostring's Digital Analyser (FOV, 555).

GeoMx data analysis

Data analysis was performed by DP. GeoMx DSP analysis suite was used to perform preliminary analysis and QC (quality control) checks on transcriptomic data following quantification by Nanostring's nCounter system. Using the GeoMx data analysis suite, the sequenced data underwent technical QC to exclude regions with suboptimal binding density (<0.1, >2.25) and/or high positive control normalisation (>3). Most correlated normalisation method was used following assessment using custom script. The counts also underwent normalisation with negative probes using the geometric mean. Data analysis was performed to identify differences in gene expression between TSIP+ and TSIP- tumors, and between TSIP+ and intra-tumor ROI. Differential gene expression was performed using the GeoMx analysis suite, which utilises the GeoMxTools R package (tool: 'mixedModelDE' in R package 'lmerTest'). Volcano plots were created using a plugin script, available at: (<https://github.com/NanostringBiostats/DSPPlugins/tree/master/DSPPlugVolcanoPlot>).

Heatmaps were created using negative probe-normalised counts as input to R package, Complexheatmap (RStudio, Boston, MA, USA). The differentially expressed genes (DEGs) screened out with the criteria of log₂ fold change (FC) >±1 and P-value <0.05. GSEA analysis was subsequently performed on DEGs table.

Metabolomic analysis

Starting from PDO well containing 1 million tumor cells, PDO were placed into homogenization tubes (precooled on ice) containing ceramic beads (precellus lysis tubes) with

1 mL of MeOH/Water/Chloro (9/1/1) and stored à -80°C. All PDO lines analyses were performed in biological replicates. All metabolomic experiments were performed the same day, and homogenization tubes were centrifuge 3 times (20s 5000 rpm), then vortexed and centrifuge at 150000 g 10 min at 4°C. Liquid was then let to evaporate (300µL) and 150µL of water was added. Metabolomic dosage was performed using UHPLC1290/QQQ 6470 Agilent for nucleotides and cofactors and UHPLC U3000 Dionex (q-Exactive Orbitrap THERMO Reversed Phase for lipids).

Statistics

All variables were summarized as median [Interquartile range (IQR)] or mean [standard-deviation (SD)] or number and percentages. Quantitative variables were compared using a Student t-test or Wilcoxon test. Qualitative variables were compared using a Fisher exact test or Chi² test depending on applicability conditions. Correlations were estimated using Pearson method. Survival curves were based on Kaplan-Meier non-parametrical estimation. Univariate analysis was performed with Log-rank test. Multivariate analysis was performed with a proportional hazard Cox model, adjusted on sex, age at diagnosis and stage at diagnosis. A p-value <0.05 was considered statistically significant and all the tests were bilateral. Statistical analyses were done using the R-4.0.2 (The R-Core-Team 2020, Vienna, Austria).

Results

Tumour spheres with inverted polarity (TSIP) are identified in PDAC tumors

To investigate whether TSIPs could form in PDAC tumors (primary tumor and metastases), we retrieve cases from our institution whose tissue was available and for whom a contributive molecular profile was available (n=188 patients, of them 113 with molecular profile) (Figure 1A). Based on pathological review, we analysed histological sections (HES) of PDAC to identify TSIP-producing PDAC. TSIP clusters were densely organized tumour cell clusters (defined as aggregates of four or more cells), outlined by Ezrin and CD10, with β -1 integrin within internal membranes (Figure 1B & C). This demonstrated that TSIPs exist in primary tumors of patients, as well as in lymph nodes, peritoneal and liver metastases. When a tumor presented at least one TSIP, it was classified as TSIP positive.

Other invasive histological properties, such as lymphovascular or perinervous invasion, were not different between TSIP producing (TSIP+) tumors and TSIP-non producing tumors (TSIP-). However, serrated lesions were statistically associated with TSIP+ tumors (p=0.001).

Clinical characteristics associated with TSIP+ tumors

A summary of the main patients' characteristics are presented in Table 1. There was no difference between clinical characteristics of patients with TSIP+ tumors and TSIP- tumors (Table 1), except for alcohol and smoking history that was less frequent in TSIP+ patients. Overall, 188 patients were included in the clinical study. Ninety-three patients (49%) were female, and the mean age at diagnosis was 61.7 [SD: 10.1]. Eighty-three patients (45%) exhibited synchronous metastases and 62 metachronous metastases (33%). The main metastatic sites were liver (n=104, 56%), lung (n=33, 18%), peritoneum (n=23, 12%) and nodes (n=24, 13%). Forty patients (39%) received neo-adjuvant systemic therapy and 73 (39%) in case of non-metastatic disease. In the metastatic setting, patients received in first-line treatment FOLFIRINOX regimen (n=94, 64%), gemcitabine-nabpaclitaxel or gemcitabine alone (n=22, 15%), 5-FU alone (n=18, 12%) or other (n=14, 9%). Median number of metastatic treatment lines received was 2 [IQR: 1.0;3.5]. Overall, 113 patients had a molecular profile, performed as routine management. Median OS from metastases diagnosis was 18.2 months (IC95%: 13.8-31.31) in TSIP+ patients and 17.4 months (IC95%: 15.5-19.21), p=0.62 after adjustment on age and the presence of liver metastases (Figure 2A). The median OS from initial diagnosis also not different between TSIP+ and TSIP- patients (Figure 2B) (p=0.57).

Progression-free survival for first-line metastatic treatment was higher in TSIP+ patients than in TSIP- patients (6.8 (IC95%: 6.01-13.0) vs 6.4 months (5.4-7.8), $p=0.02$) (Figure 2C), and observed both when patients received FOLFIRINOX regimen (5-Fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) or Gemcitabine-based regimen (data not shown). Disease-free survival after surgical resection for non-metastatic patients was also not different between groups (Figure 2D).

Genomic alterations in TSIP+ tumors

In order to screen genomic variations associated to histological characterization of TSIP phenotype in PDAC, 113 patients with both histology and molecular profile based on a gene panel available were included (Table 2). Their tumor mutational landscape was representative of PDAC cancer, including mutations in *KRAS* (n=110, 85%), *TP53* (n=97, 75%), *CDKN2A/B* (n=39, 30%) and *SMAD4* (n=11, 8%). *GATA6*, *GNAS* and *CDKN2A* were found significantly more mutated in TSIP+ tumors ($p<0.05$), and *TP53* was more often wild-type in TSIP+ tumors (despite being not statistically significant). These results suggest that TSIP+ PDAC tumor harbored a specific mutational pattern.

Molecular events associated with TSIP-based dissemination

To identify the molecular events associated with TSIP-based dissemination, we compared the transcriptomic profiles of TSIP+ and TSIP- PDAC on a subset of 73 PDAC with a differential gene analysis between 16 TSIP+ and 57 TSIP- PDAC (Figure 3A). Among the top differentially expressed genes, several genes upregulated in *TSIP+* were involved in drug metabolism (*CYP2D7*, *CYP2D6*, *CYP4A43*), cell signaling (*LRP2*, *MMP23*) and metabolic regulation (*FGF21*). At the opposite, genes upregulated in *TSIP-* were mostly involved in chemoresistance (*S100 family*). After gene set enrichment analysis, we observed a significant and exclusive upregulation of metabolic pathways such as fatty acid metabolism or peroxisome pathway in *TSIP+*, and a downregulation of immune pathways (Figure 3B). We assessed whether PDAC tumoral (i.e. classical, basal-like) or stromal components (activated stroma, inflammatory, structural vascular, immune) were different according to the *TSIP* status. We found that TSIP+ tumors were associated with more classical component and less basal component, more inactive stroma, less periostinA subtype, less immune infiltration and less aggressive cancer-

associated fibroblasts (Figure 3C). All these results were independent from the tissue origin (sample localization).

To confirm these results, we performed IHC staining for basal vs classical component, as well as active vs inactive stroma on 13 TSIP+ tumors and 13 TSIP- tumors (Supplementary Figure 1). We confirmed that TSIP tumors were p63 negative (basal-marker), GATA6 and Claudin18 positive (classical-marker), and stroma was alphaSMA positive (inactive stroma-marker) and FAP negative, compared with TSIP- tumors. Periostin staining (aggressive stroma-marker) was positive for 6 tumors in each group. Quantification of those markers is being done.

Apical-out and apical-in organoids harbored different expression profiles but no different drug sensibility profiles

To avoid stroma effect and study drug sensibility, we used an already molecularly-characterized PDO collection. Histology of corresponding tumors was also analysed to verify TSIP+ and TSIP- tumors for 10 tumors. To assess for TSIP+ phenotype in PDO, we performed an invasion assay and compared phenotype in Matrigel and in Collagen. We showed that TSIP+ tumors were rounded in Matrigel and kept that shape in Collagen with inverted polarity both in Matrigel and in Collagen (Figure 4A), as confirmed by immunofluorescence. On the contrary, TSIP- tumors presented with lumen in Matrigel and in Collagen, and presented protrusion in collagen only after 24 days in Collagen. Based on Ezrin stainings on fixed PDO, we confirmed these results (Figure 4B).

Overall, 45 PDO lines were assessed for TSIP phenotype, with 7 TSIP+ lines (16%). A 5-days drug sensibility screen was performed on the five main standard-of-care (SOC) drugs, namely 5-FU, oxaliplatin, irinotecan, gemcitabine and paclitaxel. No difference in sensibility pattern was observed between TSIP+ and TSIP- PDO lines (Figure 4C). We then performed a transcriptomic study based on 7 PDO lines, of them 3 TSIP+ lines. All PDO line RNA was extracted one week after passage, and after 3 medium changes, with biological triplicates lines (Figure 4D). Main differential analysis differences involved peroxidase pathway, as found in the bulk RNAseq experiment (Figure 4E).

Metabolomic study

To further explore transcriptomic differences observed in bulk RNA and in PDO-based RNA experiment, we performed a metabolomic study using PDO (Figure 4F). For that purpose, we retrieved cells from 15 PDO lines (4 replicates per line), of them 5 TSIP+ lines. After metabolites extraction, nucleotides and lipids were analyzed and compared between TSIP+ and TSIP- tumors. Few significantly different metabolites were observed. Some were increased in TSIP+ organoids such as metabolites of the glycolysis pathway (Glycérol tri phosphate: ATPGlyc3P; Ribose 5 phosphate: Ribo5P; ribulose 5 phosphate: Ribu5P), oxydoreduction (flavine mononucleotide: FMN), and nucleobase metabolism (Uridine monophosphate :UMP). On the contrary, amino-acids metabolites (S-Adenosyl methionine: SAM; 3-Methylhistidine: 3-MH; choline) were decreased in TSIP+ PDO.

Spatial transcriptomic revealed no intra-tumor heterogeneity within TSIP+ tumors

To further study TSIP transcriptomic profile, we used spatial transcriptomic (GeoMX®) to study spatial heterogeneity within TSIP+ tumors. Based on three TSIP+ tumors, we designed Regions Of Interest (ROI) on each slide after cytoKératine staining (CK) (Figure 5A). Four ROI were designed to select TSIP (named TSIP ROI) and 4 other ROI on the same slide selected tumor cells without polarity inversion (names intra-tumor ROI) (Figure 5A). A differential analysis was then performed, comparing TSIP ROI and intra-tumor ROI. As shown by Figure 5B, no statistically significant heterogeneity was observed between TSIP and intra-tumor ROI. We concluded that tumor cells with TSIP pattern did not exhibit a specific transcriptomic profile, and that transcriptomic pattern was quite homogeneous among all tumor regions of TSIP tumors.

Discussion

In summary, our investigation of specimens from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients has revealed the presence of tumor spheres with inverted polarity (TSIP). These structures, previously described as a collective and epithelial mode of cancer dissemination in colorectal cancer, exhibit distinctive features. Notably, these TSIP, which act as malignant metastatic intermediates in CRC, maintain a robust epithelial architecture and an inverted apico-basolateral polarity during their dissemination. This phenomenon has been confirmed by the identification of TSIPs in metastatic sites in PDAC. Additionally, our findings align with studies in breast or pancreatic carcinomas, demonstrating the formation of distant metastases without the involvement of epithelial-mesenchymal transition (EMT) activation (4,18). This challenges the widely accepted consensus that carcinoma progression is characterized by the loss of epithelial architecture and polarity (20,21). While the normal apico-basolateral polarity remains intact at the cellular level, the organization of neoplastic tissue undergoes significant alterations. Notably, the protective apical pole comes into contact with patient fluids and tissues, potentially facilitating TSIP survival in various environments and aiding in immune evasion (22).

Interestingly, TSIPs employ a distinctive mode of collective invasion that does not rely on the formation of adhesion-based protrusions (23,24) but instead resembles the propulsive amoeboid migration of single cells. This novel process has been recently documented and called "collective-amoeboid migration" (25). However, there were notable differences in the molecular profile between TSIP+ tumors and TSIP- tumors. First, in terms of gene alterations, TSIP+ tumors displayed a higher prevalence of mutations in genes such as *GNAS*, *GATA6*, and *CDKN2A*, while having fewer *TP53* mutations. Importantly, there was no significant difference in *KRAS* mutations between the two groups. These genetic differences may suggest the involvement of a distinct tumorigenic pathway, possibly related to intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) (26). When examining the transcriptomic profile, TSIP+ tumors exhibited a higher representation of classical components and a lower representation of basal components, along with an increased presence of inactive stroma, suggesting a potential role of tumor stroma for TSIP formation. This transcriptomic distinction was corroborated by the analysis of patient-derived organoids, which revealed upregulated metabolic and peroxidase pathways in TSIP+ tumors. Conversely, spatial transcriptomics showed limited intra-tumor heterogeneity among TSIP+ tumors, suggesting a certain degree of uniformity in their gene

expression patterns. However, despite these molecular characteristics that might provide insights into the tendency towards better outcomes for TSIP+ tumors, their biological significance remains unclear. This uncertainty is underscored by the findings of our metabolomic study, which did not reveal meaningful differences between TSIP+ and TSIP- tumors.

In this study, we employed innovative methods and utilized organoids to bridge our understanding gained from histological and molecular profiling, with the aim of studying the biology of TSIP+ tumors. Over the past decade, organoids have proven to be crucial tools for studying cancers biology, and studies are evaluating their potential to orient patients' treatments (27,28). These cancers avatars have primarily been used to uncover the critical genetic mutations linked to cell transformation and cancer progression, as well as to investigate how cancer cells respond to and resist various therapeutic agents (28–31). In our approach, we incorporated patient-derived organoids (PDO) into three-dimensional collagen-I hydrogels, which serve as established surrogate of the peritumoral stroma (32,33). This technique allowed us to observe that organoids faithfully replicate the primary features of tumor architecture observed in patient histological specimens and initial tissue samples. Notably, organoids accurately capture the apico-basolateral polarity and its orientation within the tumor, providing unique and relevant morpho-dynamic insights into how tumor cells behave in a three-dimensional context. Interestingly, contrary to findings in colorectal cancer (CRC), our study did not reveal a distinct chemoresistance profile specific to TSIP+ tumors when using organoid models.

We acknowledge some limitations to our study, considering the limited biological consequences of our work. To improve the significance of our results and to uncover differences gene program expression between TSIP+ tumors and TSIP- tumors, a better stratification of TSIP-forming tumors could be proposed, with a ranking between low-TSIP+ tumors and High-TSIP+ tumors along with a stratification between primary and metastatic lesions. Moreover, the detection protocol could be improved with serial slices and 3D reconstruction. We also did not address whether TSIP in PDAC are actual tumor intermediates and how much TSIP are needed to drive aggressive or less aggressive tumor progression.

In conclusion, cancer development and progression has traditionally been considered as a consequence of the aberrant reactivation of normal developmental processes. However, the findings regarding TSIP biology suggest that neoplastic epithelial cells might employ

distinct strategies to spread and colonize various parts of the body. Whether this unique morpho-onco-genetic program translates into significant clinical implications remains uncertain and could depend on the specific clinical context or conditions. Notably, in the case PDAC, the presence of TSIPs has not been linked to any clear therapeutic action or strategy. This suggests that while TSIPs may represent a novel aspect of cancer biology, their practical significance in terms of treatment approaches for PDAC has yet to be established.

References

1. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 12 mai 2011;364(19):1817-25.
2. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 31 oct 2013;369(18):1691-703.
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. janv 2022;72(1):7-33.
4. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 26 nov 2015;527(7579):525-30.
5. Barresi V, Bonetti LR, Bettelli S. KRAS, NRAS, BRAF mutations and high counts of poorly differentiated clusters of neoplastic cells in colorectal cancer: observational analysis of 175 cases. *Pathology*. oct 2015;47(6):551-6.
6. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol*. sept 2015;30(9):1059-67.
7. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, et al. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. sept 2006;131(3):830-40.
8. Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z, Ewald AJ. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*. 19 déc 2013;155(7):1639-51.
9. Commander R, Wei C, Sharma A, Mouw JK, Burton LJ, Summerbell E, et al. Subpopulation targeting of pyruvate dehydrogenase and GLUT1 decouples metabolic heterogeneity during collective cancer cell invasion. *Nat Commun*. 24 mars 2020;11(1):1533.
10. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juill 2009;10(7):445-57.
11. Iliina O, Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci*. 15 sept 2009;122(Pt 18):3203-8.
12. Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. août 2012;14(8):777-83.
13. Iliina O, Gritsenko PG, Syga S, Lippoldt J, La Porta CAM, Chepizhko O, et al. Cell-cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*. sept 2020;22(9):1103-15.
14. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating Tumor Cell Clusters are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*. 28 août 2014;158(5):1110-22.
15. Zajac O, Raingeaud J, Libanje F, Lefebvre C, Sabino D, Martins I, et al. Tumour spheres with inverted polarity drive the formation of peritoneal metastases in patients with hypermethylated colorectal carcinomas. *Nature Cell Biology*. mars 2018;20(3):296-306.
16. Canet-Jourdan C, Pagès DL, Nguyen-Vigouroux C, Cartry J, Zajac O, Desterke C, et al. Patient-derived organoids identify an apico-basolateral polarity switch associated with survival in colorectal cancer. *J Cell Sci*. 15 juill 2022;135(14):jcs259256.
17. Cartry J, Bedja S, Boilève A, Mathieu JRR, Gontran E, Annereau M, et al. Implementing patient derived organoids in functional precision medicine for patients with advanced colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 25 oct 2023;42(1):281.
18. Puleo F, Nicolle R, Blum Y, Cros J, Marisa L, Demetter P, et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology*. déc 2018;155(6):1999-2013.e3.
19. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. 26 nov 2015;527(7579):472-6.
20. Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*. 7 juill 2000;289(5476):113-6.
21. Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, et al. Deregulation of Scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell*. 28 nov 2008;135(5):865-78.
22. Ashley N, Ouaret D, Bodmer WF. Cellular polarity modulates drug resistance in primary colorectal cancers via orientation of the multidrug resistance protein ABCB1. *J Pathol*. mars 2019;247(3):293-304.

23. Wang X, He L, Wu YI, Hahn KM, Montell DJ. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol.* juin 2010;12(6):591-7.
24. Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* 1 avr 2002;62(7):2125-30.
25. Pagès DL, Dornier E, de Seze J, Gontran E, Maitra A, Maciejewski A, et al. Cell clusters adopt a collective amoeboid mode of migration in confined nonadhesive environments. *Sci Adv.* 30 sept 2022;8(39):eabp8416.
26. Hosoda W, Sasaki E, Murakami Y, Yamao K, Shimizu Y, Yatabe Y. GNAS mutation is a frequent event in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms and associated adenocarcinomas. *Virchows Arch.* juin 2015;466(6):665-74.
27. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science.* 23 2018;359(6378):920-6.
28. Tiriác H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1112-29.
29. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science.* 7 juin 2019;364(6444):952-5.
30. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell.* 1 mars 2018;22(3):454-467.e6.
31. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc.* sept 2016;11(9):1724-43.
32. Doyle AD, Carvajal N, Jin A, Matsumoto K, Yamada KM. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun.* 9 nov 2015;6(1):8720.
33. Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology.* 1 déc 2011;21(12):736-44.

Figure legends

Figure 1. Study description and flow-chart

1A. Study flow chart

1B. HES and IHC stainings of representative TSIP+ and TSIP- tumors

1C. Zoom on a TSIP with HES staining, apical markers Ezrin and CD10 and basolateral marker IntegrinB1.

Figure 2. Clinical impact of TSIP+ phenotype

2A. Overall survival from metastases diagnosis between patients with TSIP+ and TSIP- tumors

2B. Overall survival from initial diagnosis between patients with TSIP+ and TSIP- tumors

2C. Progression-free survival in first metastatic line between patients with TSIP+ and TSIP- tumors

2C. Disease-free survival between patients with TSIP+ and TSIP- tumors at non metastatic stage

Figure 3. Gene expression analysis

3A. Heatmap of differential gene expression profile between TSIP+ and TSIP- tumors

3B. Gene Set Enrichment analysis analysis

3C. Puleo analyses : basal component, Tcell, monocytes, exocrine component, periostin, and inactive stroma.

Figure 4. Organoids from TSIP+ tumors retains specific properties

4A. Organoids from TSIP+ tumors retain inverted polarity in Matrigel and collagen (PGR3), contrary to TSIP- (PGR4). IF: Red: Phalloidin, Green : Ezrin, Blue : DAPI.

4B. Ezrin IHC of fixed organoids show inverted polarity for TSIP+ PDO

4C. Drug sensibility profile between TSIP+ and TSIP- PDO for 5 standard-of-care drugs.

4D. Differential gene expression analysis between TSIP+ and TSIP- PDO.

4E. Significantly different metabolites between TSIP+ and TSIP- PDO (n=15 lines, 4 replicates per line), normalized on TSIP- PDO.

Figure 5. Spatial transcriptomic to elucidate intra-tumor heterogeneity

5A. Representative view of stained slide of a TSIP+ tumor with the 4 TSIP+ ROI and the 4 intra-tumor ROI.

5B. Volcano plot of the differential analysis between TSIP+ and intra-tumor ROI

Supplementary figure 1

IHC stainings of a representative TSIP+ tumor (GATA6 and Claudin 18 : classical marker, S100A2 and p63: basal marker, aSMA: inactive stroma marker, periostin: aggressive stromal marker, CDX2: digestive cells marker, FAP: stromal marker))

Table 1: Clinical characteristics of patients

Variable	TSIP		Total	Test	
	TSIP-	TSIP+			
Sexe	Female	62 (45.59%)	31 (59.62%)	93 (49.47%)	p value: 0.0853
	Male	74 (54.41%)	21 (40.38%)	95 (50.53%)	
Age at diagnosis	Med [IQR]	63.0 [54.8;69.0]	61.5 [55.0;71.2]	62.5 [55.0;69.0]	p value: 0.7712
Thrombosis history	No	85 (70.83%)	28 (58.33%)	113 (67.26%)	p value: 0.1188
	Yes	35 (29.17%)	20 (41.67%)	55 (32.74%)	
	NA	16	4	20	
Alcohol history	No	58 (59.79%)	31 (77.50%)	89 (64.96%)	p value: 0.0483
	Yes	39 (40.21%)	9 (22.50%)	48 (35.04%)	
	NA	39	12	51	
Smoking history	No	60 (54.55%)	30 (75.00%)	90 (60.00%)	p value: 0.0237
	Yes	50 (45.45%)	10 (25.00%)	60 (40.00%)	
	NA	26	12	38	
Previous malignancy	No	101 (74.26%)	33 (63.46%)	134 (71.28%)	p value: 0.1431
	Yes	35 (25.74%)	19 (36.54%)	54 (28.72%)	
Performans status at diagnosis	>=2	4 (3.85%)	1 (2.33%)	5 (3.40%)	p value: 1.0000
	0-1	100 (96.15%)	42 (97.67%)	142 (96.60%)	
	NA	32	9	41	
Lesion size (mm)	Mean (std)	29.6 (13.6)	35.8 (18.7)	31.4 (15.4)	p value: 0.5100
Lesion resectability for non-metastatic patients	Borderline	11 (15.28%)	6 (22.22%)	17 (17.17%)	p value: 0.4007
	Locally advanced	9 (12.50%)	1 (3.70%)	10 (10.10%)	
	Resectable	52 (72.22%)	20 (74.07%)	72 (72.73%)	
Primitive lesion localization	Body	19 (16.52%)	8 (17.39%)	27 (16.77%)	p value: 0.4654
	Crochet	10 (8.70%)	2 (4.35%)	12 (7.45%)	
	Head	64 (55.65%)	22 (47.83%)	86 (53.42%)	
	Isthmus	3 (2.61%)	3 (6.52%)	6 (3.73%)	
	Tail	19 (16.52%)	11 (23.91%)	30 (18.63%)	

Table 1: Clinical characteristics of patients

Variable	TSIP		Total	Test	
	TSIP-	TSIP+			
Stage at diagnosis	Metastatic	59 (43.70%)	24 (47.06%)	83 (44.62%)	p value: 0.6813
	Non metastatic	76 (56.30%)	27 (52.94%)	103 (55.38%)	
	NA	1	1	2	
Modality of relapse for non metastatic patients	Localized	6 (8.33%)	2 (7.69%)	8 (8.16%)	p value: 0.8734
	Metastatic	44 (61.11%)	18 (69.23%)	62 (63.27%)	
	no relapse	22 (30.56%)	6 (23.08%)	28 (28.57%)	
Liver metastatis at metastatic diagnosis	No	56 (41.48%)	26 (50.98%)	82 (44.09%)	p value: 0.2444
	Yes	79 (58.52%)	25 (49.02%)	104 (55.91%)	
Node metastatis at metastatic diagnosis	No	118 (87.41%)	44 (86.27%)	162 (87.10%)	p value: 0.8371
	Yes	17 (12.59%)	7 (13.73%)	24 (12.90%)	
Lung metastatis at metastatic diagnosis	No	113 (83.70%)	40 (78.43%)	153 (82.26%)	p value: 0.4011
	Yes	22 (16.30%)	11 (21.57%)	33 (17.74%)	
Adrenal metastatis at metastatic diagnosis	No	132 (97.78%)	49 (96.08%)	181 (97.31%)	p value: 0.6160
	Yes	3 (2.22%)	2 (3.92%)	5 (2.69%)	
Peritoneal metastatis at metastatic diagnosis	No	121 (89.63%)	42 (82.35%)	163 (87.63%)	p value: 0.1787
	Yes	14 (10.37%)	9 (17.65%)	23 (12.37%)	
Bone metastatis at metastatic diagnosis	No	132 (97.78%)	50 (98.04%)	182 (97.85%)	p value: 1.0000
	Yes	3 (2.22%)	1 (1.96%)	4 (2.15%)	
Ovarian metastatis at metastatic diagnosis	No	135 (100.00%)	49 (96.08%)	184 (98.92%)	p value: 0.0741
	Yes	0 (0%)	2 (3.92%)	2 (1.08%)	
Other metastatis at metastatic diagnosis	No	132 (97.78%)	49 (96.08%)	181 (97.31%)	p value: 0.6160
	Yes	3 (2.22%)	2 (3.92%)	5 (2.69%)	

Table 2: Main molecular alterations

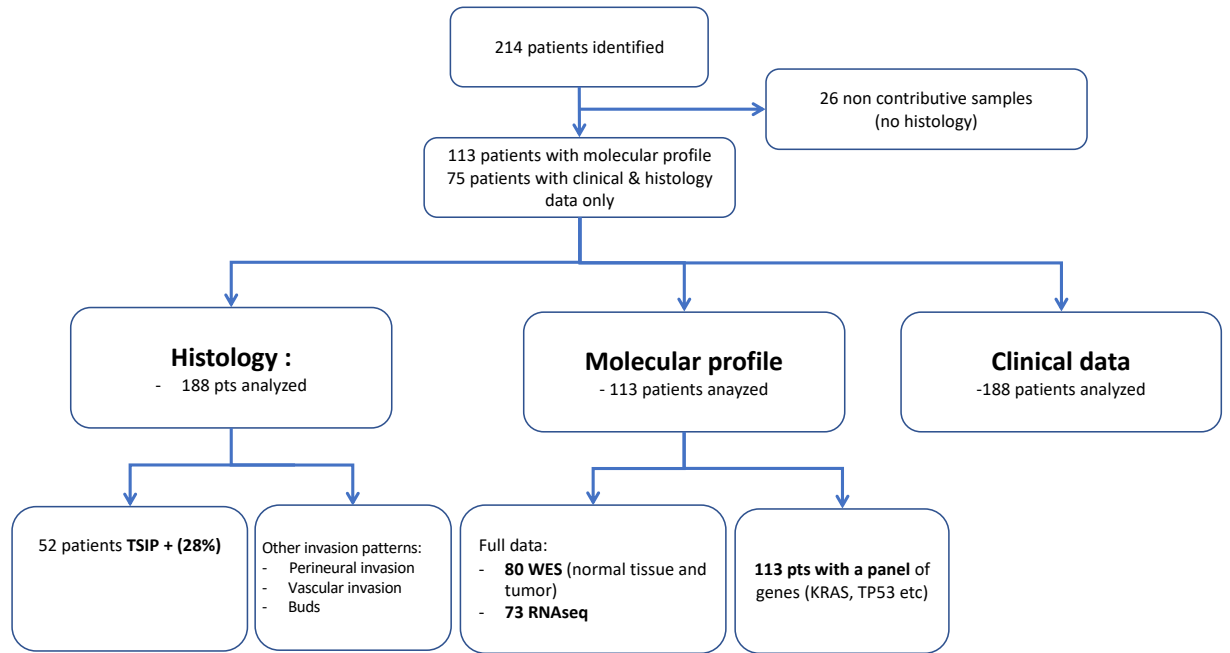
Variable		TSIP		Total	test
		TSIP-	TSIP+		
ARID1A	Mutant	5 (5.15%)	3 (9.09%)	8 (6.15%)	p value: 0.4177
	Wild-type	92 (94.85%)	30 (90.91%)	122 (93.85%)	
ATM	Mutant	3 (3.09%)	1 (3.03%)	4 (3.08%)	p value: 1.0000
	Wild-type	94 (96.91%)	32 (96.97%)	126 (96.92%)	
	NA	39	19	58	
BRCA1/2	Mutant	5 (5.15%)	2 (6.06%)	7 (5.38%)	p value: 1.0000
	Wild-type	92 (94.85%)	31 (93.94%)	123 (94.62%)	
CCND1/2/3	Mutant	7 (7.22%)	0 (0%)	7 (5.38%)	p value: 0.1902
	Wild-type	90 (92.78%)	33 (100.00%)	123 (94.62%)	
CDKN2A	Mutant	23 (23.71%)	16 (48.48%)	39 (30.00%)	p value: 0.0073
	Wild-type	74 (76.29%)	17 (51.52%)	91 (70.00%)	
EGFR	Mutant	1 (1.03%)	0 (0%)	1 (0.77%)	p value: 1.0000
	Wild-type	96 (98.97%)	33 (100.00%)	129 (99.23%)	
FGFR	Mutant	7 (7.22%)	0 (0%)	7 (5.38%)	p value: 0.1902
	Wild-type	90 (92.78%)	33 (100.00%)	123 (94.62%)	
GNAS	Mutant	0 (0%)	3 (9.09%)	3 (2.31%)	p value: 0.0153
	Wild-type	97 (100.00%)	30 (90.91%)	127 (97.69%)	
HER2	Mutant	5 (5.15%)	0 (0%)	5 (3.85%)	p value: 0.3286
	Wild-type	92 (94.85%)	33 (100.00%)	125 (96.15%)	
KRAS	Mutant	82 (84.54%)	28 (84.85%)	110 (84.62%)	p value: 0.9657
	Wild-type	15 (15.46%)	5 (15.15%)	20 (15.38%)	
MTAP	Mutant	10 (10.31%)	4 (12.12%)	14 (10.77%)	p value: 0.7518
	Wild-type	87 (89.69%)	29 (87.88%)	116 (89.23%)	
MYC	Mutant	4 (4.12%)	2 (6.06%)	6 (4.62%)	

Table 2: Main molecular alterations

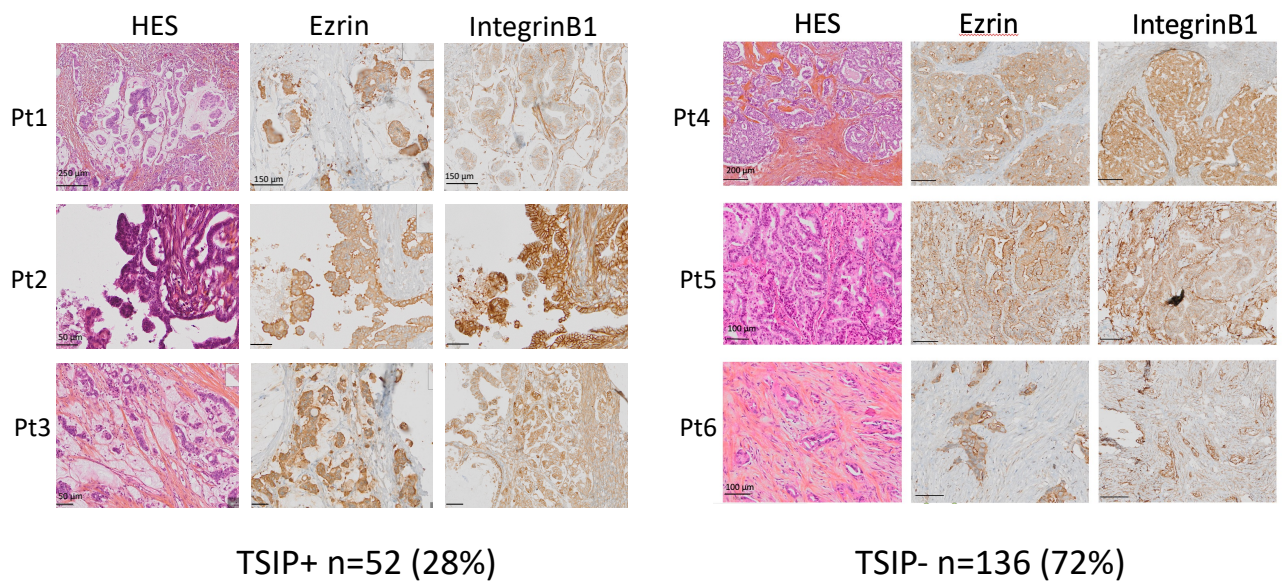
Variable	TSIP		Total	test	
	TSIP-	TSIP+			
PTEN	Wild-type	93 (95.88%)	31 (93.94%)	124 (95.38%)	p value: 0.6434
	Mutant	0 (0%)	2 (6.06%)	2 (1.54%)	p value: 0.0630
	Wild-type	97 (100.00%)	31 (93.94%)	128 (98.46%)	
SMAD4	Mutant	10 (10.31%)	1 (3.03%)	11 (8.46%)	p value: 0.2882
	Wild-type	87 (89.69%)	32 (96.97%)	119 (91.54%)	
TP53	Mutant	76 (78.35%)	21 (63.64%)	97 (74.62%)	p value: 0.0934
	Wild-type	21 (21.65%)	12 (36.36%)	33 (25.38%)	
GATA6	Mutant	0 (0%)	3 (9.09%)	3 (2.31%)	p value: 0.0153
	Wild-type	97 (100.00%)	30 (90.91%)	127 (97.69%)	
KRAS subtype	G12A	8 (8.25%)	4 (12.12%)	12 (9.23%)	p value: 0.1782
	G12C	4 (4.12%)	2 (6.06%)	6 (4.62%)	
	G12D	37 (38.14%)	7 (21.21%)	44 (33.85%)	
	G12L	1 (1.03%)	1 (3.03%)	2 (1.54%)	
	G12R	10 (10.31%)	1 (3.03%)	11 (8.46%)	
	G12V	17 (17.53%)	10 (30.30%)	27 (20.77%)	
	Other	1 (1.03%)	1 (3.03%)	2 (1.54%)	
	Q61H	3 (3.09%)	0 (0%)	3 (2.31%)	
	Q61R	1 (1.03%)	2 (6.06%)	3 (2.31%)	
	Wild-type	15 (15.46%)	5 (15.15%)	20 (15.38%)	
Microsatellite status	MSI	1 (2.56%)	1 (7.69%)	2 (3.85%)	p value: 0.4412
	MSS	38 (97.44%)	12 (92.31%)	50 (96.15%)	
Tumoral mutational burden	Mean (std)	2.1 (1.9)	5.9 (9.2)	3.0 (5.1)	p value: 0.3881

Figure 1

A



B



C

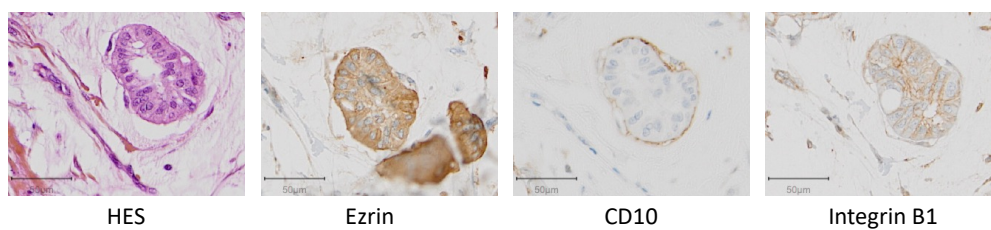


Figure 2

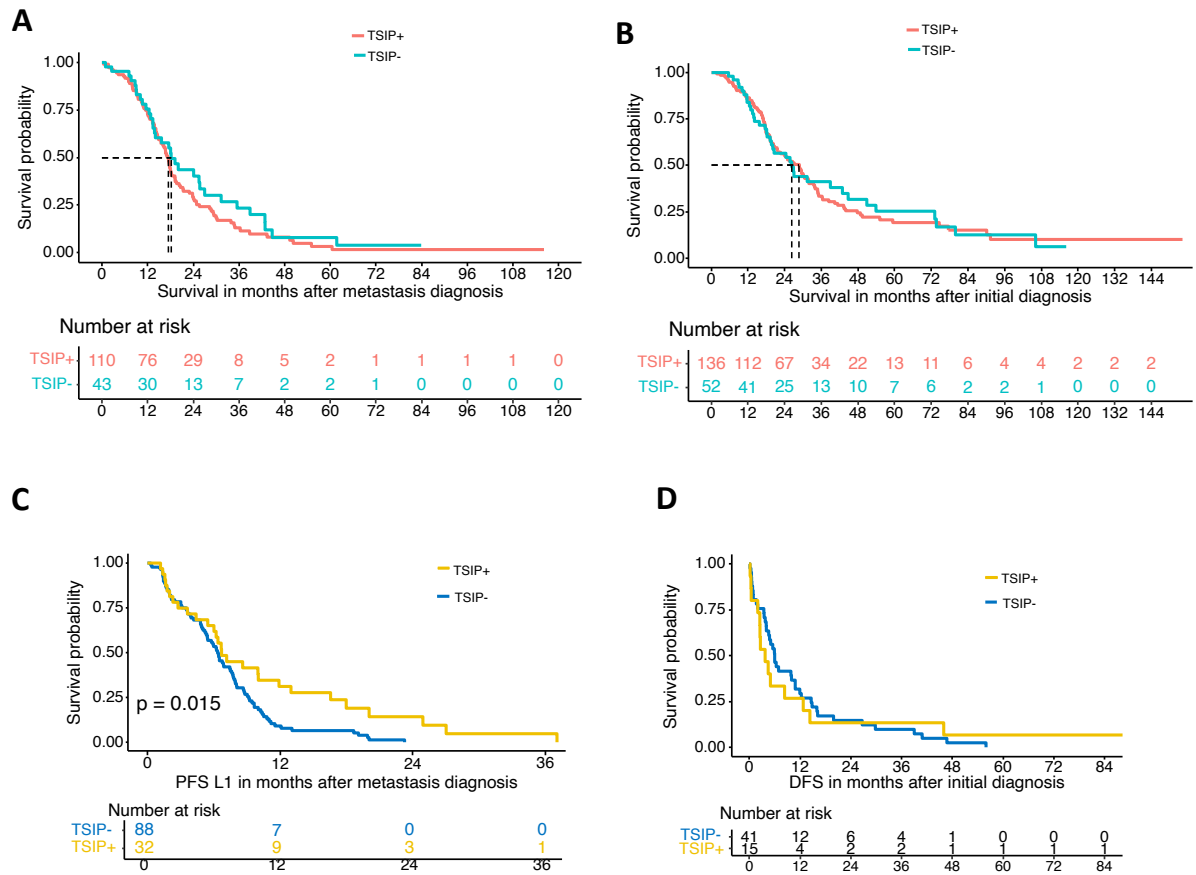


Figure 3

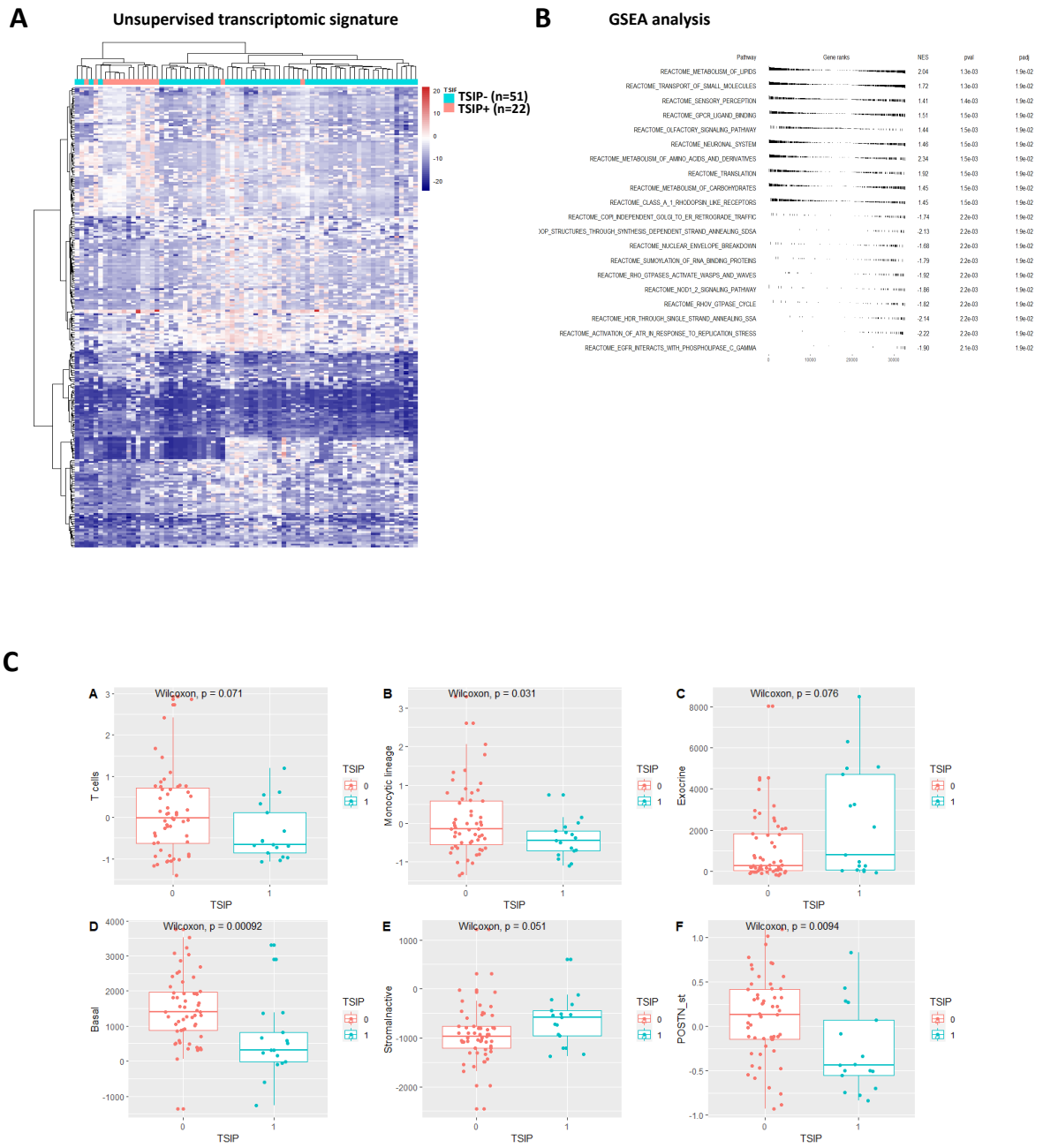


Figure 4

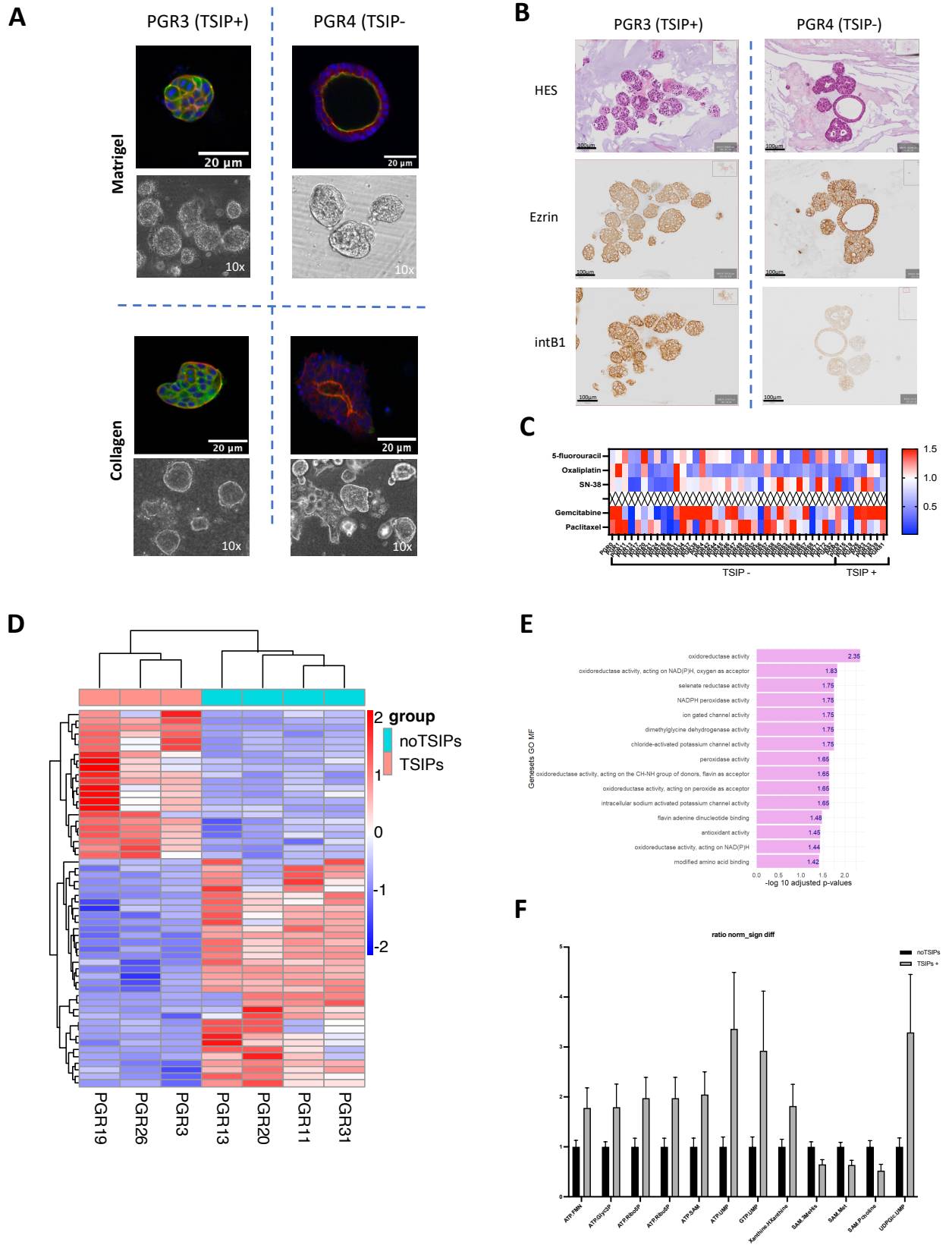
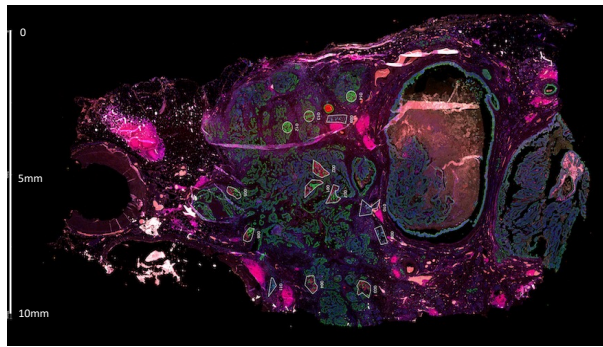
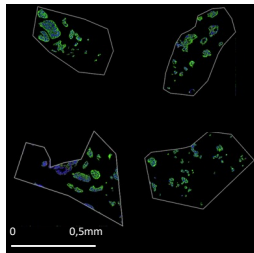


Figure 5

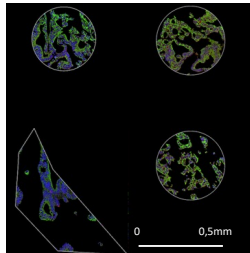
A



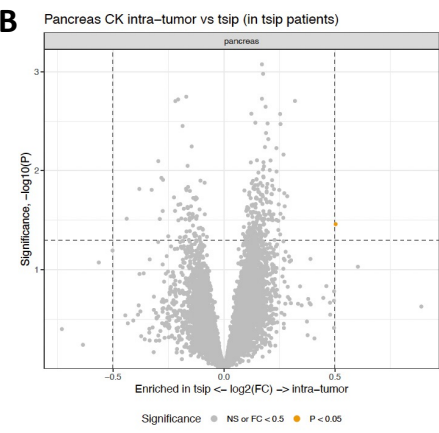
ROI TSIP



ROI intra-tumor



B



DISCUSSION

I. ÉTUDE DU PHENOTYPE INVASIF DES PDAC

La partie fondamentale de ce projet visait à étudier la dissémination métastatique dans les PDAC, par analogie avec de précédentes études dans le CRC (273,274). Nous avons pu mettre en évidence des sphères tumorales à polarité inversée (TSIP) dans des tumeurs de patients atteints de PDAC. Ces structures, précédemment décrites comme un mode collectif et épithélial de dissémination du cancer dans le cancer colorectal (CRC), présentent des caractéristiques distinctives. Notamment, ces TSIP, qui agissent en tant qu'intermédiaires malins métastatiques dans le CRC, maintiennent une architecture épithéliale robuste et une polarité apico-basolatérale inversée lors de leur dissémination (273). Dans le PDAC, nous avons pu montrer que les TSIP pouvaient se trouver à la fois au sein du primitif ou des métastases.

En cherchant à déterminer le programme moléculaire responsable de la formation de TSIP, nous avons démontré l'existence de différences notables entre les tumeurs TSIP+ et les tumeurs TSIP-. Tout d'abord, en termes d'altérations géniques, les tumeurs TSIP+ présentaient une prévalence plus élevée de mutations dans des gènes tels que *GNAS*, *GATA6* et *CDKN2A*, tout en ayant moins de mutations *TP53*. En revanche, il n'y avait pas de différence significative dans les mutations *KRAS* entre les deux groupes. Ces différences génétiques pourraient suggérer l'implication d'une voie de cancérogénèse distincte, peut-être liée aux tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP) (48). Lors de l'analyse transcriptomique, les tumeurs TSIP+ présentaient une plus grande représentation des composants classiques et une plus faible représentation des composants basaux, ainsi qu'une présence accrue de stroma inactif, ce qui était corrélé avec la surreprésentation des mutations *GATA6*. À l'inverse, la transcriptomique spatiale a montré une hétérogénéité intra-tumorale limitée parmi les tumeurs TSIP+, suggérant un certain degré d'uniformité dans leurs schémas d'expression génique. Cependant, malgré ces caractéristiques moléculaires qui pourraient expliquer la tendance à une meilleure survie des patients avec une tumeur TSIP+, leur signification biologique reste incertaine. Cette incertitude est soulignée par les résultats de notre étude métabolomique, qui n'a pas révélé de différences significatives entre les tumeurs TSIP+ et TSIP-.

Dans cette étude, nous avons utilisé les organoïdes pour étudier les tumeurs TSIP+. Au cours de la dernière décennie, les organoïdes se sont avérés être des outils cruciaux pour l'étude de la biologie des cancers. Ces avatars des tumeurs ont largement été utilisés pour élucider les mutations génétiques fondatrices de la transformation cellulaire menant à la survenue et à la progression du cancer (198,213,217,275). Dans notre approche, nous avons cultivé les organoïdes dans des hydrogels de collagène-I en trois dimensions, qui servent de substituts prouvés du stroma péri-tumoral (276,277). Cette technique nous a permis d'observer que les organoïdes reproduisent fidèlement les caractéristiques principales de l'architecture tumorale observée dans les spécimens histologiques des patients et les échantillons de tissu initial. Notamment, les organoïdes capturent avec précision la polarité apico-basolatérale et son orientation au sein de la tumeur, fournissant des informations morpho-dynamiques uniques et pertinentes sur le comportement des cellules tumorales dans un contexte tridimensionnel. En revanche, à l'opposé des résultats obtenus dans le CRC, notre étude n'a pas révélé de profil de chimiorésistance spécifique aux tumeurs TSIP+ lors de tests de sensibilité au médicament avec les organoïdes (274). L'impact du stroma qui n'est pas étudié avec notre méthode de culture d'organoïdes pourrait être la cause de cette absence de profil spécifique *in vitro*.

Les TSIP utilisent un mode distinct d'invasion collective qui ne dépend pas de la formation de protrusions basées sur l'adhérence (278,279), mais qui ressemble plutôt à la migration amiboïde propulsive de cellules individuelles. Ce nouveau processus a récemment été documenté dans des amas et a été baptisé "migration collective amiboïde" (280). Les modèles d'organoïdes nous servent à présent à l'étude de la migration collective amiboïde, à la suite d'un travail publié récemment par le laboratoire (280). Ainsi, lorsque les organoïdes sont mis dans des canaux spécifiquement créés pour confiner les groupes de cellules cohésives et les filmer, il est possible d'étudier leur phénotype et leur vitesse de migration (

Figure 34).

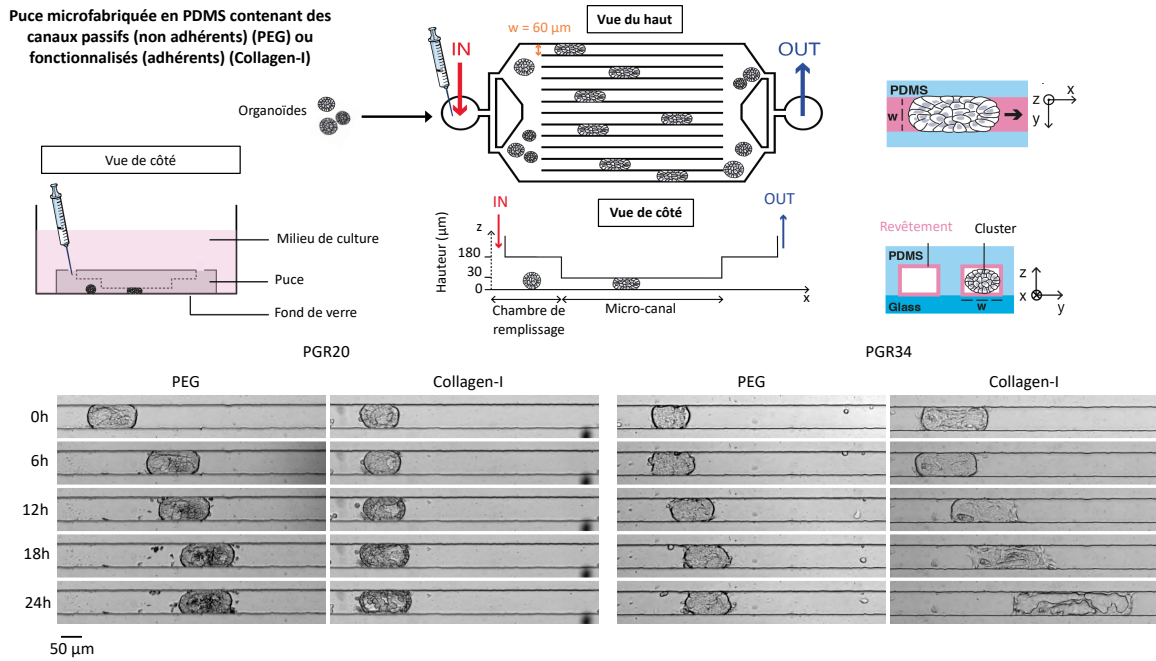


Figure 34: Principe des puces avec des canaux adhérents ou non pour étudier la migration collective des cellules (Données de Clémence Nguyen-Vigouroux et (280)).

Pour conclure cette partie fondamentale, les découvertes concernant la biologie des TSIP suggèrent que les cellules épithéliales cancéreuses pourraient utiliser des stratégies diverses pour se propager et coloniser diverses parties du corps, que ce soit via la TEM, la migration périnerveuse ou les TSIP. Néanmoins, les implications biologiques et cliniques de la présence de TSIP dans le PDAC restent incertaines. Notamment, la présence de TSIP n'a pas été associée à un phénotype clair ni à une différence de pronostic. Nous avons donc décidé de ne pas réaliser d'expériences *in vivo* dans des modèles murins pour prouver le rôle d'intermédiaire tumoral des TSIP dans le PDAC. Ainsi, bien que les TSIP puissent représenter un aspect nouveau de la biologie du cancer, leur signification biologico-clinique reste à établir dans le PDAC.

II. MEDECINE DE PRECISION FONCTIONNELLE ET CANCER DU PANCREAS

Notre cohorte d'organoïdes de PDAC est l'une des plus importantes cohortes d'organoïdes issus de patients métastatiques pré-traités, particulièrement bien caractérisée avec 34 patients évaluable d'un point de vue réponse clinique. Cette cohorte est représentative de la population hospitalière de patients avec un PDAC, que ce soit en terme de caractéristiques cliniques, de profil mutationnel ou de type de traitements reçus hormis une survie globale assez longue après le diagnostic de métastases (plus de 18 mois), avec un biais de sélection lié à un recrutement de patients en centre expert.

A. ORGANOÏDES ET MEDECINE DE PRECISION

À notre connaissance, deux essais cliniques interventionnels de médecine de précision fonctionnelle (MPF) sur des tumeurs solides ont été publiés: SENSOR (263) and Tumorspheres Colrec (264) (tous les deux dans le cancer colorectal). L'essai SENSOR a été négatif, avec seulement six patients traités et sans bénéfice clinique. L'essai de phase II Tumorspheres Colrec a été positif. Néanmoins, le choix du critère de jugement principal (plus de 50% de patients non progressifs à deux mois) était discutable, et la survie sans progression (SSP) médiane de 62 jours était clairement inférieure à la SSP observée en 3^{ème} ligne sous tipiracil-trifluridine bevacizumab, standard actuel de traitement dans cette indication (281). Une autre étude (254) a rapporté deux patients atteints d'un cancer du côlon métastatique réfractaire et traités avec un hit selon le chimiogramme, un progressif sous vandetanib et l'autre en réponse partielle sous gemcitabine. Ces études aux résultats mitigés mettent en évidence le fait que les stratégies de MPF doivent encore être améliorées pour bénéficier aux patients atteints de cancer.

Tableau 7: Principales études corrélant la réponse des PDO avec la clinique pour le CRC et le PDAC

Etude	Type d'étude	Contexte	Cohorte chimiogramme		Corrélation à la réponse clinique		Type d'échantillon	Taux de prise des PDO	Délai du chimiogramme	Nombre de médicaments	Mesure	Evaluation clinique	Ref
			Patients	PDOS	Patients	PDOS							
CRC													
Jensen, 2023 (2cureX)	Phase II non-comparative	mCRC, 3ème ligne	82	44	34	34	Biopsie	54%	7,3 semaines	8 à 12	Imagerie et prolifération	DCR à 2 mois	(283)
Ooft, 2019, TUMOROID	Cohorte observationnelle	mCRC	29	35	29	35	Biopsie	63%	4 semaines	3	ATP-Bio	DCR	(250)
Chalabi, 2020, NICHE	Cohorte observationnelle	CRC (stade 3)	11	12	11	12	Chirurgie	NA	NA	NA	INF-gamma	NA	(284)
Ganesh, 2019	Cohorte observationnelle	CRC	14	23	9	17	Biopsie (rectosigmoïdoscopie)	77%	NA	2	ATP-Bio	NA	(255)
Yao, 2020, CinClare	Cohorte observationnelle	Rectum	80	80	80	80	Biopsie (rectosigmoïdoscopie)	85,00%	NA	NA	Taille et ATP-Bio	NA	(251)
Narasimhan, 2020, APOLLO	Cohorte prospective	mCRC (péritonéal)	15	17	9	9	Chirurgie	68%	3-6 semaines	35 au max	ATP-Bio	DCR	(254)
Vlachogiannis, 2018	Cohorte observationnelle	mCRC, mGC	15	19	15	19	Biopsie	NA	NA	55	ATP-Bio	ORR	(285)
Cartry, 2023	Cohorte observationnelle	CRC	25	25	8	8	Chirurgie, Biopsie	62%	6 semaines	25	ATP-Bio	ORR	(290)
PDAC													
Tiriac, 2018	Cohorte observationnelle	PDAC	57	66	9	12	Chirurgie>Biopsie>Autopsie	72% (biopsie), 78% (chir)	NA	5	ATP bio	ORR, PFS rarement	(213)
Sharick, 2020	Cohorte observationnelle	PDAC & sein	24	24	10	10	Chirurgie	64%	NA	4	NA	NA	(244)
Tiriac 2018	Cohorte observationnelle	PDAC	37	38	Na	NA	Cytoponction	66%	NA	NA	NA	NA	(286)
Driehuis 2019	Cohorte observationnelle	PDAC	30	30	4	4	Chirurgie>>Biopsie	62% (chir), 31% (biopsie)	NA	76	ATP-Bio	ORR	(210)
Demyan 2022	Cohorte observationnelle	PDAC, néoadj	94	115	11	11	Cytoponction/chirurgie	71-76% chir, 56-53% biopsie	NA	5	ATP-Bio	Ca19.9, Recist	(258)
Grossman 2022	Cohorte observationnelle	PDAC	12	13	11	11	Cytoponction	17%	14 semaines	<10	ATP-Bio	Recist	(260)
Seppala, 2022	Cohorte observationnelle	PDAC	18	18	12	12	Cytoponction	65%	NA	5	ATP-Bio	NA	(268)
Boilève, 2023	Cohorte observationnelle	PDAC	54	54	34	34	Biopsie, Effusions, Chirurgie	62%	6,7 semaines	25	ATP-Bio	DCR, PFS, OS, GMI	

PDAC : cancer du pancréas, CRC : cancer colorectal, GC : cancer de l'estomac, GOCPDO : organoïdes, DCR ; taux de contrôle de la maladie, OS :survie globale, PFS : survie sans progression, ORR : taux de réponse de la maladie

1. Challenges et critères essentiels pour la MPF

En se basant sur les publications rapportées dans la littérature et sur nos propres travaux, quatre critères essentiels sont indispensables pour une mise en œuvre clinique (282) :

- L'origine et qualité du matériel tumoral
- Le délai d'obtention du chimiogramme
- Le nombre de médicaments testés
- Une méthodologie robuste et standardisé

a) Origine du matériel tumoral

Le taux de prise pour la génération de PDO est généralement plus élevé lorsque les échantillons tumoraux utilisés comportent un grand nombre de cellules tumorales (chirurgies ou épanchements). Par exemple, Narasimhan et al. ont rapporté un taux de prise de PDO de 68% dans l'étude APOLLO en utilisant des fragments de pièces opératoires de carcinose péritonéale de CRC (287). Dans le PDAC, le taux de prise est aussi plus important quand l'échantillon tumoral initial est issu de pièces de résection (210). Cependant, pour être déployé à grande échelle, l'établissement des PDO doit être réalisable à partir de biopsies à l'aiguille, notamment pour s'adresser à la majorité des patients avec une tumeur métastatique pour qui la chirurgie n'est pas en général un élément justifié de prise en charge. Cette procédure a été utilisée dans les études SENSOR et Tumorspheres Colrec, avec des taux de réussite de PDO respectivement de 57% et 54%. Dans le PDAC, les taux de prise sont variables en partant de biopsies à variant de 17% à 72% (213,260,286,288,289). Notre taux de prise de 62% global (60% pour les biopsies hépatiques) se situe dans la fourchette haute de ces taux de prise. Un autre paramètre clé est le nombre de carottes de biopsies réalisées. Ainsi, en se basant sur notre expérience au laboratoire (données non publiées), passer de 2 à 5-6 carottes de biopsies a permis de majorer le taux de prise de 61,5% (290) à plus de 75%.

Dans les précédentes études, seule la cellularité de la biopsie tumorale a été associée au taux d'établissement des PDOs (285), tandis que le site de prélèvement tissulaire (primitif versus métastase) et les traitements préalables n'étaient pas différents entre les patients dont les PDO ont été établis ou non (244,250). Une étude dans le PDAC a réalisé des PDO avant ou après radiothérapie locale, et montré qu'une radiothérapie antérieure était un facteur de

moindre établissement des organoïdes (258). Dans nos études, le nombre de lignes de chimiothérapies antérieures était un facteur négatif dans le cadre du CRC, non retrouvé dans le PDAC. Dans notre étude sur le PDAC, le site de métastase semble être un facteur prédictif d'établissement de la lignée (entre foie et autre site, avec un taux de prise de 60% vs 38%). Ce facteur n'a pas pu être comparé avec d'autres études, la majorité des études ayant développé leur collection biologique sur des primitifs de PDAC. Par ailleurs, nous rapportons également que le fait que la tumeur soit en progression (et pas stable ou en réponse) au moment de la biopsie est un facteur prédictif pour l'établissement de la lignée. Cette dernière donnée est importante car elle limite la temporalité de réalisation des organoïdes à une progression tumorale. Réaliser des organoïdes lors d'une période de stabilité tumorale sous traitement pour « gagner du temps » avant la progression ne serait pas finalement adéquat en raison d'un taux de prise trop faible. Ces résultats qui paraissent robustes pour le PDAC incitent à évaluer cette problématique dans d'autres localisations.

En plus de la quantité de matériel tumoral, la qualité est cruciale pour le succès de la génération des PDO et l'expérience des équipes de radiologie interventionnelle est cruciale pour sélectionner les zones tumorales les plus vivaces possibles. Nous avons observé dans l'étude pilote CRC une forte hétérogénéité dans le pourcentage de cellules tumorales au niveau inter et intra-patient, qui peut s'expliquer par un échantillonnage aléatoire ou une nécrose induite par des lignes de traitement antérieures (290). Des corrélations entre la cellularité et le taux de réussite ont également été observées dans les études TUMOROID (291) et SENSOR.

b) Délai d'obtention du chimiogramme

Le délai d'obtention du chimiogramme pour fournir les résultats au médecin est un facteur clé pour rendre utilisable en clinique le résultat du chimiogramme. Ce paramètre dépend de plusieurs variables, notamment du taux de croissance des PDO et du nombre de médicaments testés. Notre étude démontre la faisabilité de tester jusqu'à 25 médicaments en moins de 10 semaines (en moyenne 6,8 semaines dans notre étude). La majorité des études dans le PDAC ne décrivent pas de délai pour réaliser le test de médicaments, en partie car ces études n'ont pas été faites pour une implémentation dans la pratique clinique mais plutôt à visée de recherche pure (210,213,260). Les seules études rapportant le délai sont l'essai HOPE

(260) avec une médiane de plus de 13 semaines et l'étude de Tiriac (213) avec quelques patients dont le chimiogramme a été obtenu en 6 semaines (délai médian non détaillé). Si l'on compare aux études faites dans le CRC, nos résultats sont cohérents avec ceux des études SENSOR et Tumorspheres Colrec, avec des délais médians pour générer les données de sensibilité aux médicaments respectivement de 10 semaines (263) et 4,8 semaines (264).

Ce délai dépend de plusieurs variables, notamment du nombre initial de cellules tumorales collectées, du taux de croissance des PDO et du nombre de médicaments testés. À ce jour, le délai d'obtention des résultats varie entre 4 semaines et plus de 14 semaines (260,283). Compte tenu de ce délai d'obtention du chimiogramme, les patients reçoivent un traitement pendant la période de réalisation de la séquence organoïdes - chimiogramme. La question ouverte est donc l'influence de ce traitement d'intervalle, qui pourrait altérer le pouvoir prédictif des PDO en modifiant directement la tumeur. Le PDO pourrait être représentatif d'un état antérieur de la tumeur et non de l'état actuel au moment de la progression. Il est important de noter que l'étude SENSOR a utilisé des biopsies prélevées avant et après un traitement standard pour démontrer que l'exposition au standard ne modifiait pas la réponse du PDO au test expérimental (263). Sur la base de quatre patients, ils ont pu identifier un schéma de sensibilité aux médicaments similaire (à l'exclusion des médicaments appartenant au traitement standard reçu) et des interférences minimales de ce traitement intervallaire sur la sensibilité des PDO aux médicaments. Néanmoins, un raccourcissement du délai de réalisation du chimiogramme serait bénéfique. À cet égard, les technologies microfluidiques et la miniaturisation, en réduisant le nombre de cellules nécessaires aux tests, émergent actuellement comme de bonnes options pour réduire le délai d'exécution (292,293) (cf partie perspectives).

c) Nombre de traitements testés

L'utilisation d'un large panel de médicaments testés augmente la probabilité d'identifier une option thérapeutique ("hit") adaptée au patient. Cependant, plus on teste de médicaments, plus le nombre de cellules dérivées de patients doit être important, ce qui rallonge le délai pour débiter le chimiogramme. La richesse du panel doit donc être déterminée de manière équilibrée en tenant compte du délai de réalisation du chimiogramme et du taux d'amplification des PDO. Alors que les études SENSOR et Tumorspheres Colrec ont testé respectivement en moyenne 8 et 9 médicaments ou combinaisons de médicaments, notre panel

inclut 25 médicaments. Si l'on rapporte le nombre de médicaments testés au nombre de semaines nécessaires pour obtenir les résultats, notre débit de test des médicaments (25 médicaments en 6,8 semaines) est respectivement 4,4 et 2,2 fois plus élevé que ceux des études SENSOR et Tumorspheres Colrec, délai qui sera encore amélioré par la miniaturisation et la microfluidique.

Une limite des PDO est la nécessité d'utiliser des agents actifs dans les chimiogrammes, ce qui empêche l'utilisation de prodrogues. En effet, les prodrogues doivent être métabolisées en une forme active ou ne sont actives que dans certaines conditions patho/ physiologiques telles que l'hypoxie. De fait, il existe de nombreux agents administrés sous forme de prodrogue (par exemple, la capécitabine en 5-FU(294)). D'autres médicaments peuvent être liés à un transporteur afin de pénétrer efficacement le microenvironnement tumoral (par exemple, nab-paclitaxel/Abraxane® (295)) ou peuvent nécessiter un pH bas, comme les conjugués anticorps-médicament (296). Dans certains cas, des métabolites apparaissant lors de la dégradation de certaines substances peuvent également avoir des propriétés cytotoxiques comme dans le cas de l'irinotecan dégradé en SN-38, qui est la forme active (297). À noter que la pharmacocinétique individuelle du patient peut également jouer un rôle. Le polymorphisme de la cytochrome P450 oxydase présente dans le foie (par exemple, CYP3A4) rend des individus "métaboliseurs plus puissants" pour certaines substances ou le polymorphisme de la dihydropyrimidine deshydrogénase (DPD) peut majorer les toxicités du 5-FU chez les patients(298). Par ailleurs, outre le fait de devoir utiliser la forme active des traitements, certaines molécules ne sont pas stables dans le milieu de culture et donc plus difficilement testables (cyclophosphamide, témozolomide).

d) Une méthodologie robuste et standardisée

Bien que négatifs à l'échelle de la population, une grande majorité des essais de phase 1 et 2 peuvent montrer un pourcentage faible mais significatif de réponse clinique à l'échelle du patient. Cela est conforme à nos résultats montrant que 87% des "hits" n'appartiennent pas aux SOC dans cette indication. Cela suggère qu'il est pertinent de tester des médicaments non spécifiques au PDAC en tant qu'options thérapeutiques supplémentaires pour les patients atteints de PDAC réfractaire et positionne la MPF comme une stratégie permettant d'identifier des thérapies qui peuvent ne pas avoir d'efficacité prouvée à l'échelle de la population, mais

qui représentent néanmoins des opportunités thérapeutiques pertinentes à l'échelle du patient individuel. La mise en place d'une méthodologie robuste pour identifier les vulnérabilités tumorales des patients, basée sur des tests de médicaments *ex vivo*, est un donc un critère essentiel pour la mise en place de la MPF.

Dans notre système, nous avons déterminé les concentrations de médicaments testées pour ne jamais dépasser la concentration maximale qui peut physiologiquement être observée dans le plasma au vu des posologies usuelles, en se basant sur une étude pharmacologique supervisée par le Dr Maxime Annereau. Notre système de score développé par Cartry et al (290) permet pour un PDO donné de classer les 25 médicaments en fonction de leur efficacité *in vitro*. En plus d'une grande reproductibilité technique et biologique (290), nous avons également observé une forte corrélation entre les médicaments de la même famille ou partageant le même mécanisme d'action, ce qui valide les concentrations choisies et le système de score. En revanche, le chimiogramme reste imparfait par rapport aux modalités d'administration des médicaments en clinique : inhibiteurs de tyrosine kinase en général administrés tous les jours +/- période de pause vs chimiothérapies souvent administrées de façon cycliques. Un travail va d'ailleurs débuter en collaboration avec le Dr Maxime Annereau pour doser les molécules testées dans le chimiogramme en condition réelle et évaluer leur dégradation au cours du temps.

Néanmoins, pour être réellement implémentée en clinique la MPF devra probablement plus se standardiser et s'automatiser. Comme l'a décrit Wensink et al (243), les méthodologies actuelles et les systèmes de mesures sont assez variés entre les différentes équipes, et bien que les résultats et conclusions soient comparables, une standardisation sera nécessaire. Par exemple, les milieux de culture des PDO contiennent plusieurs facteurs de croissance et inhibiteurs de petites molécules, qui induisent des modifications phénotypiques par rapport à la tumeur originale et des différences sur la sensibilité aux médicaments (299) ainsi que des différences en terme de transcriptome (300). Par exemple, Hogenson et al. (299) ont démontré que la sensibilité aux médicaments standards (comme 5-FU ou la gemcitabine) était nettement différente pour la même lignée de PDO en fonction de l'utilisation du milieu conditionné par WNT ou du milieu PaTOM (milieu d'organoïdes de tumeur pancréatique sans Wnt3a, R-Spondin et Noggin) (206,210). Une autre étude par Farin et al (301) a également démontré que les conditions de culture standard effacent en grande partie les caractéristiques

spécifiques des tumeurs, y compris les sous-types moléculaires. Ainsi, un milieu de croissance, bien que nécessaire à une expansion efficace des organoïdes, perturbe de façon critique le phénotype des cellules tumorales. Il existe en effet *in vivo* des restrictions en facteurs de la niche et en métabolites, comme cela a été récemment observé dans les modèles de cancer du pancréas (302). A noter que réduction des facteurs de croissance et la culture en présence des CAF dans l'étude de Farin et al (301) suffisent à restaurer les processus de signalisation intrinsèques à la tumeur. Ceci suggère qu'un environnement moins riche permet d'obtenir des modèles plus informatifs.

Cela soulève la question de la fiabilité de la prédiction de la réponse aux médicaments dans les PDO de PDAC qui pourrait dépendre largement du milieu de culture des PDO. Il est donc d'une importance capitale de souligner que les différences techniques intra et inter-laboratoires concernant l'efficacité de la propagation des organoïdes, le traitement, la culture et les délais devront être contournées en utilisant des procédures standardisées et normalisées de qualité clinique validées, voire des produits standardisés provenant de fournisseurs commerciaux. A noter que dans notre système, tous les organoïdes ont été testés dans le même milieu, ce qui permet de s'affranchir en partie de la variabilité liée aux différents milieux. Néanmoins, on peut supposer que certains potentiels hits ne soient pas reconnus comme tels par le chimiogramme à cause de facteurs présents dans le milieu. A ce titre, lors de tests avec MRTX1133 (anti *KRAS*_{G12D}), j'ai montré que la réponse au MRTX1133 était plus profonde dans un milieu sans Intesticult® (comportant notamment du sérum) mais non modifiée par la présence ou non d'EGF. En revanche, les rangs relatifs de sensibilité des différentes tumeurs étaient conservés.

2. Limites de la médecine de précision fonctionnelle

a) Accès aux médicaments et à la technique

Dans l'idée de rendre la MPF accessible au maximum de patients, nous avons inclus dans notre chimiogramme des chimiothérapies et des thérapies ciblées qui peuvent être fournies par les hôpitaux dans le cadre d'essais cliniques ou hors AMM en compassionnel ou dans le cadre de la médecine de ville. Néanmoins, l'accès aux molécules et le financement de ces traitements hors AMM reste un enjeu majeur.

Par ailleurs, la mise en œuvre de la MPF peut également être limitée par son coût qui reste élevé, et son accessibilité. Le coût actuel pour générer un chimiogramme depuis la biopsie est d'environ 2000 euros en incluant le matériel (milieu, matrigel, plastiques), le temps humain et le séquençage des organoïdes (sans compter l'amortissement du matériel). A noter que ce coût sera probablement amené à diminuer avec la généralisation de l'utilisation des organoïdes, comme l'a connu le coût du séquençage au cours des dernières années. De plus, la technologie des organoïdes doit aussi se généraliser, et l'implantation de plateformes organoïdes sur le territoire (au sein du groupement de recherche en organoïdes notamment) permet de diffuser la technologie et d'envisager des essais de MPF multicentriques nationaux.

Cette problématique de coût et d'accessibilité est à mettre en parallèle avec les difficultés d'accès à la médecine moléculaire de précision (303). Dans la plupart des pays et même en France, les technologies biomoléculaires avancées restent largement inaccessibles dans la pratique clinique, sont limitées aux essais cliniques ou à la recherche fondamentale. Des différences existent également en ce qui concerne les initiatives nationales de séquençage ou les comités moléculaires de tumeurs (exemple : SeqOIA/AURAGEN pour certaines indications). Néanmoins, dans la plupart des pathologies, le séquençage reste non remboursé et donc non réalisé. En Europe, les principaux obstacles à l'utilisation de techniques de séquençage de panels de gènes sont le remboursement du test et la disponibilité d'un médicament approprié, que ce soit par le remboursement du traitement, le traitement hors indication ou l'inscription à un essai clinique (303).

Ainsi, que ce soit pour la médecine de précision moléculaire ou, dans le futur, la MPF, le coût et la disponibilité à la fois du traitement et du test sont les deux principaux facteurs limitant l'accès des patients à ces technologies avancées et, par conséquent, aux stratégies anticancéreuses innovantes. En revanche, sous l'angle de la réflexion médico-économique, donner un traitement personnalisé potentiellement plus efficace permettrait de diminuer les coûts liés à un médicament moins adapté (progression de la maladie, symptômes liés à la tumeur) et ses toxicités éventuelles (et éviter de donner un médicament inefficace mais toxique). Ces économies seraient éventuellement mesurables dans une étude coût-efficacité que nous avons prévue dans le cadre des futurs essais ORGANOTREAT.

b) Hétérogénéité du PDAC et résistance

Le PDAC est une maladie hautement hétérogène, tant entre les patients qu'au sein d'une même tumeur. Les tumeurs présentent des mutations génétiques diverses, des profils d'expression des gènes et des phénotypes cellulaires variés. Cette hétérogénéité pose un défi pour la médecine de précision fonctionnelle, car elle nécessite de pouvoir dériver des organoïdes représentatifs de la tumeur pour avoir une pertinence clinique. Par ailleurs, des profils transcriptomiques montrant un enrichissement en sous-type classique des PDO (300) questionnent sur la représentativité réelle des cohortes de PDO.

Par ailleurs, les tumeurs développent souvent une résistance aux traitements au fil du temps en raison de l'évolution clonale des cellules tumorales. La MPF doit tenir compte de la nature dynamique du PDAC et adapter en permanence les stratégies de traitement pour cibler les clones résistants émergents. Un suivi longitudinal des organoïdes serait intéressant pour évaluer l'évolution des chimiogrammes au fur et à mesure des lignes de traitements, comme cela a été fait dans l'étude de Tiriac et al (213) pour un patient, dont la tumeur montrait l'acquisition de mécanismes de résistance aux chimiothérapies de première ligne.

De même, une question persiste sur l'hétérogénéité inter-tumorale entre les différents sites de métastases. Tiriac et al (213) ont pu générer des cultures de PDO à partir de deux métastases hépatiques, une métastase diaphragmatique et d'ascite pour un même patient. Ces quatre cultures présentaient des profils de sensibilité similaires pour trois agents chimiothérapeutiques, mais des sensibilités différentes au 5-FU. Bien que ces quatre PDO présentaient des mutations similaires de l'ADN par WES, ils avaient de légères différences dans les nombres de copies chromosomiques et dans leurs profils transcriptomiques. Ce cas met en évidence la possibilité que les patients métastatiques puissent avoir différents sous-clones tumoraux, et la difficulté de généraliser des résultats d'organoïdes à partir d'un seul site de biopsie. Néanmoins, les réponses dissociées sont assez peu fréquentes en clinique, ce qui laisse supposer que la chimiosensibilité clinique est relativement conservée selon les sites métastatiques.

c) Challenge du traitement des patients

Une autre difficulté provient de la faisabilité à pouvoir réellement traiter et évaluer les patients en clinique, comme le montrent les petites séries de la littérature avec moins de 10-

12 patients évaluable dans la plupart travaux portant sur la corrélation patient-organoïde (243,258,260). Les patients atteints d'un PDAC ont un pronostic sombre et subissent en général une altération de l'état général importante et qui peut être rapide. Passer d'une option thérapeutique potentielle sur le chimiogramme à un traitement réel chez le patient s'avère souvent impossible. De plus, les comorbidités et séquelles de toxicités (neuropathie par exemple), peuvent empêcher certains traitements d'être utilisés. C'est tout l'enjeu du CTB (*chemogram tumor board*) qui s'efforce de prendre en compte à la fois les résultats du chimiogramme mais aussi les données du patients et son historique médical pour prendre la meilleure décision.

Par ailleurs, la majorité des corrélations organoïdes-clinique est faite à l'aide d'un paramètre binaire (taux de réponse objective ou contrôle de la maladie), très imparfait (304). Très peu d'études s'intéressent à des critères plus fin tels que la survie sans progression ou la survie globale. Ainsi, passer de la sensibilité prédite *in vitro* au bénéfice clinique reste un challenge car (i) la valeur prédictive des PDO décroît peut-être avec les lignes de traitement (la tumeur devenant de plus en plus résistante). Ceci a été montré par Cartry et al (290), avec moins de hits retrouvés au-delà de 2 lignes de traitement antérieures. (ii) Le nombre de médicaments potentiels qui pourront être donnés aux patients (25 dans notre chimiogramme) est élevé, leur évaluation clinique est plus complexe qu'en cas de test concernant un seul médicament. (iii) Le système de score peut faussement identifier des hits. Les résultats diffèrent peut-être entre les molécules cytostatiques et les cytotoxiques. (iv) Les combinaisons de molécules n'ont pas été spécifiquement testées dans notre chimiogramme, et considérant que la plupart des schémas de chimiothérapies sont des combinaisons de molécules, l'intégration des combinaisons dans les chimiogramme paraît fondamentale. (v) L'évaluation du bénéfice clinique doit se faire sur des critères plus robustes que le seul taux de réponse objective ou de contrôle de la maladie.

Par ailleurs, le monitoring des toxicités et des traitements réellement reçus par les patients est un autre élément fondamental, non réalisable correctement en rétrospectif et devant faire l'enjeu d'essais prospectifs. En effet, une absence de réponse clinique à un traitement prédit sur le chimiogramme ne reflète pas forcément une absence d'efficacité du traitement mais peut refléter une dose intensité sub-optimale du traitement. Le calcul de la dose-intensité des traitements pour pouvoir réellement évaluer le bénéfice de la stratégie

paraît donc un autre facteur important à prendre en compte.

B. SIGNATURES DE SENSIBILITE A L'AIDE D'ORGANOÏDES

Concernant les résultats du chimiogramme, nous avons pu identifier au moins un hit dans 91 % des cas, et dans 87 % des cas, un des hits n'était pas un traitement standard (SOC). Seuls 56 % des organoïdes présentaient un hit parmi les SOC. Les principales explications de ces résultats pourraient être: (i) population avancée et réfractaire aux SOC, (ii) les SOC ne fonctionnent pas chez tous les patients (résistance primaire). Ces résultats ouvrent donc des perspectives de traitements hors SOC chez ces patients ayant peu d'options thérapeutiques.

Dans notre chimiogramme, les meilleurs résultats ont été obtenus avec la gemcitabine, le docétaxel, la vinorelbine et l'olaparib. La gemcitabine et le docétaxel (taxane de la famille du paclitaxel) sont des SOC, et nous avons retrouvés que les PDO issus de patients non pré-traités par la gemcitabine étaient plus sensible que les autres (non significatif pour les taxanes). En ce qui concerne la vinorelbine, très peu de données sont disponibles, principalement en combinaison, avec peu de réponses objectives (305). Enfin, l'olaparib, inhibiteur de PARP, s'est révélé prometteur, et est actuellement approuvé pour le traitement d'entretien des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique métastatique avec mutation germinale du gène BRCA (306). Ces critères sont très restrictifs, et certaines études décrivent l'efficacité de l'olaparib au-delà de ces indications (comme les profils de déficience en recombinaison homologue (HRD)) (307). Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre une signature HRD et la sensibilité à l'olaparib mais les analyses approfondies de l'exome complet (WES) seront intéressantes.

Cela soulève deux hypothèses : (i) La signature HRD ou les mutations BRCA1/2 ne sont peut-être pas les seuls biomarqueurs prédictifs à l'utilisation de l'olaparib et les PDO pourraient être prédictifs d'une sensibilité au-delà de la signature HRD. Néanmoins, il serait peut-être possible de trouver une signature basée sur la transcriptomique ou sur l'étude du WES pour ces PDO sensibles à l'olaparib. (ii) Les sensibilités observées sur le chimiogramme ne sont pas forcément des sensibilités qui auraient été observées chez le patient, *i.e.* sans traduction clinique. C'est pourquoi il est indispensable de poursuivre les études de MPF afin de pouvoir corrélérer de plus en plus de chimiogrammes à des contextes cliniques. Ces sensibilités « inattendues » sont néanmoins, si elles parviennent à être confirmées en clinique,

un argument en faveur de l'utilisation clinique des organoïdes, qui pourraient démasquer d'éventuelles sensibilités à certains traitements en dehors des standards de traitements ou d'altérations ciblables connues.

L'identification de signatures de sensibilité à certains traitements est à rapprocher d'une stratégie utilisant les modèles pré-cliniques pour générer des signatures moléculaires afin d'identifier les patients présentant un profil particulier de sensibilité à un traitement donné (ou une combinaison) (308,309). En effet, l'une des principales limites à l'utilisation des biopsies pancréatiques réalisées au diagnostic pour la génération de signature ARN est liée à la contamination par du sang, du stroma et parfois par des cellules pancréatiques normales, ce qui complique les analyses moléculaires. Ainsi, l'équipe de N. Dusetti a déterminé un certain nombre de signatures transcriptomiques, en se basant sur l'expression des gènes par les organoïdes en culture, qui permettent également de définir les tumeurs les plus sensibles à différents traitements notamment la gemcitabine, l'oxaliplatine, le 5-FU, l'irinotecan et le docétaxel (308–310). Un des avantages des organoïdes obtenus à partir de biopsies est qu'après quelques jours de culture, les contaminants stromaux, fibrotiques ou sanguins sont éliminés, augmentant ainsi la pureté de la signature ARN qui peut être obtenue en quelques jours seulement. Ainsi, une signature ARN prédictive de la sensibilité à la gemcitabine dans le PDAC a été obtenue en s'appuyant sur des modèles précliniques, des cultures cellulaires primaires dérivées de patients et des xénogreffes, en corrélant les profils transcriptomiques et les analyses de sensibilité à la gemcitabine concomitantes. Une méthodologie statistique sophistiquée a ensuite été utilisée pour dériver de ces modèles précliniques une signature multigénique prédictive de la sensibilité à la gemcitabine (signature GemPred). Cette signature a finalement été testée dans une cohorte monocentrique et validée dans une grande cohorte multicentrique de patients atteints de PDAC résecable. La même approche a été utilisée pour les PDAC métastatiques avec une bonne stratification des patients. La même équipe a alors mis au point une signature de sensibilité au FOLFIRINOX (plus précisément au 5-FU, irinotecan et oxaliplatine) (310). Un essai clinique est en cours (PACsign, NCT05475366) pour évaluer la stratégie d'orientation du traitement de première ligne des patients en fonction de ces signatures prédictives.

Cette approche très prometteuse reste pour l'instant limitée aux molécules de chimiothérapies classiques, et n'offre pas de possibilité d'orientation pour les lignes

ultérieures (i.e. après Folfirinox ou gemcitabine). Une combinaison de cette approche (pour la première ligne) et de l'utilisation des organoïdes (pour les lignes ultérieures) serait envisageable et les deux stratégies ne sont pas antinomiques. L'application de la signature GemPred, 5FUcore, IrinoCore, OxaliCore serait d'ailleurs intéressante sur nos organoïdes et notre cohorte de patients, qui sont en grande majorité pré-traités. Cela permettrait de vérifier si les signatures développées gardent leur pouvoir prédictif avec les lignes de traitements. A noter que les RNAseq des organoïdes sont en cours d'analyse, et que les RNAseq des tumeurs (prélevées au même moment que les biopsies pour organoïdes) sont en cours de séquençage.

C. PERSPECTIVES

1. Dériver des organoïdes de cellules tumorales circulantes

Les PDO peuvent être générés avec une petite quantité de tissu tumoral (par exemple, obtenue par biopsie ou cytoponction pancréatique) (286). Malgré un risque plutôt faible de complications liées à ces procédures (311), la biopsie reste une procédure invasive et n'est donc pas applicable en pratique pour un suivi longitudinal ou pour l'obtention de plusieurs échantillons afin de dériver des PDO à différents temps de la maladie. Par conséquent, une approche alternative consiste à utiliser des cellules tumorales circulantes (CTC) récupérées à partir d'une biopsie liquide. L'isolement des CTC pour générer des PDO dans le PDAC a été montré par Wu et al. (246). Le taux de succès était de 87,8 % (36/41 biopsies liquides), et des tests de chimiosensibilité ont été effectués avec 9 médicaments différents. Cette étude ouvre donc des perspectives intéressantes en termes d'accessibilité au tissu tumoral qui pourrait être fait de façon séquentielle.

2. Améliorer le système de score

Grâce à des cultures en micropuits, il est à présent possible de suivre et d'imager les organoïdes individuellement, pour obtenir une sorte de mesure du « RECIST organoïdes » (312) basée sur la taille des organoïdes, avec le suivi temporel des organoïdes traités par un médicament donné.

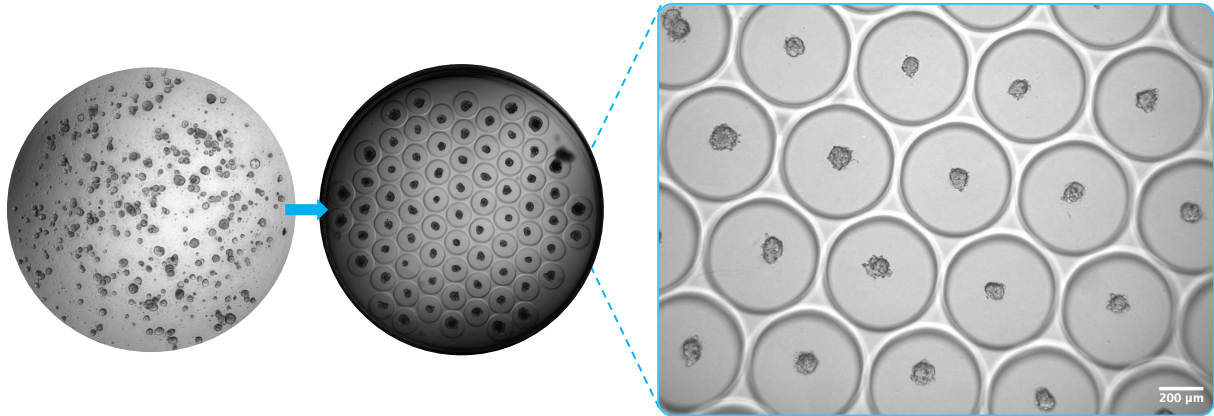


Figure 35: Miniaturisation du chimiogramme en utilisant des micro-puces (Images Emilie Gontran)

De plus, un certain nombre de paramètres (circularité, intensité des pixels etc) peut aussi être analysée par radiomique et intelligence artificielle pour trouver la meilleure signature. Ce travail est en cours dans le laboratoire (Emilie Gontran, Jérôme Cartry, Sabrina Bedja) en collaboration avec Centrale Supélec (Léo Fillioux et Maria Vakalopoulou) pour optimiser le système de score et le corrélér à la réponse des patients. Cette approche pourrait aussi accélérer le délai de rendu des résultats tout en augmentant le nombre de médicaments testés puisqu'un nombre largement inférieur d'organoïdes serait nécessaires pour débiter les tests (moins de 50 000 vs 500 000 environ avec notre méthode actuelle).

3. Intégrer le stroma aux organoïdes

Le microenvironnement tumoral est un facteur déterminant de la tumorigénèse, de la réponse au traitement et du pronostic (313), mais la régulation des phénotypes individuels du cancer par le stroma est encore peu connue. Une étude récente rapporte l'établissement d'une biobanque organoïde-stroma (cocultures issus du même patient), et a montré que les sous-types tumoraux individuels (tels que les classifications moléculaires) sont cryptés par la cellule cancéreuse, mais en dépendant de manière critique du contexte cellulaire et donc du stroma. En effet, la coculture des organoïdes avec des CAF a rétabli les caractéristiques transcriptionnelles observées dans les tumeurs et a affecté la réponse aux médicaments cliniques. Ainsi, les fibroblastes représentent des modulateurs de la réponse au traitement, affectant en fin de compte la survie globale et le pronostic des patients. Il a ainsi été montré que les CAF permettent des conditions de culture des organoïdes qui contiennent des niveaux plus physiologiques de facteurs de croissance et de cytokines (314).

Par ailleurs, une autre piste d'amélioration est de réaliser des cocultures avec des cellules immunitaires, car il est connu que la répression et la reprogrammation du système immunitaire joue un rôle clé dans l'initiation et la progression tumorale (315). Le but de l'immunothérapie est d'ailleurs de réactiver les cellules immunitaires anti-tumorales et de contourner l'échappement immunitaire des tumeurs (316). Ainsi, une des limites majeures des organoïdes pour tester l'effet des immunothérapies est l'absence de cellules immunitaires. Ainsi, des équipes développent des systèmes de culture pour combiner les cellules immunitaires avec les cellules tumorales (317–319). Ces cellules sont conservées et amplifiées au sein des organoïdes tumoraux depuis leur établissement, ou ajoutée de façon exogène (autologues ou allogéniques). Il a ainsi été possible de montrer que les organoïdes peuvent activer *in vitro* les cellules immunitaires et de générer des cellules T cytotoxiques avec un effet antitumoral (320). L'efficacité de cellules CAR-T (*chimeric antigen receptor T-cell*) a pu être également testée sur des modèles d'organoïdes (321). Un projet au laboratoire (conduit par Raphaël Mérand en thèse) est d'interroger la variabilité inter et intra tumorale de l'effet des CAR-T sur les organoïdes.

4. Proposer un essai contrôlé randomisé

L'étude préliminaire d'organoïdes de pancréas et ORGANOTREAT01 nous ont permis d'acquérir les compétences pour gérer le circuit de biopsies, pour l'organisation du *chemogram tumor board* (CTB), pour la génération des organoïdes et les chimiogrammes. L'objectif était de poursuivre avec ORGANOTREAT-02 pancréas, une étude prospective de phase III, multicentrique, française et son objectif principal était donc d'évaluer la supériorité d'une médecine de précision basée sur les organoïdes pour le traitement des patients atteints de PDAC.

Chaque patient aurait été biopsié en début de première ou de deuxième ligne de traitement standard validée. La génération des PDOs, leur culture, leur amplification et les tests de médicaments auraient été réalisés au niveau de la plateforme organoïdes de Gustave Roussy. Un rapport de chimiogramme établi aurait permis au CTB de délivrer une recommandation thérapeutique. Les patients auraient été randomisés après le CTB, s'ils avaient été éligibles à recevoir un traitement, pour recevoir soit ce traitement orienté par les organoïdes, soit un traitement selon le souhait de leur clinicien référent (en aveugle des

recommandations du CTB).

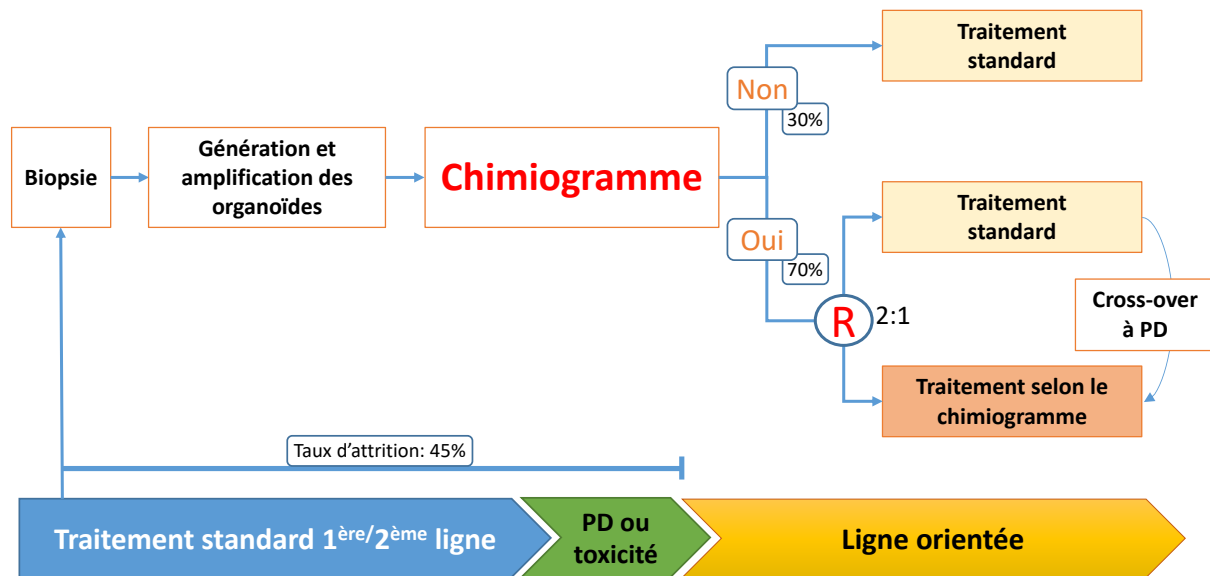


Figure 36: Principe de l'étude ORGANOTREAT-02P

Néanmoins, avant de débiter ORGANOTREAT-02P, où il est prévu d'inclure 265 patients pour en randomiser 132, nous souhaitons améliorer notre méthodologie et notamment notre système de score. Ainsi, nous allons probablement poursuivre les inclusions dans une cohorte PANORAMIC-2, poursuivant la cohorte préliminaire, mais en sélectionnant des patients naïfs de traitement. En effet, nous n'avons pas pu observer de réponse partielle en clinique avec la cohorte PANORAMIC en raison du nombre important de lignes reçues par les patients. Nous souhaiterions donc effectuer une corrélation entre des patients naïfs de traitements (plus de 30% de réponses objectives au FOLFIRINOX attendues (104)) et leurs organoïdes. Les combinaisons de médicaments pourraient être testées directement dans cette nouvelle étude, en éliminant certaines molécules qui n'ont eu aucun effet dans PANORAMIC (ex : cabozantinib). Nous ajouterions à ce projet une collaboration avec la plateforme organoïdes pour faire sur les lignées générées un criblage par CRISPR-Cas9 (bibliothèque génome ciblable ou *druggable genome* de 2000 gènes environ) à corréler avec la chimiosensibilité. La mise au point méthodologique de ce criblage CRISPR-Cas9 a été effectuée sur les lignées d'organoïdes de pancréas à l'aide du protocole d'infection lentivirale que j'ai adapté au laboratoire en 2022.

5. Comparer les tumeurs établies en organoïdes aux non-établies

Lors de chaque biopsie pour organoïdes réalisée dans le cadre du protocole STING organoïdes, la plupart des patients ont également eu une ou deux carottes congelée(s) et incluse(s) en FFPE, ce qui constitue une biobanque unique de matériel tumoral. Ces échantillons tumoraux réalisés au moment même du prélèvement pour organoïdes sont en train d'être caractérisés moléculairement (WES et RNAseq) et histologiquement pour être comparé avec les tumeurs initiales.

L'objectif de ce projet est de comprendre les facteurs biologiques d'établissement des lignées d'organoïdes et les différences entre tumeurs et organoïdes. On rappelle que la survie globale et la survie depuis l'établissement des organoïdes était meilleure quand la lignée n'était pas établie. L'établissement des organoïdes est donc pronostique de la survie des patients. Ainsi, nous pourrions comparer le transcriptome des tumeurs pour lesquelles des PDO ont été établis à celui des tumeurs dont les lignées n'ont pas été établies. Nous comparerons également le transcriptome des organoïdes avec leur tumeur d'origine. Nous pourrions ainsi évaluer la proportion de tumeurs basales ou classiques sur la population globale et sur la population d'organoïdes (322), et vérifier en WES les correspondances tumeur/organoïdes (jusque là faites sur un panel *Foundation Medicine*[®] de 324 oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur). Nous effectuerons aussi une étude immunohistochimique avec le Ki67, marqueur de prolifération, à la fois sur les tumeurs et les organoïdes. Pour évaluer les différences de chimiosensibilité entre organoïdes, nous étudierons également les profils *multi-drug resistance* (MDR) (ex : ABCD1 et P-glycoprotéine Pgp).

Pour conclure, la MPF basée sur les organoïdes est prometteuse mais encore imparfaite, et l'on peut résumer les forces et faiblesses de celle-ci dans la figure suivante (Figure 37).

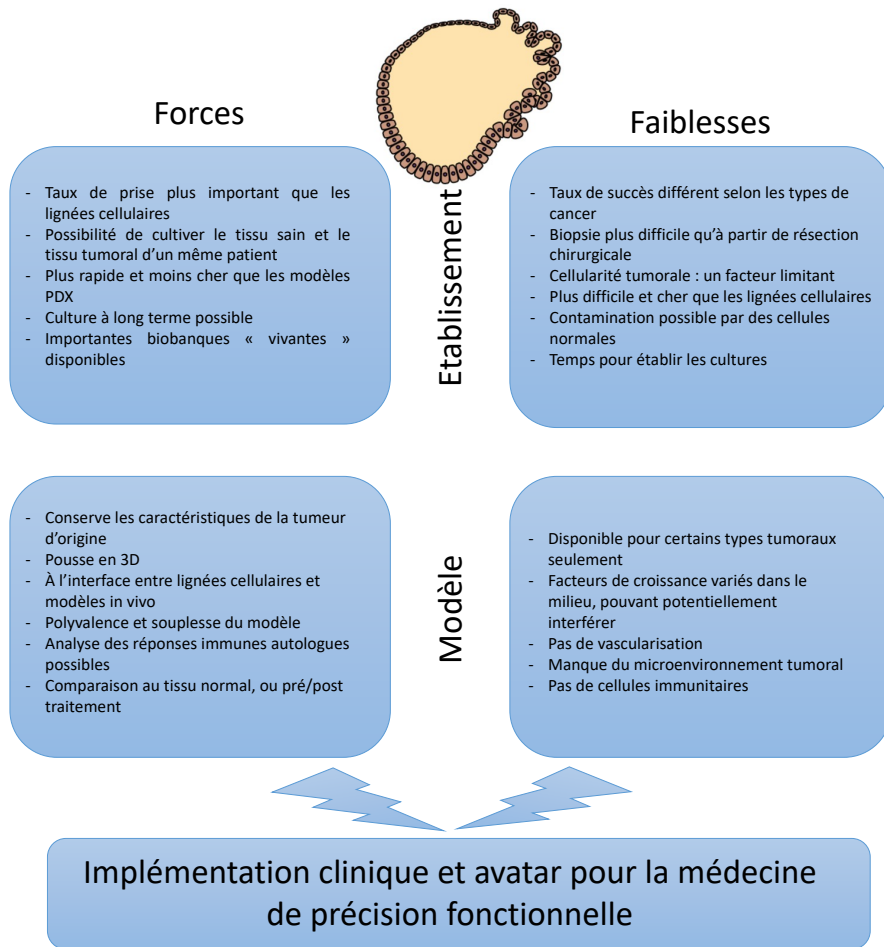


Figure 37: Forces et faiblesses des organoïdes pour la MPF

II. MEDECINE DE PRECISION MOLECULAIRE ET CANCER DU PANCREAS

En 2020, on estimait à près de 20 millions le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde dans le monde (16,323). Des études ont révélé qu'environ un cancer humain sur sept est porteur d'une mutation du gène *KRAS*, ce qui en fait l'un des principaux oncogènes humain (142,324,325). Le ciblage de *KRAS* a été un objectif majeur de la recherche en oncologie au cours des quatre dernières décennies. Les efforts de recherche et de développement se sont intensifiés au cours des dix dernières années, en grande partie grâce à la découverte d'inhibiteurs de *KRAS*_{G12C} (149) qui sont maintenant validés en clinique, le sotorasib (150,152).

Le cancer du pancréas est le cancer qui présente la plus grande prévalence de mutations *KRAS*. Avec l'essor des inhibiteurs de *KRAS*, la connaissance du statut muté ou non, et du type de mutation de cas échéant, va devenir fondamentale. Par ailleurs, nos deux études cliniques (sur la population de patients *KRAS* sauvage, et sur l'impact de *KRAS* G12 vs autres types de *KRAS*), ont montré que la mutation et le type de mutation ont un impact pronostique certain. On peut donc se poser la question d'une évolution de la prise en charge avec un séquençage NGS qui deviendrait systématique pour la prise en charge des patients atteints d'un PDAC.

A. NGS POUR TOUS DANS LE PDAC, UNE EVOLUTION NECESSAIRE ?

1. Impact thérapeutique : cibles actionnables

Plusieurs études de profilage moléculaire ont montré que jusqu'à 25% (de 12 à 25%) des cancers du pancréas présentent des altérations moléculaires actionnables (66–68,326–329), l'actionnabilité étant définie comme une altération moléculaire pour laquelle il existe des preuves cliniques ou précliniques solides d'un bénéfice prédictif d'une thérapie spécifique (dans n'importe quel type de cancer) (330), classées selon la classification ESCAT (330). La plus grande proportion d'altérations actionnables dans le PDAC provient de mutations dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR) (66–68,326–329).

Les bénéfices cliniques des thérapies ciblées pour les patients atteints d'un PDAC commencent à être observés, et des réponses objectives ont été enregistrées avec des thérapies approuvées par la FDA aux États-Unis, telles que les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires pour les tumeurs MSI (dMMR) (121) et les inhibiteurs de TRK pour les tumeurs portant des fusion de gènes *NTRK1*, *NTRK2* et *NTRK3* (331). De plus, plusieurs études, dont la nôtre, montrent que les patients dont les tumeurs pancréatiques portent des mutations *BRAF*_{V600E} bénéficient d'un traitement par une thérapie ciblée RAF-MEK (332) ou dans le cas d'une fusion *FGFR2* par un inhibiteur de *FGFR2* (134). Enfin, les patients atteints de cancers du pancréas mutés *BRCA1* ou *BRCA2* voire *PALB2* sont sensibles aux inhibiteurs de PARP en monothérapie (306). Les principales anomalies moléculaires actionnables sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8: Classification ESCAT (2023) dans le cancer du pancréas

Biomarqueur	Traitement ciblé	Classification ESCAT	Références
<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> germinale	Olaparib	IA	(306)
<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> germinale/somatique	Rucaparib	IB	(333,334)
<i>PALB2</i> germinale/somatique	Rucaparib	IB	(334)
Fusions <i>NTRK</i>	Larotrectinib, entrectinib	IC	(331,335)
MSI élevé	Pembrolizumab	IC	(336)
Fusions <i>RET</i>	Pralseltinib, selpercatinib	IC	(337,338)
Fusions <i>NRG1</i>	Zenocutuzumab	IIB	(339)
<i>KRAS</i> ^{G12C}	Sotorasib, adagrasib	IIB	(150,152)
Fusions <i>FGFR2</i>	Pemigatinib, infigratinib, futibatinib	IIIA	(340–342)
Mutations <i>PIK3CA</i>	Alpelisib, buparlisib	IIIA	(343,344)
<i>BRAF</i> ^{V600E}	Dabrafenib + trametinib, Binimetinib + encorafenib	IIIA	(345,346)
Fusions <i>ALK/ROS1</i>	Crizotinib, ceritinib, alectinib	IIIA	(347–349)
Amplification <i>ERBB2</i>	Trastuzumab + pertuzumab, T-DM1	IIIA	(350,351)

Pishvaian et al (327) ont constaté une meilleure survie globale chez les patients atteints

d'un PDAC porteurs d'une mutation actionnable et ayant reçu le traitement ciblé correspondant, par rapport à ceux porteurs d'une mutation actionnable mais n'ayant pas reçu le traitement correspondant (2,58 ans contre 1,51 an, HR 0,42, p=0,0004). De même, cette survie médiane était meilleure en comparaison avec les patients atteints d'un cancer du pancréas sans mutation actionnable et ayant reçu un traitement standard (2,58 ans contre 1,32 an, HR 0,34, p<0,0001). Il n'y avait pas de différence de survie entre les patients atteints d'un cancer du pancréas porteurs d'une mutation actionnable mais n'ayant pas reçu le traitement correspondant et ceux sans mutation actionnable et ayant reçu le traitement standard (HR 0,82, p=0,10) (Figure 38).

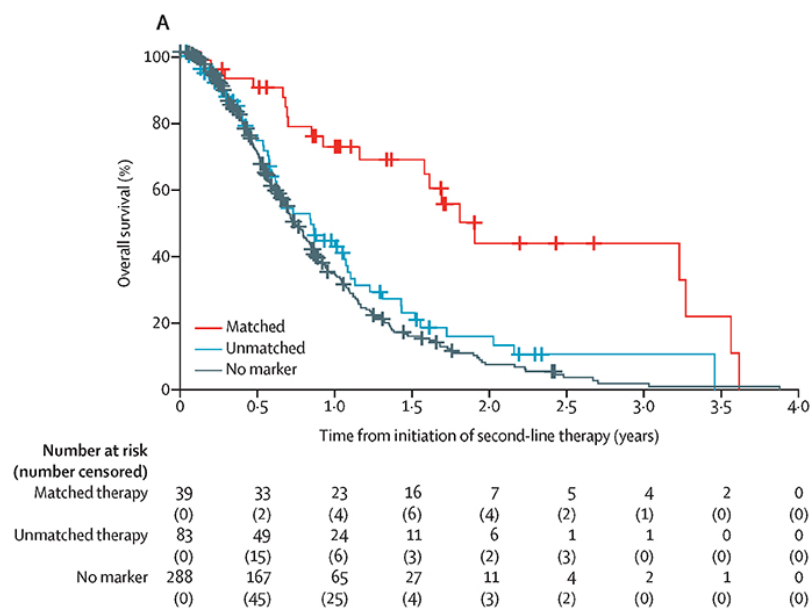


Figure 38: Courbes de Kaplan-Meier de l'étude de Pishvaian, avec en rouge les patients avec altération ciblable ayant reçu le traitement ciblé, en bleu clair les patients avec altération ayant reçu un traitement non ciblé, et en bleu foncé les patients sans altération moléculaire actionnable.

Ainsi, dans cette étude, la survie globale médiane des patients présentant des altérations actionnables et recevant un traitement adapté était supérieure d'un an aux autres. Aucune autre modalité thérapeutique n'a offert un avantage de cette ampleur à cette population de patients et ces résultats encouragent à favoriser l'accès à la médecine de précision pour les patients atteints de PDAC même si cela ne représente qu'environ 20% des patients.

2. Importance du statut *KRAS*

Comme trouvé dans notre étude, les patients présentant une tumeur avec *KRAS* sauvage (non muté) représentent un sous-groupe spécifique de patients d'environ 10 à 15% (270) de tous les PDAC. Ce sous-type est caractérisé par une prévalence plus importante d'altérations actionnables (146,270), environ 35% dans notre étude (Figure 39). Le bénéfice clinique à recevoir un traitement ciblé semblait plus marqué chez les patients *KRAS* sauvage, au moins en terme de growth modulator index (GMI ou rapport des temps sous traitement entre la ligne orientée et la ligne précédente). Cela est peut-être dû aux traitements ciblés plus efficaces pour les altérations de notre cohorte de patients *KRAS* sauvage (*FGFR2*, *BRAF_{V600E}*, *MSI*, *RET*, *NRG1*) par rapport aux *KRAS* mutés (principalement *BRCA* et *KRAS_{G12C}*).

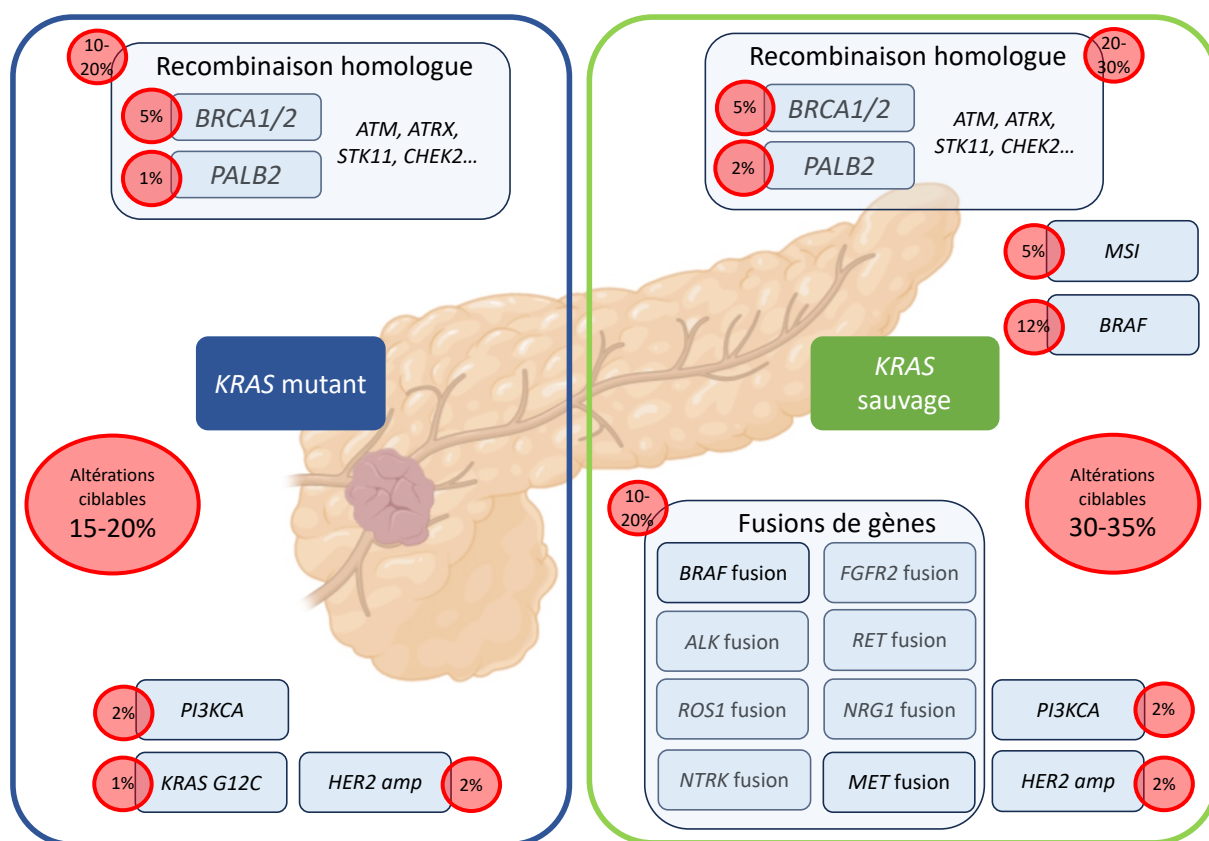


Figure 39: Altérations moléculaires actionnables et pourcentages selon le statut *KRAS* (146,270)

Néanmoins, nous avons montré (sur un effectif limité) que les patients avec tumeur *KRAS* mutée recevant un traitement ciblé n'avaient pas un pronostic différent des patients avec tumeur *KRAS* sauvage. Une stratégie proposée, si le NGS ne pouvait devenir systématique pour tous les patients avec un PDAC, serait de déterminer en premier lieu le statut *KRAS* par séquençage ciblé, puis de réaliser un NGS seulement pour les patients *KRAS* sauvage (270).

Néanmoins, au vu de ces pronostics largement améliorés par les traitements ciblés, que ce soit chez les patients avec tumeur *KRAS* mutée ou sauvage, il semble raisonnable de proposer le NGS à tous les patients atteints d'un PDAC, et ce dès le diagnostic initial.

L'impact d'identifier des tumeurs *KRAS* sauvage va au-delà de la plus grande proportion d'anomalies moléculaires ciblables. En effet, le nimotuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR, a montré dans une étude asiatique son efficacité combiné à la gemcitabine pour les tumeurs *KRAS* sauvage avec un profil de tolérance acceptable (352). Des traitements spécifiques pourraient donc être développés et/ou validés dans ces sous-types de tumeurs.

Par ailleurs, le spectre des anomalies actionnables évolue, et si l'impact de l'actionnabilité de *KRAS*_{G12C} est limité dans le PDAC, le développement des inhibiteurs de *KRAS*_{G12D} (qui concerne 30 à 40% des patients avec un PDAC) ou des inhibiteurs pan-*KRAS* (85 à 90% des PDAC) (154) pourrait conférer une actionnabilité potentielle la quasi-totalité des patients atteints de PDAC. Cela suggère que généraliser le NGS et la détermination du statut *KRAS* pour l'ensemble des patients atteints de PDAC serait utile, ne serait-ce que pour améliorer notre compréhension de la pathologie, et également pour élucider l'impact des différentes mutations *KRAS* à plus grande échelle (272).

3. Importance de la RCP moléculaire

Le nombre croissant d'altérations moléculaires identifiées dans les tumeurs dont le PDAC amplifie le défi de l'interprétation clinique. L'actionnabilité d'une altération moléculaire donnée évolue en fonction des preuves cliniques et précliniques. Pour faciliter l'interprétation de ces données, une RCP moléculaire est à présent organisée dans certains hôpitaux dont Gustave Roussy (353). Cette RCP moléculaire réunit des cliniciens, des généticiens, des pathologistes moléculaires, des conseillers en génétique, des bioinformaticiens voire des chercheurs (354). Elle examine les résultats cliniques, pathologiques et moléculaires de la tumeur du patient et formule des recommandations d'utilisation de traitements ciblés. Elle permet aussi de classer les altérations selon les recommandations de l'ESMO avec la classification ESCAT (330) et d'orienter éventuellement le patient dans des essais de médecine de précision.

Le profilage moléculaire basé sur les tumeurs peut également révéler des variants germinaux fortuits qui sont cliniquement significatifs chez jusqu'à 12% des patients (355,356). Cela peut poser d'importants défis aux médecins qui peuvent ne pas être préparés à gérer ces découvertes fortuites pouvant avoir des implications importantes pour les proches du patient, notamment dans le cancer du pancréas avec l'implication de *BRCA1/2*. Il est donc important que les tests de séquençage de nouvelle génération (NGS) basés sur les tumeurs fournissent un conseil approprié en amont du test pour informer les patients de la possibilité d'identifier une prédisposition héréditaire au cancer. Les RCP moléculaires peuvent ainsi aider à orienter les patients en oncogénétique, pour faire en sorte qu'une mutation potentiellement germinale ne reste pas inexplorée.

4. Vers la biopsie liquide ?

Le séquençage basé sur du tissu tumoral est toujours considéré comme la référence pour le dépistage des anomalies moléculaires actionnables chez les patients atteints de cancer solide (357). Cependant, il existe plusieurs limites, notamment des échecs de dépistage en raison d'une disponibilité limitée des tissus (par exemple après une biopsie) et une incapacité à capturer l'hétérogénéité spatiale et temporelle intra-tumorale, ce qui peut compromettre une sélection précise du traitement. De plus, l'obtention d'une biopsie tumorale est un défi et peut entraîner des événements indésirables qui ne sont pas observés lors d'un simple prélèvement sanguin (358,359).

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) de l'ADN tumoral circulant (ctDNA) est une méthode de plus en plus utilisée pour le profilage moléculaire du cancer et présente plusieurs avantages par rapport au NGS sur biopsies tissulaires : c'est une méthode non invasive, facilement réalisable et répétable, et a priori représentative de l'ensemble du paysage moléculaire de la tumeur du patient (360,361). Le ctDNA peut de plus détecter avec une grande précision les altérations génomiques par rapport à l'analyse tissulaire (360,362).

Un avantage crucial de la biopsie liquide est sa capacité à capturer l'hétérogénéité spatiale et temporelle qui est une caractéristique établie des tumeurs malignes. Le portrait moléculaire obtenu à partir d'une biopsie tumorale est limité à un seul site (l'espace) et figé dans le temps. La biopsie liquide a l'avantage de fournir un accès à un "pool génomique" provenant de plusieurs sites métastatiques chez le patient (360) et donc permettre un

génotypage plus précis chez les patients atteints métastatiques. En effet, la progression tumorale et les lignes de traitements systémiques peuvent favoriser une évolution clonale et une hétérogénéité tumorale accrue, ce qui peut aboutir à une discordance entre les résultats sur tissu archivé et la biopsie liquide. Une des limites de la biopsie liquide est la possibilité de faux négatifs (c'est-à-dire la non-identification d'une altération d'intérêt lorsqu'elle est réellement présente dans la tumeur).

Dans notre étude sur les cancers du pancréas *KRAS* sauvage, nous avons trouvé un enrichissement de la proportion de tumeurs *KRAS* sauvage avec 15% de *KRAS* sauvage par rapport à 10% rapportés dans la littérature (146,270,271). La sensibilité de la biopsie liquide pourrait en partie expliquer ce résultat. En effet, Sugimori et al. (363) ont montré des fluctuations dans la détection de *KRAS* chez les patients atteints de PDAC avancé sous traitement, qui étaient corrélées à un risque accru de progression. Avec une majorité de patients sous traitement dans notre étude, les faux négatifs pour la mutation de *KRAS* pourraient en partie expliquer les 15% de *KRAS* sauvage. Cependant, les résultats de notre étude en vie réelle sont importants car les biopsies liquides représentent une technologie émergente qui permet un échantillonnage en série non invasif du matériel tumoral, qui pourrait faire partie de la prise en charge de la PDAC. Par exemple, la biopsie liquide par Foundation Medicine® peut détecter des altérations ciblables, grâce au NGS pour étudier 324 gènes associés au cancer, dont les variants courts pathogènes (SV), les altérations du nombre de copies (CNA) et certains réarrangements, ainsi que la charge mutationnelle.

En conséquent, la médecine de précision dans le PDAC sera probablement favorisée et aidée par le développement de la biopsie liquide, comme réalisée en « routine » à Gustave Roussy grâce au programme STING.

B. CHALLENGES ET LIMITES DU NGS POUR TOUS DANS LE PDAC

1. Bénéfice limité de la médecine de précision dans la vie réelle

Plusieurs études prospectives ont tenté d'évaluer la faisabilité et les bénéfices cliniques issus de la médecine de précision par NGS chez des patients atteints de diverses tumeurs solides avancées (122–125). Un critère de jugement régulièrement utilisé dans les études de médecine de précision était le *growth modulator index* (GMI), qui correspond au rapport entre

la survie sans progression (SSP) de la ligne de traitement orientée et la SSP de la ligne précédente, calculé pour chaque patient (364). Un GMI $\geq 1,3$ est considéré comme un bénéfice clinique. Dans la plupart des tumeurs, une large gamme d'altérations moléculaires actionnables a été décrite, allant de 25% à plus de 90%. Cependant, seulement 10% à 25% des patients dans ces études ont reçu un traitement moléculairement ciblé (MMT) basé sur la MP (122–127). Dans le PDAC, ce chiffre pouvait même être seulement de 5% (327). De plus, deux essais cliniques randomisés conçus pour évaluer la stratégie de médecine de précision (toutes tumeurs solides confondues) n'ont pas montré d'amélioration de la survie sans progression chez les patients recevant une thérapie moléculaire ciblée (122,123). Dans l'ensemble, ces résultats soulignent la nécessité d'obtenir plus de données sur les bénéfices cliniques de la médecine de précision, en particulier dans le PDAC.

A Gustave Roussy, une étude similaire à l'étude de Pishvaian a été menée par le Dr Tarabay (132) sur les 115 premiers patients du programme MOSCATO (NCT01566019) et, si 28% des patients présentaient une anomalie moléculaire actionnable, 41% de ceux-ci avaient reçu un traitement ciblé (10% de la population initiale). L'amélioration de la survie n'était pas statistiquement significative mais l'effectif de patients traités était limité. Les résultats de la cohorte actuelle (plus de 350 patients) ont été analysés et l'article en cours de rédaction, trouvaient une amélioration de la survie globale chez les patients recevant un traitement ciblé. Par ailleurs, dans des sous-groupes spécifiques (MSI (121) ou FGFR2 (134)), de petites cohortes de patients atteints d'un PDAC et recevant le traitement ciblé montraient une amélioration significative du pronostic. Ainsi, si le PDAC n'est pas la tumeur ayant bénéficié le plus de l'apport de la médecine de précision, il est important de poursuivre les efforts en ce sens pour améliorer le pronostic *a minima* des patients présentant une anomalie moléculaire actionnable, d'autant plus avec la perspective des anti-KRAS en cours de développement.

2. La médecine de précision est-elle possible en France ?

Deux obstacles à la médecine de précision sont principalement observés, l'accès au test (i.e. au séquençage) et l'accès aux médicaments (303).

L'accès au test a été récemment évalué à l'échelle européenne et asiatique (48 pays) (303). Les résultats ont montré que tandis que l'immunohistochimie et les techniques de génétiques de base telles que la FISH (*fluorescence in situ hybridization*), la PCR et l'étude de

l'instabilité des microsatellites étaient largement disponibles dans la pratique clinique courante, l'accès des patients à des technologies plus avancées, y compris les panels de séquençage de nouvelle génération (NGS), était très hétérogène à la fois en Europe et au sein de chaque pays. Les petits panels de NGS (<50 gènes) ou les grands panels (>50 gènes) et la charge mutationnelle tumorale (TMB, *tumor mutational burden*) n'étaient disponibles que de manière occasionnelle dans la pratique courante dans certains pays de l'UE à revenu élevé. Ils étaient limités aux essais cliniques ou à la recherche dans la majorité des pays à faible et moyen revenu. De plus, les technologies les plus récentes telles que le WES, WGS, le RNAseq et les biopsies liquides étaient disponibles uniquement dans le cadre d'essais cliniques ou de recherches dans les pays à revenu élevé, et jamais dans les pays à faible ou moyen revenu (303). Ces résultats sont un signal d'alarme indiquant que les grands panels de NGS, qui sont la porte d'entrée pour l'accès aux thérapies ciblées innovantes, restent largement indisponibles dans la pratique clinique courante, privant ainsi la majorité des patients de la médecine de précision. Les auteurs indiquent que même dans les pays de l'UE à revenu élevé comme la France, et même lorsque certains médicaments ciblés innovants sont disponibles et remboursés par l'assurance maladie obligatoire, ces techniques continuent d'être principalement réservées à la recherche et aux essais cliniques, principalement au sein des grands centres de référence pour le cancer. Cela accroît une inégalité potentielle dans l'accès au traitement pour les patients.

Une autre raison du faible pourcentage de patients traités par thérapies ciblées est liée à la problématique d'accès aux médicaments. En effet, et cela a été illustré récemment dans la presse (365), les autorités françaises, malgré des AMM européennes et des études prouvant leur efficacité clinique, rendent des avis défavorables au remboursement des médicaments innovants. La médecine de précision ne pouvant se concevoir sans un accès aisé aux médicaments associés, il est évident que préconiser un NGS pour tous les patients avec PDAC ne tient que si les patients ont réellement accès aux traitements. A l'heure actuelle, certains essais cliniques permettent de traiter les patients, mais les critères d'inclusion restrictifs de ces essais excluent *de facto* un certain nombre de patients.

CONCLUSION

En conclusion, ce projet de doctorat a conjugué trois approches complémentaires pour améliorer notre compréhension des PDAC. La première partie, fondamentale, a démontré un phénotype particulier dans environ un quart des PDAC, caractérisé par la présence de sphères tumorales à polarité inversée, ou TSIP, qui peut être modélisé et étudié à l'aide d'organoïdes. La deuxième partie, translationnelle, a mis en lumière le potentiel de la médecine de précision fonctionnelle utilisant les organoïdes. Nous avons ainsi démontré la faisabilité et les avantages cliniques et précliniques de l'utilisation des organoïdes pour le développement des médicaments et les tests de sensibilité aux médicaments. Enfin, la troisième partie, plus clinique, s'est intéressée à la médecine de précision moléculaire. L'intégration du profilage moléculaire, y compris le séquençage de nouvelle génération et l'analyse de l'ADN tumoral circulant, a permis une description précise des altérations moléculaires ciblables dans le PDAC. Nos résultats mettent l'accent sur l'hétérogénéité des tumeurs du pancréas, en fonction de la présence d'une mutation *KRAS*, et au sein des tumeurs mutées en fonction du codon muté. En mettant en œuvre la MPF basée sur les organoïdes et la médecine moléculaire, nous espérons pouvoir permettre une médecine personnalisée pour les patients atteints de PDAC. Dans l'ensemble, ce projet de doctorat contribue à faire progresser la MPF et de la médecine de précision moléculaire dans le PDAC, en fournissant des connaissances précieuses pour le développement d'approches thérapeutiques personnalisées et en ouvrant la voie à une amélioration des résultats pour les patients atteints de cette maladie complexe (Figure 40).

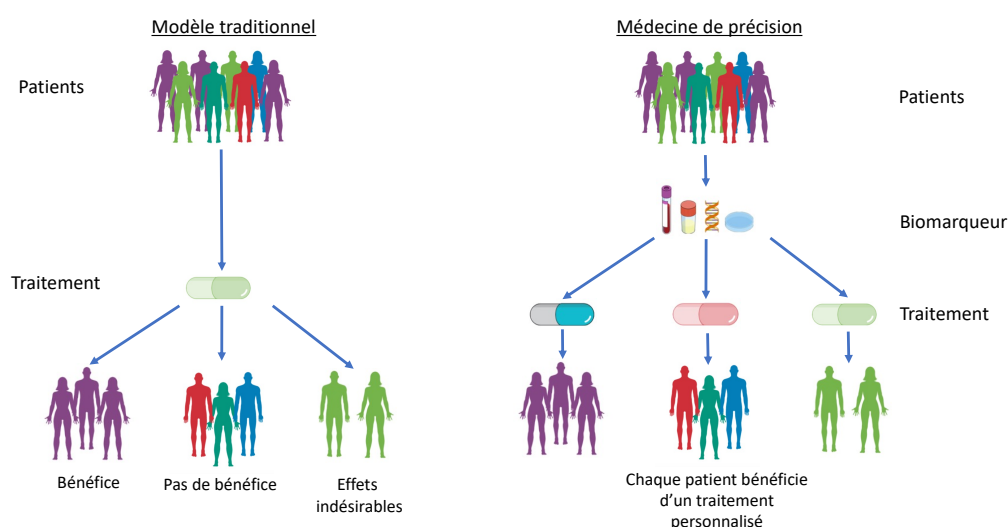


Figure 40: Principe de la médecine de précision

Autres articles

Articles en tant que co-auteur liés à la thématique de la thèse non inclus dans le manuscrit

Recherche fondamentale et translationnelle:

Les organoïdes en oncologie digestive : état des lieux et perspectives.

A Boilève, J Cartry, M Gelli, M Annereau, V Boige, M Ducreux, F Jaulin, D Malka. Hépatogastro & Oncologie Digestive. 2020

Implementing Patient Derived Organoids in functional precision medicine for patients with advanced colorectal cancer

J Cartry, S Bedja, **A Boilève**, J RR Mathieu, M Annereau, B Job, A Mouawia, E Gontran, P Mathias, T De Baère, A Italiano, B Besse, I Sourrouille, M Gelli, MA Bani, P Dartigues, A Hollebecque, C Smolenschi, M Ducreux, D Malka, F Jaulin. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 2023

Spatio-Temporal Analysis of Patient-Derived Organoid Videos Using Deep Learning for the Prediction of Drug Efficacy

L Fillioux, E Gontran, J Cartry, J RR Mathieu, S Bedja, **A. Boilève**, PH Cournède, F Jaulin, Stergios Christodoulidis, M Vakalopoulou. ICCV 2023

Toward the implementation of patient-derived organoids in functional precision medicine

A Boilève, J Cartry, M Ducreux, F Jaulin. Editorial ESMO Open 2024 (en révision à BMC Cancer)

Recherche clinique:

Clinical and molecular features of Early onset Pancreatic Adenocarcinoma

M S Rémond, A Tarabay, Antoine Hollebecque, M Gelli, A Mouawia, E Fernandez de Sevilla, S Coscone, L Tselikas, R Barbe, A Fuera, M Bani, M Deloger, B Besse, T Pudlarz, M Valéry, V Boige, C Smolenschi, M Ducreux, **A Boilève**, En révision à International Journal of Cancer

Pancreatic adenocarcinoma above second line: a retrospective cohort study

A Gueiderikh, A. Tarabay, M. Abdelouahab, C. Smolenschi, M. L. Tanguy, M. Valery, T. Pudlarz, A. Fuerea, D Malka, V. Boige, A. Hollebecque, M. Ducreux, **A Boilève**, En revision à BMC

Precision medicine in pancreatic ductal adenocarcinoma: the impact of target therapies on survival in patients harboring actionable mutations

A Tarabay, **A Boilève**, C Smolenschi, L Antoun, M Valery, A Fuerea, A Perret, P Burtin, H Belkhodja, S Coscone, D Malka, V Boige, A Hollebecque, M Ducreux. Biomedicine. 2023

Efficacy of immune checkpoint inhibitors in microsatellite unstable/mismatch repair-deficient advanced pancreatic adenocarcinoma: an AGEO European Cohort.

Taïeb J, Sayah L, Heinrich K, Kunzmann V, **A Boileve** Cirkel G, Lonardi S, Chibaudel B, Turpin A, Beller T, Hautefeuille V, Vivaldi C, Mazard T, Bauguion L, Niger M, Prager GW, Coutzac C, Benedikt Westphalen C, Auclin E, Pilla L. Eur J Cancer. 2023

Bibliographie

1. Agostini S. Radioanatomie du pancréas. EMC. 2010. (Elsevier Masson SAS, Paris), Radiologie et imagerie médicale - abdominale - digestive, 33-650-A-10, 2010
2. Sauvanet A. Anatomie du pancréas. Imagerie de l'abdomen. Paris: Vilgrain V, Regent D.; 2010 p. 401–404.
3. Sobotta. Atlas d'anatomie humaine. 6^{ème} édition, Lavoisier 2013
4. Auriol J, Marachet M-A, Bournet B, Buscail L, Rousseau H, Otal P. Imagerie radiologique du pancréas: techniques d'exploration, radioanatomie. 2011.
5. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. janv 2020;76(2):182-8.
6. Zallen JA. Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. *Cell*. juin 2007;129(6):1051-63.
7. POCOCK Gillian, D.RICHARDS Christopher. Fonction exocrine du pancréas, *Physiologie humaine : les fondements de la médecine*. 2004.
8. BOULLU Sandrine, BATTEUX Frederic, BRIET Marie. Physiologie pancréatique. *Physiologie humaine*. Ruel-Malmaison : Editions Pradel; 2009.
9. Fischer KL, Jaffredo M, Lang J, Raoux M. Cellules α et β du pancréas. *Med Sci (Paris)*. 2021;37(8-9):752-8.
10. P. Grandval. La physiologie pancréatique : petit rappel de nos années étudiantes. *JFHOD*; 2023.
11. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol*. oct 2016;55(9-10):1158-60.
12. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. janv 2023;73(1):17-48.
13. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 1 juin 2014;74(11):2913-21.
14. Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff AS, Remontet L, et al. Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors. *Rev Epidemiol Sante Publique*. avr 2014;62(2):95-108.
15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
16. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
17. <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie>.
18. Ben-Aharon I, Elkabets M, Pelossof R, Yu KH, Iacubuzio-Donahue CA, Leach SD, et al. Genomic Landscape of Pancreatic Adenocarcinoma in Younger versus Older Patients: Does Age Matter? *Clinical Cancer Research*. 1 avr 2019;25(7):2185-93.
19. Ben-Aharon I, van Laarhoven HWM, Fontana E, Obermannova R, Nilsson M, Lordick F. Early-Onset Cancer in the Gastrointestinal Tract Is on the Rise-Evidence and Implications. *Cancer Discov*. 1 mars 2023;13(3):538-51.

20. Abboud Y, Samaan JS, Oh J, Jiang Y, Randhawa N, Lew D, et al. Increasing Pancreatic Cancer Incidence in Young Women in the United States: A Population-Based Time-Trend Analysis, 2001–2018. *Gastroenterology*. 1 mai 2023;164(6):978-989.e6.
21. Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 21 juill 2021;27(27):4298-321.
22. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*. juill 2008;393(4):535-45.
23. Parkin DM, Boyd L, Walker LC. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 6 déc 2011;105(Suppl 2):S77-81.
24. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 16 févr 2008;371(9612):569-78.
25. Stolzenberg-Solomon RZ, Adams K, Leitzmann M, Schairer C, Michaud DS, Hollenbeck A, et al. Adiposity, physical activity, and pancreatic cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Cohort. *Am J Epidemiol*. 1 mars 2008;167(5):586-97.
26. Rebours V, Gaujoux S, d'Assignies G, Sauvanet A, Ruszniewski P, Lévy P, et al. Obesity and Fatty Pancreatic Infiltration Are Risk Factors for Pancreatic Precancerous Lesions (PanIN). *Clin Cancer Res*. 1 août 2015;21(15):3522-8.
27. van Kruijsdijk RCM, van der Wall E, Visseren FLJ. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. oct 2009;18(10):2569-78.
28. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol*. févr 2015;44(1):186-98.
29. Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges. *Gastroenterology*. mai 2019;156(7):2024-40.
30. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology*. avr 2008;134(4):981-7.
31. Rosato V, Polesel J, Bosetti C, Serraino D, Negri E, La Vecchia C. Population attributable risk for pancreatic cancer in Northern Italy. *Pancreas*. mars 2015;44(2):216-20.
32. Ekblom A, McLaughlin JK, Karlsson BM, Nyrén O, Gridley G, Adami HO, et al. Pancreatitis and Pancreatic Cancer: a Population-Based Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 20 avr 1994;86(8):625-7.
33. Hirota M, Shimosegawa T, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Hamada S, et al. The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *Pancreatology*. 2012;12(2):79-84.
34. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am*. mai 2000;84(3):565-73.
35. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 13 août 2011;378(9791):607-20.
36. Shi C, Daniels JA, Hruban RH. Molecular characterization of pancreatic neoplasms. *Adv Anat Pathol*. juill 2008;15(4):185-95.
37. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int*. 2014;2014:474905.
38. Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*. 1 janv 2008;1(4):306-16.

39. Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJP, Wilentz RE. Direct Correlation between Proliferative Activity and Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN): Additional Evidence for a Recently Proposed Model of Progression. *Mod Pathol.* avr 2002;15(4):441-7.
40. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 15 mai 2006;20(10):1218-49.
41. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis: A Meta-Analysis. *Neoplasia.* janv 2005;7(1):17-23.
42. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 15 oct 1998;58(20):4740-4.
43. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 1 avr 2000;60(7):2002-6.
44. Machado NO, al Qadhi H, al Wahibi K. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of Pancreas. *N Am J Med Sci.* mai 2015;7(5):160-75.
45. Lévy P, Jouannaud V, O'Toole D, Couvelard A, Vullierme MP, Palazzo L, et al. Natural history of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas: actuarial risk of malignancy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* avr 2006;4(4):460-8.
46. Liffers ST, Godfrey L, Frohn L, Haerberle L, Yavas A, Vesce R, et al. Molecular heterogeneity and commonalities in pancreatic cancer precursors with gastric and intestinal phenotype. *Gut.* 1 mars 2023;72(3):522-34.
47. Singhi AD, Nikiforova MN, Fasanella KE, McGrath KM, Pai RK, Ohori NP, et al. Preoperative GNAS and KRAS testing in the diagnosis of pancreatic mucinous cysts. *Clin Cancer Res.* 15 août 2014;20(16):4381-9.
48. Hosoda W, Sasaki E, Murakami Y, Yamao K, Shimizu Y, Yatabe Y. GNAS mutation is a frequent event in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms and associated adenocarcinomas. *Virchows Arch.* juin 2015;466(6):665-74.
49. de Mestier L, Védie AL, Salfati D, Rebours V, Hammel P. Cancer du pancréas : causes, formes génétiques et dépistage. *Hépatol Gastro.* 2017;(24):7-17.
50. Singhi AD, Wood LD. Early detection of pancreatic cancer using DNA-based molecular approaches. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* juill 2021;18(7):457-68.
51. Vasseur R, Skrypek N, Duchêne B, Renaud F, Martínez-Maqueda D, Vincent A, et al. The mucin MUC4 is a transcriptional and post-transcriptional target of K-ras oncogene in pancreatic cancer. Implication of MAPK/AP-1, NF-κB and RalB signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* déc 2015;1849(12):1375-84.
52. Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF, Koprowski H. Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res.* nov 1982;42(11):4820-3.
53. Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Xu W, Ji S, et al. Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncol Targets Ther.* 2017;10:4591-8.
54. Hosein AN, Brekken RA, Maitra A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* août 2020;17(8):487-505.
55. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease.

Nat Rev Mol Cell Biol. déc 2014;15(12):786-801.

56. Di Maggio F, Arumugam P, Delvecchio FR, Batista S, Lechertier T, Hodivala-Dilke K, et al. Pancreatic stellate cells regulate blood vessel density in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2016;16(6):995-1004.
57. Nishida T, Yoshitomi H, Takano S, Kagawa S, Shimizu H, Ohtsuka M, et al. Low Stromal Area and High Stromal Microvessel Density Predict Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Pancreas*. avr 2016;45(4):593-600.
58. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest*. 2 janv 2018;128(1):26-35.
59. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 23 août 2016;16(9):582-98.
60. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*. 1 févr 2008;68(3):918-26.
61. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 6 mars 2017;214(3):579-96.
62. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, et al. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*. mai 2019;248(1):51-65.
63. Pothula SP, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cells: Aiding and abetting pancreatic cancer progression. *Pancreatology*. avr 2020;20(3):409-18.
64. Foucher ED, Ghigo C, Chouaib S, Galon J, Iovanna J, Olive D. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strong Imbalance of Good and Bad Immunological Cops in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2018;9:1044.
65. Muller M, Haghnejad V, Schaefer M, Gauchotte G, Caron B, Peyrin-Biroulet L, et al. The Immune Landscape of Human Pancreatic Ductal Carcinoma: Key Players, Clinical Implications, and Challenges. *Cancers (Basel)*. 16 févr 2022;14(4):995.
66. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*. avr 2011;17(4):500-3.
67. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*. oct 2015;47(10):1168-78.
68. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 3 mars 2016;531(7592):47-52.
69. Puleo F, Nicolle R, Blum Y, Cros J, Marisa L, Demetter P, et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology*. déc 2018;155(6):1999-2013.e3.
70. Hayashi H, Higashi T, Miyata T, Yamashita YI, Baba H. Recent advances in precision medicine for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Gastroenterol Surg*. juill 2021;5(4):457-66.
71. Lautizi M, Baumbach J, Weichert W, Steiger K, List M, Pfarr N, et al. The limits of molecular signatures for pancreatic ductal adenocarcinoma subtyping. *NAR Cancer*. 28 sept 2022;4(4):zcac030.
72. Nicolle R, Blum Y, Marisa L, Dusetti N, Iovanna J. [Multi-omic approaches reveal new therapeutic targets for the treatment of pancreatic cancer]. *Med Sci (Paris)*. mai 2018;34(5):379-82.

73. Aung KL, Fischer SE, Denroche RE, Jang GH, Dodd A, Creighton S, et al. Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clin Cancer Res.* 15 mars 2018;24(6):1344-54.
74. Neuzillet C, Gaujoux S, Williet N, Bachet JB, Bauguion L, Colson Durand L, et al. Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig Liver Dis.* déc 2018;50(12):1257-71.
75. Tempero MA, Malafa MP, Al-Hawary M, Behrman SW, Benson AB, Cardin DB, et al. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 1 avr 2021;19(4):439-57.
76. O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol.* juill 2017;18(7):849-51.
77. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* John Wiley & Sons; 2017. 272 p.
78. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* oct 1982;95(1):333-9.
79. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol.* 22 avr 2020;13(6):100773.
80. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol.* 24 janv 2018;13:395-412.
81. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2019;20(2):69-84.
82. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* nov 2009;139(5):871-90.
83. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.* 26 nov 2015;527(7579):472-6.
84. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 26 nov 2015;527(7579):525-30.
85. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science.* 5 déc 2003;302(5651):1704-9.
86. Paluch EK, Aspalter IM, Sixt M. Focal Adhesion–Independent Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 6 oct 2016;32(1):469-90.
87. Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* août 2012;14(8):777-83.
88. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2009;10(7):445-57.
89. Zajac O, Raingeaud J, Libanje F, Lefebvre C, Sabino D, Martins I, et al. Tumour spheres with inverted polarity drive the formation of peritoneal metastases in patients with hypermethylated colorectal carcinomas. *Nat Cell Biol.* mars 2018;20(3):296-306.
90. Canet-Jourdan C, Pagès DL, Nguyen-Vigouroux C, Cartry J, Zajac O, Desterke C, et al. Patient-derived organoids identify an apico-basolateral polarity switch associated with survival in colorectal cancer. *Journal of Cell Science.* 15 juin 2022;jcs.259256.

91. Pagès DL, Dornier E, Seze JD, Wang L, Luan R, Cartry J, et al. Cell clusters adopt a collective amoeboid mode of migration in confined non-adhesive environments. *bioRxiv*. 29 mai 2020;2020.05.28.106203.
92. Huang W, Navarro-Serer B, Jeong YJ, Chianchiano P, Xia L, Luchini C, et al. Pattern of invasion in human pancreatic cancer organoids is associated with loss of SMAD4 and clinical outcome. *Cancer Res*. 1 juill 2020;80(13):2804-17.
93. Jeong YJ, Knutsdottir H, Shojaeian F, Lerner MG, Wissler MF, Henriët E, et al. Morphology-guided transcriptomic analysis of human pancreatic cancer organoids reveals microenvironmental signals that enhance invasion. *J Clin Invest*. 133(8):e162054.
94. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Annals of Oncology*. 1 janv 1999;10:S82-4.
95. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 28 nov 2016;22(44):9694-705.
96. Dell'Aquila E, Fulgenzi CAM, Minelli A, Citarella F, Stellato M, Pantano F, et al. Prognostic and predictive factors in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 10 mars 2020;11(10):924-41.
97. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, et al. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg*. nov 2006;10(9):1199-210; discussion 1210-1211.
98. Gnerlich JL, Luka SR, Deshpande AD, Dubray BJ, Weir JS, Carpenter DH, et al. Microscopic margins and patterns of treatment failure in resected pancreatic adenocarcinoma. *Arch Surg*. août 2012;147(8):753-60.
99. Le N, Sund M, Vinci A, GEMS collaborating group of Pancreas 2000. Prognostic and predictive markers in pancreatic adenocarcinoma. *Dig Liver Dis*. mars 2016;48(3):223-30.
100. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol*. juin 2012;3(2):105-19.
101. Falzone L, Bordonaro R, Libra M. SnapShot: Cancer chemotherapy. *Cell*. 13 avr 2023;186(8):1816-1816.e1.
102. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. juin 1997;15(6):2403-13.
103. Iglesias J. nab-Paclitaxel (Abraxane®): an albumin-bound cytotoxic exploiting natural delivery mechanisms into tumors. *Breast Cancer Res*. 2009;11(Suppl 1):S21.
104. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 12 mai 2011;364(19):1817-25.
105. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*. 20 déc 2018;379(25):2395-406.
106. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 31 oct 2013;369(18):1691-703.
107. El Amrani M, Clement G, Lenne X, Farges O, Delpero JR, Theis D, et al. Failure-to-rescue in Patients Undergoing Pancreatectomy: Is Hospital Volume a Standard for Quality Improvement Programs? Nationwide Analysis of 12,333 Patients. *Ann Surg*. nov 2018;268(5):799-807.

108. Tol JAMG, Gouma DJ, Bassi C, Dervenis C, Montorsi M, Adham M, et al. Definition of a standard lymphadenectomy in surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma: a consensus statement by the International Study Group on Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*. sept 2014;156(3):591-600.
109. Delpero JR, Boher JM, Sauvanet A, Le Treut YP, Sa-Cunha A, Mabrut JY, et al. Pancreatic adenocarcinoma with venous involvement: is up-front synchronous portal-superior mesenteric vein resection still justified? A survey of the Association Française de Chirurgie. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(6):1874-83.
110. Strobel O, Hank T, Hinz U, Bergmann F, Schneider L, Springfield C, et al. Pancreatic Cancer Surgery: The New R-status Counts. *Ann Surg*. mars 2017;265(3):565-73.
111. Ducreux MP, Desgrippes R, Texier M, Di Fiore F, Vanelslander P, Capitain O, et al. PRODIGE 29-UCGI 26(NEOPAN): A randomised trial of chemotherapy with folfinirox or gemcitabine in locally advanced pancreatic carcinoma (PC). *Annals of Oncology*. 1 oct 2018;29:viii266-7.
112. Conroy T, Pfeiffer P, Vilgrain V, Lamarca A, Seufferlein T, O'Reilly EM, et al. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 5 sept 2023;S0923-7534(23)00824-4.
113. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 20 mai 2007;25(15):1960-6.
114. Wainberg ZA, Melisi D, Macarulla T, Pazo-Cid R, Chandana SR, De La Fouchardiere C, et al. NAPOLI-3: A randomized, open-label phase 3 study of liposomal irinotecan + 5-fluorouracil/leucovorin + oxaliplatin (NALIRIFOX) versus nab-paclitaxel + gemcitabine in treatment-naïve patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (mPDAC). *JCO*. 1 févr 2023;41(4_suppl):LBA661-LBA661.
115. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*. 25 juill 2019;381(4):317-27.
116. Dahan L, Phelip JM, Le Malicot K, Williet N, Desrame J, Volet J, et al. FOLFIRINOX until progression, FOLFIRINOX with maintenance treatment, or sequential treatment with gemcitabine and FOLFIRI.3 for first-line treatment of metastatic pancreatic cancer: A randomized phase II trial (PRODIGE 35-PANOPTIMOX). *JCO*. 20 mai 2018;36(15_suppl):4000-4000.
117. Fouchardiere C de la, Malka D, Chabaud S, Raimbourg J, Botsen D, Launay S, et al. LBA60 Evaluation of gemcitabine and paclitaxel versus gemcitabine alone after FOLFIRINOX failure or intolerance in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: Results of the randomized phase III PRODIGE 65 - UCGI 36 - GEMPAX UNICANCER study. *Annals of Oncology*. 1 sept 2022;33:S1426.
118. Hecht JR, Lonardi S, Bendell J, Sim HW, Macarulla T, Lopez CD, et al. Randomized Phase III Study of FOLFOX Alone or With Pegilodecakin as Second-Line Therapy in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer That Progressed After Gemcitabine (SEQUOIA). *J Clin Oncol*. 1 avr 2021;39(10):1108-18.
119. Zaanan A, Trouilloud I, Markoutsaki T, Gauthier M, Dupont-Gossart AC, Lecomte T, et al. FOLFOX as second-line chemotherapy in patients with pretreated metastatic pancreatic cancer from the FIRGEM study. *BMC Cancer*. 14 juin 2014;14(1):441.
120. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, Dean A, Shan YS, Jameson G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 6 févr 2016;387(10018):545-57.

121. Taïeb J, Sayah L, Heinrich K, Kunzmann V, Boileve A, Cirkel G, et al. Efficacy of immune checkpoint inhibitors in microsatellite unstable/mismatch repair-deficient advanced pancreatic adenocarcinoma: an AGEO European Cohort. *Eur J Cancer*. juill 2023;188:90-7.
122. Massard C, Michiels S, Ferté C, Le Deley MC, Lacroix L, Hollebecque A, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov*. 2017;7(6):586-95.
123. Le Tourneau C, Delord JP, Gonçalves A, Gavoille C, Dubot C, Isambert N, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. oct 2015;16(13):1324-34.
124. Trédan O, Wang Q, Pissaloux D, Cassier P, de la Fouchardière A, Fayette J, et al. Molecular screening program to select molecular-based recommended therapies for metastatic cancer patients: analysis from the ProfILER trial. *Ann Oncol*. 1 mai 2019;30(5):757-65.
125. Andre F, Filleron T, Kamal M, Mosele F, Arnedos M, Dalenc F, et al. Genomics to select treatment for patients with metastatic breast cancer. *Nature*. oct 2022;610(7931):343-8.
126. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. juin 2017;23(6):703-13.
127. Tuxen IV, Rohrberg KS, Oestrup O, Ahlborn LB, Schmidt AY, Spanggaard I, et al. Copenhagen Prospective Personalized Oncology (CoPPO)-Clinical Utility of Using Molecular Profiling to Select Patients to Phase I Trials. *Clin Cancer Res*. 15 févr 2019;25(4):1239-47.
128. Martin-Romano P, Mezquita L, Hollebecque A, Lacroix L, Rouleau E, Gazzah A, et al. Implementing the European Society for Medical Oncology Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets in a Comprehensive Profiling Program: Impact on Precision Medicine Oncology. *JCO Precis Oncol*. oct 2022;6:e2100484.
129. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):508-18.
130. Tsimberidou AM, Hong DS, Ye Y, Cartwright C, Wheler JJ, Falchook GS, et al. Initiative for Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy (IMPACT): An MD Anderson Precision Medicine Study. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017.
131. Schwaederle M, Zhao M, Lee JJ, Eggermont AM, Schilsky RL, Mendelsohn J, et al. Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J Clin Oncol*. 10 nov 2015;33(32):3817-25.
132. Tarabay A, Boileve A, Smolenschi C, Antoun L, Valery M, Fuerea A, et al. Precision Medicine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: The Impact of Targeted Therapies on Survival of Patients Harboring Actionable Mutations. *Biomedicines*. 19 sept 2023;11(9):2569.
133. Hofmann MH, Gerlach D, Misale S, Petronczki M, Kraut N. Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discov*. 1 avr 2022;12(4):924-37.
134. Helal C, Valéry M, Ducreux M, Hollebecque A, Smolenschi C. FGFR2 fusion in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there hope? *Eur J Cancer*. nov 2022;176:168-70.
135. Windon AL, Loaiza-Bonilla A, Jensen CE, Randall M, Morrissette JJD, Shroff SG. A KRAS wild type mutational status confers a survival advantage in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol*. févr 2018;9(1):1-10.
136. Ostrem JML, Shokat KM. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to

- mechanism-based design. *Nat Rev Drug Discov.* nov 2016;15(11):771-85.
137. Ratner N, Miller SJ. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* mai 2015;15(5):290-301.
 138. Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat Rev Drug Discov.* août 2020;19(8):533-52.
 139. Kim D, Xue JY, Lito P. Targeting KRAS(G12C): From Inhibitory Mechanism to Modulation of Antitumor Effects in Patients. *Cell.* 12 nov 2020;183(4):850-9.
 140. Vial E, Pouyssegur J. Regulation of Tumor Cell Motility by ERK Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004;1030(1):208-18.
 141. Kwan AK, Piazza GA, Keeton AB, Leite CA. The path to the clinic: a comprehensive review on direct KRASG12C inhibitors. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 19 janv 2022;41(1):27.
 142. AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov.* août 2017;7(8):818-31.
 143. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* mars 2020;17(3):153-68.
 144. Waters AM, Der CJ. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 4 sept 2018;8(9):a031435.
 145. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 23 janv 2014;505(7484):495-501.
 146. Luchini C, Paolino G, Mattiolo P, Piredda ML, Cavaliere A, Gaule M, et al. KRAS wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma: molecular pathology and therapeutic opportunities. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 28 oct 2020;39(1):227.
 147. McIntyre CA, Lawrence SA, Richards AL, Chou JF, Wong W, Capanu M, et al. Alterations in driver genes are predictive of survival in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer.* 1 sept 2020;126(17):3939-49.
 148. Wang H, Chi L, Yu F, Dai H, Gao C, Si X, et al. Annual review of KRAS inhibitors in 2022. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 5 mars 2023;249:115124.
 149. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature.* 28 nov 2013;503(7477):548-51.
 150. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI, et al. KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med.* 24 sept 2020;383(13):1207-17.
 151. Strickler JH, Satake H, George TJ, Yaeger R, Hollebecque A, Garrido-Laguna I, et al. Sotorasib in KRAS p.G12C-Mutated Advanced Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 5 janv 2023;388(1):33-43.
 152. Bekaii-Saab TS, Yaeger R, Spira AI, Pelster MS, Sabari JK, Hafez N, et al. Adagrasib in Advanced Solid Tumors Harboring a KRASG12C Mutation. *JCO.* 26 avr 2023;10.1200/JCO.23.00434.
 153. Ou SHI, Jänne PA, Leal TA, Rybkin II, Sabari JK, Barve MA, et al. First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients With Advanced KRASG12C Solid Tumors (KRYSAL-1). *J Clin Oncol.* 10 août 2022;40(23):2530-8.
 154. Cowzer D, Zameer M, Conroy M, Kolch W, Duffy AG. Targeting KRAS in Pancreatic Cancer. *J Pers Med.* 8 nov 2022;12(11):1870.
 155. Amodio V, Yaeger R, Arcella P, Cancelliere C, Lamba S, Lorenzato A, et al. EGFR Blockade Reverts Resistance to KRASG12C Inhibition in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* août 2020;10(8):1129-39.

156. Ryan MB, Coker O, Sorokin A, Fella K, Barnes H, Wong E, et al. KRASG12C-independent feedback activation of wild-type RAS constrains KRASG12C inhibitor efficacy. *Cell Rep.* 21 juin 2022;39(12):110993.
157. Feng J, Hu Z, Xia X, Liu X, Lian Z, Wang H, et al. Feedback activation of EGFR/wild-type RAS signaling axis limits KRASG12D inhibitor efficacy in KRASG12D-mutated colorectal cancer. *Oncogene.* mai 2023;42(20):1620-33.
158. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 22 juill 2004;351(4):337-45.
159. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 20 juill 2014;32(21):2240-7.
160. Kuboki Y, Yaeger R, Fakih M, Strickler JH, Masuishi T, Kim EJM, et al. 45MO Sotorasib in combination with panitumumab in refractory KRAS G12C-mutated colorectal cancer: Safety and efficacy for phase Ib full expansion cohort. *Annals of Oncology.* 1 nov 2022;33:S1445-6.
161. Fakih MG, Kopetz S, Kuboki Y, Kim TW, Munster PN, Krauss JC, et al. Sotorasib for previously treated colorectal cancers with KRASG12C mutation (CodeBreak100): a prespecified analysis of a single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology.* 1 janv 2022;23(1):115-24.
162. Yaeger R, Weiss J, Pelster MS, Spira AI, Barve M, Ou SHI, et al. Adagrasib with or without Cetuximab in Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *N Engl J Med.* 5 janv 2023;388(1):44-54.
163. Akhave NS, Biter AB, Hong DS. Mechanisms of resistance to KRASG12C-targeted therapy. *Cancer Discov.* juin 2021;11(6):1345-52.
164. Hallin J, Bowcut V, Calinisan A, Briere DM, Hargis L, Engstrom LD, et al. Anti-tumor efficacy of a potent and selective non-covalent KRASG12D inhibitor. *Nat Med.* oct 2022;28(10):2171-82.
165. Wang X, Allen S, Blake JF, Bowcut V, Briere DM, Calinisan A, et al. Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor. *J Med Chem.* 24 févr 2022;65(4):3123-33.
166. The KRASG12D inhibitor MRTX1133 elucidates KRAS-mediated oncogenesis. *Nat Med.* oct 2022;28(10):2017-8.
167. The KRASG12D inhibitor MRTX1133 elucidates KRAS-mediated oncogenesis. *Nat Med.* oct 2022;28(10):2017-8.
168. Kemp SB, Cheng N, Markosyan N, Sor R, Kim IK, Hallin J, et al. Efficacy of a Small-Molecule Inhibitor of KrasG12D in Immunocompetent Models of Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 6 févr 2023;13(2):298-311.
169. Gulay KCM, Zhang X, Pantazopoulou V, Patel J, Esparza E, Pran Babu DS, et al. Dual inhibition of KRASG12D and pan-ERBB is synergistic in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 28 juin 2023;CAN-23-1313.
170. Dougan SK. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J.* 2017;23(6):321-5.
171. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* mai 2005;7(5):469-83.

172. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 20 janv 2012;148(1-2):349-61.
173. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 12 juin 2009;324(5933):1457-61.
174. Mainardi S. With a little help from my T friends: T cells increase efficacy of KRAS (G12D) inhibitors. *Cell Rep Med*. 21 févr 2023;4(2):100950.
175. Watterson A, Coelho MA. Cancer immune evasion through KRAS and PD-L1 and potential therapeutic interventions. *Cell Communication and Signaling*. 2 mars 2023;21(1):45.
176. Qi SM, Dong J, Xu ZY, Cheng XD, Zhang WD, Qin JJ. PROTAC: An Effective Targeted Protein Degradation Strategy for Cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2021;12:692574.
177. Farnaby W, Koegl M, McConnell DB, Ciulli A. Transforming targeted cancer therapy with PROTACs: A forward-looking perspective. *Curr Opin Pharmacol*. avr 2021;57:175-83.
178. Kessler D, Gmachl M, Mantoulidis A, Martin LJ, Zoephel A, Mayer M, et al. Drugging an undruggable pocket on KRAS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 août 2019;116(32):15823-9.
179. Kim D, Herdeis L, Rudolph D, Zhao Y, Böttcher J, Vides A, et al. Pan-KRAS inhibitor disables oncogenic signalling and tumour growth. *Nature*. juill 2023;619(7968):160-6.
180. Koltun E, Cregg J, Rice MA, Whalen DM, Freilich R, Jiang J, et al. Abstract 1260: First-in-class, orally bioavailable KRASG12V(ON) tri-complex inhibitors, as single agents and in combinations, drive profound anti-tumor activity in preclinical models of KRASG12V mutant cancers. *Cancer Research*. 1 juill 2021;81(13_Supplement):1260.
181. Valencia-Sama I, Ladumor Y, Kee L, Adderley T, Christopher G, Robinson CM, et al. NRAS Status Determines Sensitivity to SHP2 Inhibitor Combination Therapies Targeting the RAS-MAPK Pathway in Neuroblastoma. *Cancer Res*. 15 août 2020;80(16):3413-23.
182. Sheffels E, Kortum RL. The Role of Wild-Type RAS in Oncogenic RAS Transformation. *Genes (Basel)*. 28 avr 2021;12(5):662.
183. Nichols RJ, Haderk F, Stahlhut C, Schulze CJ, Hemmati G, Wildes D, et al. RAS nucleotide cycling underlies the SHP2 phosphatase dependence of mutant BRAF-, NF1- and RAS-driven cancers. *Nat Cell Biol*. sept 2018;20(9):1064-73.
184. Hofmann MH, Gmachl M, Ramharter J, Savarese F, Gerlach D, Marszalek JR, et al. BI-3406, a Potent and Selective SOS1-KRAS Interaction Inhibitor, Is Effective in KRAS-Driven Cancers through Combined MEK Inhibition. *Cancer Discov*. janv 2021;11(1):142-57.
185. Zhao Y, Xue JY, Lito P. Suppressing Nucleotide Exchange to Inhibit KRAS-Mutant Tumors. *Cancer Discov*. janv 2021;11(1):17-9.
186. Chen YNP, LaMarche MJ, Chan HM, Fekkes P, Garcia-Fortanet J, Acker MG, et al. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature*. 7 juill 2016;535(7610):148-52.
187. Garcia Fortanet J, Chen CHT, Chen YNP, Chen Z, Deng Z, Firestone B, et al. Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *J Med Chem*. 8 sept 2016;59(17):7773-82.
188. Ou SI, Koczywas M, Ulahannan S, Janne P, Pacheco J, Burris H, et al. A12 The SHP2 Inhibitor RMC-4630 in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Preliminary Evaluation of a First-in-Man Phase 1 Clinical Trial. *Journal of Thoracic Oncology*. 1 févr 2020;15(2):S15-6.
189. Brana I, Shapiro G, Johnson ML, Yu HA, Robbrecht D, Tan DSW, et al. Initial results from a dose

- finding study of TNO155, a SHP2 inhibitor, in adults with advanced solid tumors. *JCO*. 20 mai 2021;39(15_suppl):3005-3005.
190. Johnson ML, Gort E, Pant S, Lolkema MP, Sebastian M, Scheffler M, et al. 524P A phase I, open-label, dose-escalation trial of BI 1701963 in patients (pts) with KRAS mutated solid tumours: A snapshot analysis. *Annals of Oncology*. 1 sept 2021;32:S591-2.
 191. Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, et al. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*. 2018;560(7718):325-30.
 192. Lynch M. Phylogenetic divergence of cell biological features. Barkai N, éditeur. *eLife*. 21 juin 2018;7:e34820.
 193. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 14 mai 2009;459(7244):262-5.
 194. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. nov 2011;141(5):1762-72.
 195. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*. 18 déc 2014;516(7531):400-4.
 196. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 3 févr 2011;470(7332):105-9.
 197. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*. 15 janv 2015;160(1-2):324-38.
 198. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc*. sept 2016;11(9):1724-43.
 199. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, et al. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 02 2016;18(6):827-38.
 200. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 14 mai 2009;459(7244):262-5.
 201. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*. 7 mai 2015;521(7550):43-7.
 202. Boilève A, Cartry J, Gelli M, Annereau M, Boige V, Ducreux M, et al. Les organoïdes en oncologie digestive : état des lieux et perspectives. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 1 nov 2020;27(9):865-72.
 203. Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJM, van de Wetering M, et al. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J*. 16 oct 2013;32(20):2708-21.
 204. Baker LA, Tiriack H, Clevers H, Tuveson DA. Modeling pancreatic cancer with organoids. *Trends Cancer*. avr 2016;2(4):176-90.
 205. Walsh AJ, Castellanos JA, Nagathihalli NS, Merchant NB, Skala MC. Optical Imaging of Drug-Induced Metabolism Changes in Murine and Human Pancreatic Cancer Organoids Reveals

- Heterogeneous Drug Response. *Pancreas*. juill 2016;45(6):863-9.
206. Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med*. nov 2015;21(11):1364-71.
 207. Li X, Nadauld L, Ootani A, Corney DC, Pai RK, Gevaert O, et al. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat Med*. juill 2014;20(7):769-77.
 208. Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*. 13 déc 2018;175(7):1972-1988.e16.
 209. Broutier L, Mastrogiovanni G, Versteegen MMA, Francies HE, Gavarró LM, Bradshaw CR, et al. Human Primary Liver Cancer -derived Organoid Cultures for disease modelling and drug screening. *Nat Med*. déc 2017;23(12):1424-35.
 210. Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, Kolders S, Francies HE, Gulersonmez MC, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 déc 2019;116(52):26580-90.
 211. Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, Dijkstra KK, Krijgsman O, Kuilman T, et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 oct 2015;112(43):13308-11.
 212. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*. 23 2018;359(6378):920-6.
 213. Tiriác H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1112-29.
 214. Gendoo DMA, Denroche RE, Zhang A, Radulovich N, Jang GH, Lemire M, et al. Whole genomes define concordance of matched primary, xenograft, and organoid models of pancreas cancer. *PLoS Comput Biol*. 10 janv 2019;15(1):e1006596.
 215. Calvo IR, Weber C, Ray M, Brown M, Kirby K, Nandi RK, et al. Human Organoids Share Structural and Genetic Features with Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors. *Mol Cancer Res*. janv 2019;17(1):70-83.
 216. Somerville TDD, Xu Y, Miyabayashi K, Tiriác H, Cleary CR, Maia-Silva D, et al. TP63-Mediated Enhancer Reprogramming Drives the Squamous Subtype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Rep*. 13 nov 2018;25(7):1741-1755.e7.
 217. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell*. 1 mars 2018;22(3):454-467.e6.
 218. Fraunhoffer NA, Abuelafia AM, Duseti N, Iovanna J. Limitation and challenges in using pancreatic cancer-derived organoids as a preclinical tool. *Cancer Commun (Lond)*. oct 2022;42(10):1028-31.
 219. Drost J, van Boxtel R, Blokzijl F, Mizutani T, Sasaki N, Sasselli V, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science*. 13 2017;358(6360):234-8.
 220. Driehuis E, Clevers H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 26 janv 2017;312(3):G257-65.
 221. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 5 déc

2013;13(6):653-8.

222. Liang C, Shi S, Meng Q, Liang D, Ji S, Zhang B, et al. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going. *Exp Mol Med.* déc 2017;49(12):e406.
223. Tsai S, McOlash L, Palen K, Johnson B, Duris C, Yang Q, et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer.* 27 mars 2018;18(1):335.
224. Schuth S, Le Blanc S, Krieger TG, Jabs J, Schenk M, Giese NA, et al. Patient-specific modeling of stroma-mediated chemoresistance of pancreatic cancer using a three-dimensional organoid-fibroblast co-culture system. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 22 oct 2022;41(1):312.
225. Workman MJ, Mahe MM, Trisno S, Poling HM, Watson CL, Sundaram N, et al. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat Med.* 2017;23(1):49-59.
226. Schlieve CR, Fowler KL, Thornton M, Huang S, Hajjali I, Hou X, et al. Neural Crest Cell Implantation Restores Enteric Nervous System Function and Alters the Gastrointestinal Transcriptome in Human Tissue-Engineered Small Intestine. *Stem Cell Reports.* 12 sept 2017;9(3):883-96.
227. Eicher AK, Kechele DO, Sundaram N, Berns HM, Poling HM, Haines LE, et al. Functional human gastrointestinal organoids can be engineered from three primary germ layers derived separately from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 6 janv 2022;29(1):36-51.e6.
228. Wörsdörfer P, Dalda N, Kern A, Krüger S, Wagner N, Kwok CK, et al. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells. *Sci Rep.* 30 oct 2019;9(1):15663.
229. Jung KB, Lee H, Son YS, Lee MO, Kim YD, Oh SJ, et al. Interleukin-2 induces the in vitro maturation of human pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Nat Commun.* 02 2018;9(1):3039.
230. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell.* 06 2018;174(6):1586-1598.e12.
231. Bar-Ephraim YE, Kretschmar K, Clevers H. Organoids in immunological research. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(5):279-93.
232. Hill DR, Huang S, Nagy MS, Yadagiri VK, Fields C, Mukherjee D, et al. Bacterial colonization stimulates a complex physiological response in the immature human intestinal epithelium. *Elife.* 07 2017;6.
233. Ramani S, Crawford SE, Blutt SE, Estes MK. Human organoid cultures: transformative new tools for human virus studies. *Curr Opin Virol.* 2018;29:79-86.
234. Lamers MM, Beumer J, Vaart J van der, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 3 juill 2020;369(6499):50-4.
235. Dekkers JF, Berkens G, Kruisselbrink E, Vonk A, de Jonge HR, Janssens HM, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 22 2016;8(344):344ra84.
236. Letai A, Bhola P, Welm AL. Functional precision oncology: Testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations. *Cancer Cell.* 10 janv 2022;40(1):26-35.
237. Veninga V, Voest EE. Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine. *Cancer Cell.* 13 sept 2021;39(9):1190-201.

238. van Renterghem AWJ, van de Haar J, Voest EE. Functional precision oncology using patient-derived assays: bridging genotype and phenotype. *Nat Rev Clin Oncol*. 13 mars 2023;
239. Kornauth C, Pemovska T, Vladimer GI, Bayer G, Bergmann M, Eder S, et al. Functional Precision Medicine Provides Clinical Benefit in Advanced Aggressive Hematologic Cancers and Identifies Exceptional Responders. *Cancer Discov*. févr 2022;12(2):372-87.
240. Malani D, Kumar A, Brück O, Kontro M, Yadav B, Hellesøy M, et al. Implementing a Functional Precision Medicine Tumor Board for Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. févr 2022;12(2):388-401.
241. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*. 7 mai 2015;161(4):933-45.
242. Hou S, Tiriac H, Sridharan BP, Scampavia L, Madoux F, Seldin J, et al. Advanced Development of Primary Pancreatic Organoid Tumor Models for High-Throughput Phenotypic Drug Screening. *SLAS Discov*. juill 2018;23(6):574-84.
243. Wensink GE, Elias SG, Mullenders J, Koopman M, Boj SF, Kranenburg OW, et al. Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *NPJ Precis Oncol*. 12 avr 2021;5(1):30.
244. Sharick JT, Walsh CM, Sprackling CM, Pasch CA, Pham DL, Esbona K, et al. Metabolic Heterogeneity in Patient Tumor-Derived Organoids by Primary Site and Drug Treatment. *Front Oncol*. 2020;10:553.
245. Matthews JM, Schuster B, Kashaf SS, Liu P, Ben-Yishay R, Ishay-Ronen D, et al. Organoid: A versatile deep learning platform for tracking and analysis of single-organoid dynamics. *PLoS Comput Biol*. nov 2022;18(11):e1010584.
246. Wu YH, Hung YP, Chiu NC, Lee RC, Li CP, Chao Y, et al. Correlation between drug sensitivity profiles of circulating tumour cell-derived organoids and clinical treatment response in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *European Journal of Cancer*. 1 mai 2022;166:208-18.
247. Fallahi-Sichani M, Honarnejad S, Heiser LM, Gray JW, Sorger PK. Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat Chem Biol*. nov 2013;9(11):708-14.
248. Huang S, Pang L. Comparing statistical methods for quantifying drug sensitivity based on in vitro dose-response assays. *Assay Drug Dev Technol*. févr 2012;10(1):88-96.
249. Votanopoulos KI, Forsythe S, Sivakumar H, Mazzocchi A, Aleman J, Miller L, et al. Model of Patient-Specific Immune-Enhanced Organoids for Immunotherapy Screening: Feasibility Study. *Ann Surg Oncol*. juin 2020;27(6):1956-67.
250. Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, van Werkhoven E, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med*. 09 2019;11(513).
251. Yao Y, Xu X, Yang L, Zhu J, Wan J, Shen L, et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*. 2 janv 2020;26(1):17-26.e6.
252. Li X, Francies HE, Secrier M, Perner J, Miremadi A, Galeano-Dalmau N, et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics. *Nat Commun*. 30 2018;9(1):2983.
253. Mazzocchi AR, Rajan SAP, Votanopoulos KI, Hall AR, Skardal A. In vitro patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening. *Sci Rep*. 13 févr 2018;8(1):2886.

254. Narasimhan V, Wright JA, Churchill M, Wang T, Rosati R, Lannagan TRM, et al. Medium-throughput Drug Screening of Patient-derived Organoids from Colorectal Peritoneal Metastases to Direct Personalized Therapy. *Clin Cancer Res.* 15 juill 2020;26(14):3662-70.
255. Ganesh K, Wu C, O'Rourke KP, Szeglin BC, Zheng Y, Sauvé CEG, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation. *Nat Med.* oct 2019;25(10):1607-14.
256. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell.* 9 janv 2020;180(1):188-204.e22.
257. Steele NG, Chakrabarti J, Wang J, Biesiada J, Holokai L, Chang J, et al. An Organoid-Based Preclinical Model of Human Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(1):161-84.
258. Demyan L, Habowski AN, Plenker D, King DA, Standing OJ, Tsang C, et al. Pancreatic Cancer Patient-derived Organoids Can Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg.* 1 sept 2022;276(3):450-62.
259. Beutel AK, Schütte L, Scheible J, Roger E, Müller M, Perkhofer L, et al. A Prospective Feasibility Trial to Challenge Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids in Predicting Treatment Response. *Cancers (Basel).* 21 mai 2021;13(11):2539.
260. Grossman JE, Muthuswamy L, Huang L, Akshinthala D, Perea S, Gonzalez RS, et al. Organoid Sensitivity Correlates with Therapeutic Response in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 15 févr 2022;28(4):708-18.
261. Farshadi EA, Chang J, Sampadi B, Doukas M, Van 't Land F, van der Sijde F, et al. Organoids Derived from Neoadjuvant FOLFIRINOX Patients Recapitulate Therapy Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 déc 2021;27(23):6602-12.
262. Hennig A, Baenke F, Klimova A, Drukewitz S, Jahnke B, Brückmann S, et al. Detecting drug resistance in pancreatic cancer organoids guides optimized chemotherapy treatment. *J Pathol.* août 2022;257(5):607-19.
263. Ooft SN, Weeber F, Schipper L, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, et al. Prospective experimental treatment of colorectal cancer patients based on organoid drug responses. *ESMO Open.* juin 2021;6(3):100103.
264. Jensen LH, Rogatto SR, Lindebjerg J, Havelund B, Abildgaard C, do Canto LM, et al. Precision medicine applied to metastatic colorectal cancer using tumor-derived organoids and in-vitro sensitivity testing: a phase 2, single-center, open-label, and non-comparative study. *J Exp Clin Cancer Res.* 5 mai 2023;42(1):115.
265. Melzer MK, Resheq Y, Navaee F, Kleger A. The application of pancreatic cancer organoids for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* avr 2023;18(4):429-44.
266. Zajac O, Raingeaud J, Libanje F, Lefebvre C, Sabino D, Martins I, et al. Tumour spheres with inverted polarity drive the formation of peritoneal metastases in patients with hypermethylated colorectal carcinomas. *Nature Cell Biology.* mars 2018;20(3):296-306.
267. Wensink GE, Elias SG, Mullenders J, Koopman M, Boj SF, Kranenburg OW, et al. Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *npj Precis Onc.* déc 2021;5(1):30.
268. Seppälä TT, Zimmerman JW, Suri R, Zlomke H, Ivey GD, Szabolcs A, et al. Precision Medicine in Pancreatic Cancer: Patient-Derived Organoid Pharmacotyping Is a Predictive Biomarker of Clinical Treatment Response. *Clin Cancer Res.* 2 août 2022;28(15):3296-307.
269. Shields S, Conroy E, O'Grady T, McGoldrick A, Connor K, Ward MP, et al. BAG3 promotes tumour cell proliferation by regulating EGFR signal transduction pathways in triple negative breast

- cancer. *Oncotarget*. 28 févr 2018;9(21):15673-90.
270. Philip PA, Azar I, Xiu J, Hall MJ, Hendifar AE, Lou E, et al. Molecular Characterization of KRAS Wild-type Tumors in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 13 juin 2022;28(12):2704-14.
 271. Singh H, Keller RB, Kapner KS, Dilly J, Raghavan S, Yuan C, et al. Oncogenic drivers and therapeutic vulnerabilities in KRAS wild-type pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 18 juill 2023;CCR-22-3930.
 272. Ardalan B, Ciner A, Baca Y, Darabi S, Kasi A, Lou E, et al. Prognostic indicators of KRAS G12X mutations in pancreatic cancer. *JCO*. 1 févr 2023;41(4_suppl):735-735.
 273. Zajac O, Raingeaud J, Libanje F, Lefebvre C, Sabino D, Martins I, et al. Tumour spheres with inverted polarity drive the formation of peritoneal metastases in patients with hypermethylated colorectal carcinomas. *Nature Cell Biology*. mars 2018;20(3):296-306.
 274. Canet-Jourdan C, Pagès DL, Nguyen-Vigouroux C, Cartry J, Zajac O, Desterke C, et al. Patient-derived organoids identify an apico-basolateral polarity switch associated with survival in colorectal cancer. *J Cell Sci*. 15 juill 2022;135(14):jcs259256.
 275. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*. 7 juin 2019;364(6444):952-5.
 276. Doyle AD, Carvajal N, Jin A, Matsumoto K, Yamada KM. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun*. 9 nov 2015;6(1):8720.
 277. Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology*. 1 déc 2011;21(12):736-44.
 278. Wang X, He L, Wu YI, Hahn KM, Montell DJ. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol*. juin 2010;12(6):591-7.
 279. Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*. 1 avr 2002;62(7):2125-30.
 280. Pagès DL, Dornier E, de Seze J, Gontran E, Maitra A, Maciejewski A, et al. Cell clusters adopt a collective amoeboid mode of migration in confined nonadhesive environments. *Sci Adv*. 30 sept 2022;8(39):eabp8416.
 281. Prager GW, Taieb J, Fakih M, Ciardiello F, Van Cutsem E, Elez E, et al. Trifluridine-Tipiracil and Bevacizumab in Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 4 mai 2023;388(18):1657-67.
 282. van Renterghem AWJ, van de Haar J, Voest EE. Functional precision oncology using patient-derived assays: bridging genotype and phenotype. *Nat Rev Clin Oncol*. mai 2023;20(5):305-17.
 283. Jensen LH, Rogatto SR, Lindebjerg J, Havelund B, Abildgaard C, do Canto LM, et al. Precision medicine applied to metastatic colorectal cancer using tumor-derived organoids and in-vitro sensitivity testing: a phase 2, single-center, open-label, and non-comparative study. *J Exp Clin Cancer Res*. 5 mai 2023;42(1):115.
 284. Ooft SN, Weeber F, Schipper L, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, et al. Prospective experimental treatment of colorectal cancer patients based on organoid drug responses. *ESMO Open*. juin 2021;6(3):100103.
 285. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*. 23 2018;359(6378):920-6.

286. Tiriach H, Bucobo JC, Tzimas D, Grewel S, Lacombe JF, Rowehl LM, et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. *Gastrointest Endosc.* juin 2018;87(6):1474-80.
287. Narasimhan V, Wright JA, Churchill M, Wang T, Rosati R, Lannagan TRM, et al. Medium-throughput Drug Screening of Patient-derived Organoids from Colorectal Peritoneal Metastases to Direct Personalized Therapy. *Clin Cancer Res.* 15 juill 2020;26(14):3662-70.
288. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nature protocols.* 2020;15(10):3380-409.
289. Lee JH, Kim H, Lee SH, Ku JL, Chun JW, Seo HY, et al. Establishment of Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids from Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsies. *Gut Liver.* 15 juill 2022;16(4):625-36.
290. Cartry J, Bedja S, Boilève A. et al. Development of a living colorectal cancer organoid biobank for personalized medicine through fast and efficient drug testing. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023 Oct 25;42(1):281
291. Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, van Werkhoven E, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med.* 9 oct 2019;11(513).
292. Wang Y, Liu M, Zhang Y, Liu H, Han L. Recent methods of droplet microfluidics and their applications in spheroids and organoids. *Lab Chip.* 1 mars 2023;23(5):1080-96.
293. Tomasi RFX, Sart S, Champetier T, Baroud CN. Individual Control and Quantification of 3D Spheroids in a High-Density Microfluidic Droplet Array. *Cell Rep.* 26 mai 2020;31(8):107670.
294. Bajetta E, Carnaghi C, Somma L, Stampino CG. A pilot safety study of capecitabine, a new oral fluoropyrimidine, in patients with advanced neoplastic disease. *Tumori.* oct 1996;82(5):450-2.
295. Iglesias J. nab-Paclitaxel (Abraxane®): an albumin-bound cytotoxic exploiting natural delivery mechanisms into tumors. *Breast Cancer Research.* 23 juin 2009;11(1):S21.
296. Lambert JM, Berkenblit A. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Treatment. *Annu Rev Med.* 29 janv 2018;69:191-207.
297. Ramesh M, Ahlawat P, Srinivas NR. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomed Chromatogr.* janv 2010;24(1):104-23.
298. Sistonen J, Büchel B, Froehlich TK, Kummer D, Fontana S, Joerger M, et al. Predicting 5-fluorouracil toxicity: DPD genotype and 5,6-dihydrouracil:uracil ratio. *Pharmacogenomics.* sept 2014;15(13):1653-66.
299. Hogenson TL, Xie H, Phillips WJ, Toruner MD, Li JJ, Horn IP, et al. Culture media composition influences patient-derived organoid ability to predict therapeutic responses in gastrointestinal cancers. *JCI Insight.* 22 nov 2022;7(22):e158060.
300. Nicolle R, Gayet O, Bigonnet M, Roques J, Chanez B, Puleo F, et al. Relevance of biopsy-derived pancreatic organoids in the development of efficient transcriptomic signatures to predict adjuvant chemosensitivity in pancreatic cancer. *Translational Oncology.* 1 févr 2022;16:101315.
301. Farin HF, Mosa MH, Ndreshkjana B, Grebbin BM, Ritter B, Menche C, et al. Colorectal Cancer Organoid-Stroma Biobank Allows Subtype-Specific Assessment of Individualized Therapy Responses. *Cancer Discov.* 5 oct 2023;13(10):2192-211.
302. Raghavan S, Winter PS, Navia AW, Williams HL, DenAdel A, Lowder KE, et al. Microenvironment drives cell state, plasticity, and drug response in pancreatic cancer. *Cell.* 9 déc

2021;184(25):6119-6137.e26.

303. Bayle A, Bonastre J, Chaltiel D, Latino N, Rouleau E, Peters S, et al. ESMO Study on the Availability and Accessibility of Biomolecular Technologies in Oncology in Europe. *Annals of Oncology* [Internet]. 3 juill 2023 [cité 11 juill 2023];0(0). Disponible sur: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(23\)00760-3/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(23)00760-3/fulltext)
304. Merino M, Kasamon Y, Theoret M, Pazdur R, Kluetz P, Gormley N. Irreconcilable Differences: The Divorce Between Response Rates, Progression-Free Survival, and Overall Survival. *J Clin Oncol*. 20 mai 2023;41(15):2706-12.
305. Delord JP, Raymond E, Chaouche M, Ruffie P, Ducreux M, Faivre S, et al. A dose-finding study of gemcitabine and vinorelbine in advanced previously treated malignancies. *Ann Oncol*. janv 2000;11(1):73-9.
306. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 25 juill 2019;381(4):317-27.
307. Tan E, Hicks JK, Blue K, Kim RD, Carballido EM, Kim DW. Efficacy of olaparib therapy in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) with homologous recombination deficiency (HRD). *JCO*. 20 mai 2021;39(15_suppl):e16266-e16266.
308. Nicolle R, Gayet O, Duconseil P, Vanbrugghe C, Roques J, Bigonnet M, et al. A transcriptomic signature to predict adjuvant gemcitabine sensitivity in pancreatic adenocarcinoma. *Ann Oncol*. févr 2021;32(2):250-60.
309. Fraunhofer N, Chanez B, Teyssedou C, Pdac Chemo Sensitivity Prediction Working Group, Iovanna JL, Mitry E, et al. A Transcriptomic-Based Tool to Predict Gemcitabine Sensitivity in Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. mars 2023;164(3):476-480.e4.
310. Fraunhofer N, Teyssedou C, Pessaux P, Bigonnet M, Dusetti NJ, Iovanna J. Development and evaluation of 5FUCore, OxaliCore, and IrinoCore transcriptomic signatures for predicting response to individual drugs in the FOLFIRINOX regimen: Towards toxicity reduction and personalized chemotherapy in PDAC. *JCO*. 1 juin 2023;41(16_suppl):4141-4141.
311. Tian G, Kong D, Jiang T, Li L. Complications After Percutaneous Ultrasound-Guided Liver Biopsy. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2020;39(7):1355-65.
312. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. janv 2009;45(2):228-47.
313. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. oct 2021;21(10):653-67.
314. Luo X, Fong ELS, Zhu C, Lin QXX, Xiong M, Li A, et al. Hydrogel-based colorectal cancer organoid co-culture models. *Acta Biomater*. 15 sept 2021;132:461-72.
315. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 1 oct 2018;32(19-20):1267-84.
316. Szeto GL, Finley SD. Integrative Approaches to Cancer Immunotherapy. *Trends Cancer*. juill 2019;5(7):400-10.
317. Chakrabarti J, Koh V, So JBY, Yong WP, Zavros Y. A Preclinical Human-Derived Autologous Gastric Cancer Organoid/Immune Cell Co-Culture Model to Predict the Efficacy of Targeted Therapies. *J Vis Exp*. 6 juill 2021;(173).
318. Holokai L, Chakrabarti J, Lundy J, Croagh D, Adhikary P, Richards SS, et al. Murine- and Human-Derived Autologous Organoid/Immune Cell Co-Cultures as Pre-Clinical Models of Pancreatic

- Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 17 déc 2020;12(12):3816.
319. Magré L, Verstegen MMA, Buschow S, van der Laan LJW, Peppelenbosch M, Desai J. Emerging organoid-immune co-culture models for cancer research: from oncoimmunology to personalized immunotherapies. *J Immunother Cancer*. mai 2023;11(5):e006290.
 320. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*. 06 2018;174(6):1586-1598.e12.
 321. Schnalzger TE, de Groot MH, Zhang C, Mosa MH, Michels BE, Röder J, et al. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *EMBO J*. 17 juin 2019;38(12):e100928.
 322. Juiz N, Elkaoutari A, Bigonnet M, Gayet O, Roques J, Nicolle R, et al. Basal-like and classical cells coexist in pancreatic cancer revealed by single-cell analysis on biopsy-derived pancreatic cancer organoids from the classical subtype. *FASEB J*. sept 2020;34(9):12214-28.
 323. Cancer statistics, 2019 - PubMed [Internet]. 2020 [cité 3 oct 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30620402/>
 324. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 15 mai 2012;72(10):2457-67.
 325. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. mai 2012;2(5):401-4.
 326. Lowery MA, Jordan EJ, Basturk O, Ptashkin RN, Zehir A, Berger MF, et al. Real-Time Genomic Profiling of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Potential Actionability and Correlation with Clinical Phenotype. *Clin Cancer Res*. 15 oct 2017;23(20):6094-100.
 327. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol*. avr 2020;21(4):508-18.
 328. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 26 févr 2015;518(7540):495-501.
 329. Tarabay A, Hollebecque A, Smolenschi C, Antoun L, Klotz C, Fuerea A, et al. Molecular precision medicine in pancreatic cancer: A single-center experience. *JCO*. 1 févr 2022;40(4_suppl):605-605.
 330. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol*. 1 sept 2018;29(9):1895-902.
 331. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med*. 22 2018;378(8):731-9.
 332. Li HS, Yang K, Wang Y. Remarkable response of BRAFV600E-mutated metastatic pancreatic cancer to BRAF/MEK inhibition: a case report. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 13 sept 2021;10:goab031.
 333. Shroff RT, Hendifar A, McWilliams RR, Geva R, Epelbaum R, Rolfe L, et al. Rucaparib Monotherapy in Patients With Pancreatic Cancer and a Known Deleterious BRCA Mutation. *JCO Precis Oncol*. 2018;2018:PO.17.00316.
 334. Reiss KA, Mick R, O'Hara MH, Teitelbaum U, Karasic TB, Schneider C, et al. Phase II Study of Maintenance Rucaparib in Patients With Platinum-Sensitive Advanced Pancreatic Cancer and a

- Pathogenic Germline or Somatic Variant in BRCA1, BRCA2, or PALB2. *J Clin Oncol.* 1 août 2021;39(22):2497-505.
335. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271-82.
336. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2020;38(1):1-10.
337. Subbiah V, Cassier PA, Siena S, Garralda E, Paz-Ares L, Garrido P, et al. Pan-cancer efficacy of pralsetinib in patients with RET fusion-positive solid tumors from the phase 1/2 ARROW trial. *Nat Med.* août 2022;28(8):1640-5.
338. Subbiah V, Wolf J, Konda B, Kang H, Spira A, Weiss J, et al. Tumour-agnostic efficacy and safety of selpercatinib in patients with RET fusion-positive solid tumours other than lung or thyroid tumours (LIBRETTO-001): a phase 1/2, open-label, basket trial. *Lancet Oncol.* oct 2022;23(10):1261-73.
339. Schram AM, Odintsov I, Espinosa-Cotton M, Khodos I, Sisso WJ, Mattar MS, et al. Zenocutuzumab, a HER2xHER3 Bispecific Antibody, Is Effective Therapy for Tumors Driven by NRG1 Gene Rearrangements. *Cancer Discov.* 2 mai 2022;12(5):1233-47.
340. Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro G, Melisi D, Al-Rajabi R, et al. Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2020;21(5):671-84.
341. Javle M, Roychowdhury S, Kelley RK, Sadeghi S, Macarulla T, Weiss KH, et al. Infigratinib (BGJ398) in previously treated patients with advanced or metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements: mature results from a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* oct 2021;6(10):803-15.
342. Goyal L, Meric-Bernstam F, Hollebecque A, Valle JW, Morizane C, Karasic TB, et al. Futibatinib for FGFR2-Rearranged Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *N Engl J Med.* 19 janv 2023;388(3):228-39.
343. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 16 mai 2019;380(20):1929-40.
344. Di Leo A, Johnston S, Lee KS, Ciruelos E, Lønning PE, Janni W, et al. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* janv 2018;19(1):87-100.
345. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 1 août 2015;386(9992):444-51.
346. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* mai 2018;19(5):603-15.
347. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 20 juin 2013;368(25):2385-94.
348. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, et al. Alectinib versus Crizotinib in

- Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 31 août 2017;377(9):829-38.
349. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 27 mars 2014;370(13):1189-97.
350. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 14 févr 2019;380(7):617-28.
351. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 19 févr 2015;372(8):724-34.
352. Qin S, Bai Y, Wang Z, Chen Z, Xu R, Xu J, et al. Nimotuzumab combined with gemcitabine versus gemcitabine in K-RAS wild-type locally advanced or metastatic pancreatic cancer: A prospective, randomized-controlled, double-blinded, multicenter, and phase III clinical trial. *JCO.* 10 juin 2022;40(17_suppl):LBA4011-LBA4011.
353. Vasseur D, Sassi H, Bayle A, Tagliamento M, Besse B, Marzac C, et al. Next-Generation Sequencing on Circulating Tumor DNA in Advanced Solid Cancer: Swiss Army Knife for the Molecular Tumor Board? A Review of the Literature Focused on FDA Approved Test. *Cells.* janv 2022;11(12):1901.
354. Rolfo C, Manca P, Salgado R, Van Dam P, Dendooven A, Ferri Gandia J, et al. Multidisciplinary molecular tumour board: a tool to improve clinical practice and selection accrual for clinical trials in patients with cancer. *ESMO Open.* 2018;3(5):e000398.
355. Meric-Bernstam F, Brusco L, Daniels M, Wathoo C, Bailey AM, Strong L, et al. Incidental germline variants in 1000 advanced cancers on a prospective somatic genomic profiling protocol. *Ann Oncol.* mai 2016;27(5):795-800.
356. Schrader KA, Cheng DT, Joseph V, Prasad M, Walsh M, Zehir A, et al. Germline Variants in Targeted Tumor Sequencing Using Matched Normal DNA. *JAMA Oncol.* janv 2016;2(1):104-11.
357. Esagian SM, Grigoriadou GI, Nikas IP, Boikou V, Sadow PM, Won JK, et al. Comparison of liquid-based to tissue-based biopsy analysis by targeted next generation sequencing in advanced non-small cell lung cancer: a comprehensive systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* août 2020;146(8):2051-66.
358. Recondo G, Mahjoubi L, Maillard A, Loriot Y, Bigot L, Facchinetti F, et al. Feasibility and first reports of the MATCH-R repeated biopsy trial at Gustave Roussy. *npj Precis Onc.* 8 sept 2020;4(1):1-8.
359. Prud'homme C, Deschamps F, Allorant A, Massard C, Hollebecque A, Yevich S, et al. Image-guided tumour biopsies in a prospective molecular triage study (MOSCATO-01): What are the real risks? *Eur J Cancer.* nov 2018;103:108-19.
360. Bayle A, Peyraud F, Belcaid L, Brunet M, Aldea M, Clodion R, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting actionable alterations according to ESCAT in patients with advanced cancer: A study from the French National Center for Precision Medicine (PRISM). *Ann Oncol.* 16 sept 2022;S0923-7534(22)04147-3.
361. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov.* avr 2021;11(4):858-73.
362. Nakamura Y, Taniguchi H, Ikeda M, Bando H, Kato K, Morizane C, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan GI-SCREEN and GOZILA studies. *Nat Med.* déc 2020;26(12):1859-64.
363. Sugimori M, Sugimori K, Tsuchiya H, Suzuki Y, Tsuyuki S, Kaneta Y, et al. Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy.

Cancer Sci. janv 2020;111(1):266-78.

364. Von Hoff DD. There are no bad anticancer agents, only bad clinical trial designs--twenty-first Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. Clin Cancer Res. mai 1998;4(5):1079-86.
365. Chaffin Z. Ces médicaments innovants qui ne sont pas disponibles en France pour soigner les patients. Le Monde. 4 juin 2023;

Title : Precision medicine for pancreatic cancer

Keywords : pancreatic cancer, metastases, organoids, functional precision medicine, KRAS

Abstract :

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an increasingly common cancer with limited therapeutic options and a poor prognosis. Conventional chemotherapies have limited efficacy, emphasizing the need for new therapeutic approaches. Genomic precision medicine, made possible by advances in high-throughput sequencing technologies, has seen significant development in oncology over the past decade. However, the utility of molecular profiling in PDAC has not yet been established, despite improved overall survival when patients receive molecularly matched treatment. Functional precision medicine (FPM) is another promising strategy that relies on testing a panel of drugs on live tumor cells to identify the sensitivity and resistance profile of each tumor. Organoids are robust and promising tools for assessing a specific tumor's sensitivity to various drugs and identifying the best therapeutic option for each patient.

Three axes were developed in this thesis. First, a translational axis evaluated the impact of organoids as tools for functional precision medicine in pancreatic cancer. The primary objective of this project was to establish a framework for integrating organoid-based drug sensitivity testing into the clinical management of PDAC patients. Organoid responses to a panel of anticancer drugs were correlated with clinical responses in patients, suggesting potential clinical benefits. Additionally, the contribution of organoids to preclinical studies was tested by assessing the efficacy of a *KRAS*^{G12D} inhibitor, MRTX1133, in monotherapy and in combination with other inhibitors. The combination of MRTX1133 and anti-EGFR proved to be the most promising.

Secondly, a clinical axis assessed the impact of *KRAS* mutation in PDAC in terms of clinical and molecular characteristics, treatment response, and prognosis, particularly in cases where targeted treatment was received. Comparing non-mutated *KRAS* tumors to mutated *KRAS* tumors revealed clinical differences and better prognosis for non-mutated tumors. Furthermore, the impact of different *KRAS* mutated codons was studied by comparing *KRAS*^{G12} mutated tumors versus other *KRAS* mutations. *KRAS*^{G12} mutations were associated with a worse prognosis, although there was no difference in treatment sensitivity.

Finally, a fundamental axis investigated the invasive phenotype of PDAC. A new "onco-morphogenetic" program was identified as a mediator of metastatic dissemination in colorectal cancers (CRC) through TSIPs (tumor spheres with reversed polarity, malignant tumor intermediates). The presence of TSIPs in pancreatic cancers was confirmed, and their transcriptional program and chemosensitivity were characterized using organoids. However, the clinical and prognostic impact of TSIP presence in pancreatic cancer appears to be minor.

In conclusion, this doctoral project aimed to develop a comprehensive framework for the use of PDOs as a tool for modeling PDAC (fundamental axis), selecting personalized treatments, and conducting preclinical drug tests (translational and clinical axes). By bridging the gap between preclinical trials and clinical practice, this project aims to bring us closer to precision medicine in managing PDAC.

Titre : Médecine de précision dans le cancer du pancréas

Mots clés : cancer du pancréas, métastases, organoïdes, médecine fonctionnelle de précision, *KRAS*

Résumé :

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est un cancer de plus en plus fréquent, dont les options thérapeutiques sont limitées et le pronostic mauvais. Les chimiothérapies conventionnelles ont une efficacité limitée, ce qui souligne la nécessité de nouvelles approches thérapeutiques. La médecine de précision génomique, rendue permise par l'amélioration des techniques de séquençage haut débit, a connu un essor important en oncologie au cours de la dernière décennie. Néanmoins, l'utilité du profilage moléculaire dans le PDAC n'a pas encore été établie, malgré l'amélioration de la survie globale lorsque les patients reçoivent un traitement adapté sur le plan moléculaire. La médecine de précision fonctionnelle (MPF) est une autre stratégie prometteuse qui repose sur des tests d'un panel de médicaments sur des cellules tumorales vivantes afin d'identifier le profil de sensibilité et de résistance de chaque tumeur. Les organoïdes sont à ce titre des outils robustes et prometteurs pour tester la sensibilité d'une tumeur donnée à divers médicaments et identifier la meilleure option thérapeutique pour chaque patient.

Trois axes ont été développés dans cette thèse. Premièrement, un axe translationnel qui a évalué l'impact des organoïdes comme outils pour la médecine de précision fonctionnelle dans le cancer du pancréas. L'objectif principal de ce projet était d'établir un cadre pour intégrer les tests de sensibilité aux médicaments basés sur les organoïdes dans la gestion clinique des patients atteints de PDAC. La réponse des organoïdes à un panel de médicaments anticancéreux a été corrélée avec les réponses observées en clinique chez les patients, suggérant un potentiel bénéfice clinique pour les patients. Par ailleurs, l'apport des organoïdes aux études précliniques a été testé en testant l'efficacité d'un inhibiteur de *KRAS*_{G12D}, le MRTX1133, en monothérapie qu'en combinaison avec d'autres

inhibiteurs. La combinaison MRTX1133 et anti-EGFR s'est avérée la plus prometteuse.

Deuxièmement, un axe clinique qui a évalué l'impact de la mutation *KRAS* dans le PDAC, en termes de caractéristiques cliniques, moléculaires, réponse au traitement et de pronostic, notamment si un traitement ciblé a été reçu. En comparant les tumeurs *KRAS* non-mutées et les tumeurs *KRAS* mutées, on a montré des différences cliniques et également un pronostic meilleur pour les tumeurs non mutées. Par ailleurs, l'impact des différents codons mutés de *KRAS* a été étudié en comparant tumeurs mutées *KRAS*_{G12} vs *KRAS*_{autre}. Les mutations *KRAS*_{G12} se sont révélées de plus mauvais pronostic, cependant sans différence de sensibilité aux traitements.

Enfin, un axe fondamental pour étudier le phénotype invasif des PDAC. En effet, un nouveau programme « onco-morphogénétique » a été identifié comme médiateur de la dissémination métastatique des cancers colorectaux (CRC) via des TSIP (sphères tumorales à polarité inversée, intermédiaires tumoraux malins). Nous avons pu mettre en évidence la présence de TSIP dans les cancers du pancréas, et caractérisé leur programme transcriptionnel ainsi que leur chimiosensibilité à l'aide d'organoïdes. L'impact clinique et pronostic de la présence de TSIP dans le cancer du pancréas ne semble néanmoins pas majeur.

Ainsi, ce projet de doctorat a visé à développer un cadre complet pour l'utilisation des PDO comme outil de modélisation des PDAC (axe fondamental), de sélection de traitements personnalisés et de tests de médicaments en pré-cliniques (axe translationnel et clinique). En comblant le fossé entre les essais précliniques et la pratique clinique, ce projet vise à nous rapprocher de la médecine de précision dans la gestion des PDAC.