

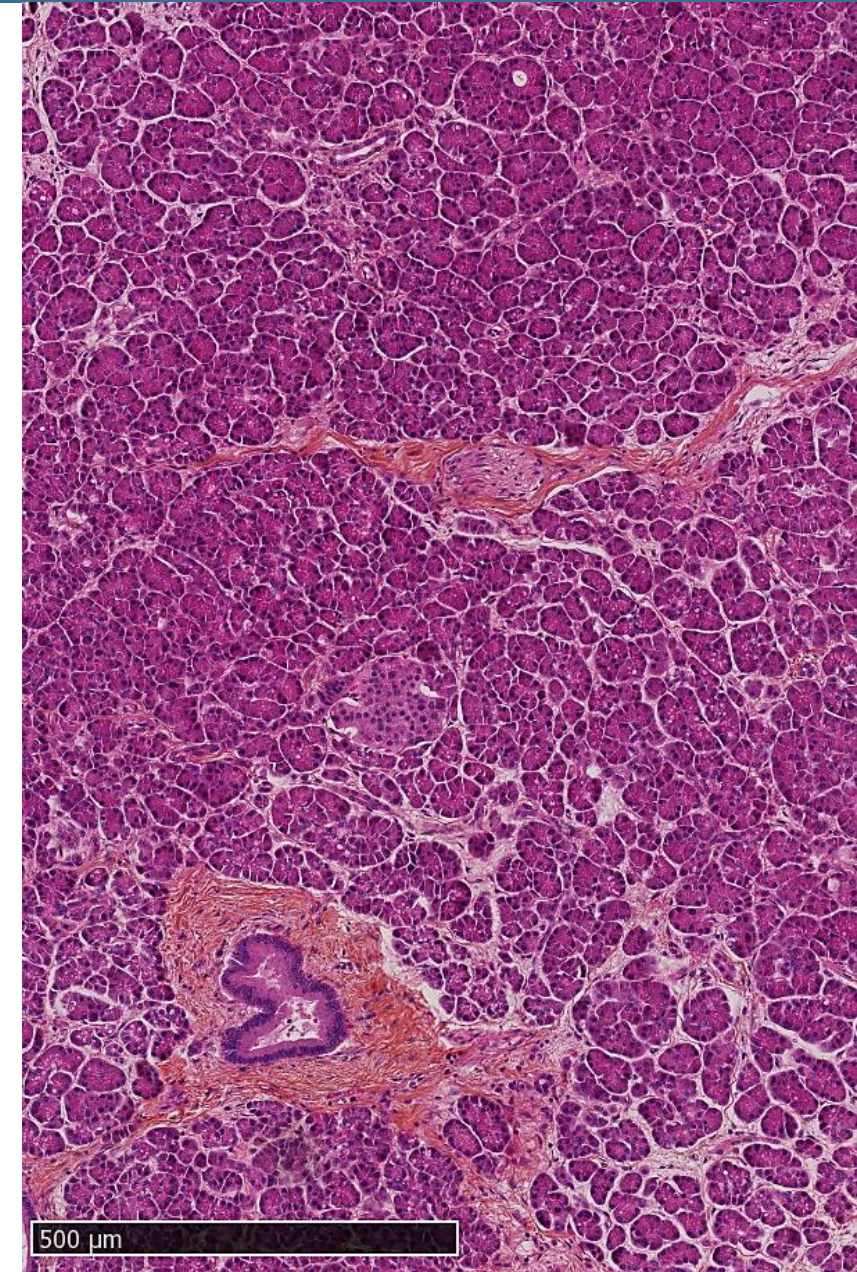
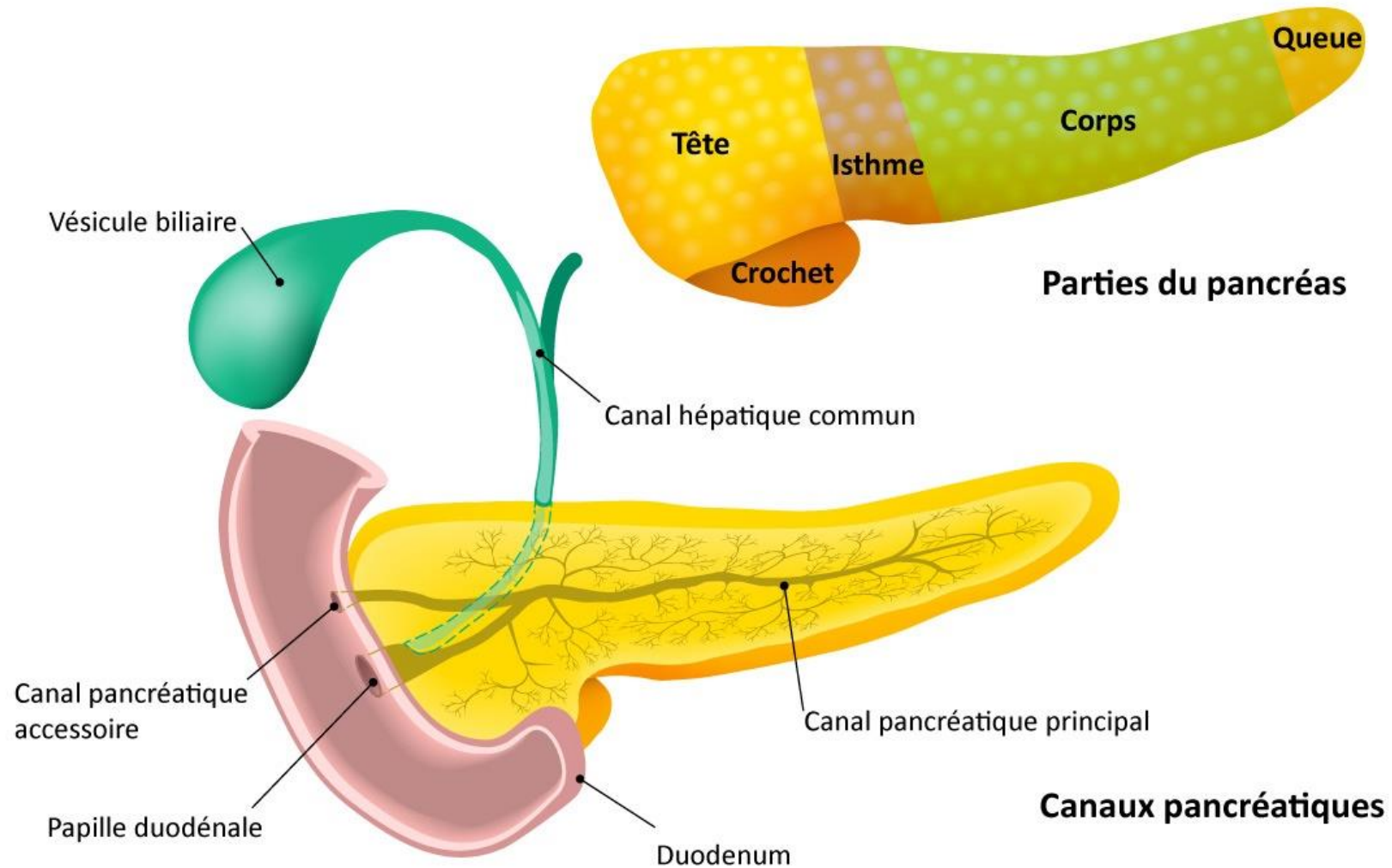
PAC-MA

Impact pronostique d'une signature immunomorphologique intégrant marqueurs immunitaires, fibroblastiques et tumoraux

PAC-MA : Study of the tumor stro**MA** of pancreatic ductal adenocarcinomas on tissue **MicroA**rrays

Franck Monnien - 15/06/2023 - Congrès AFH - Dijon

Anatomie et histologie du pancréas



Anatomie et histologie du pancréas

Ilot de Langerhans

Acinus

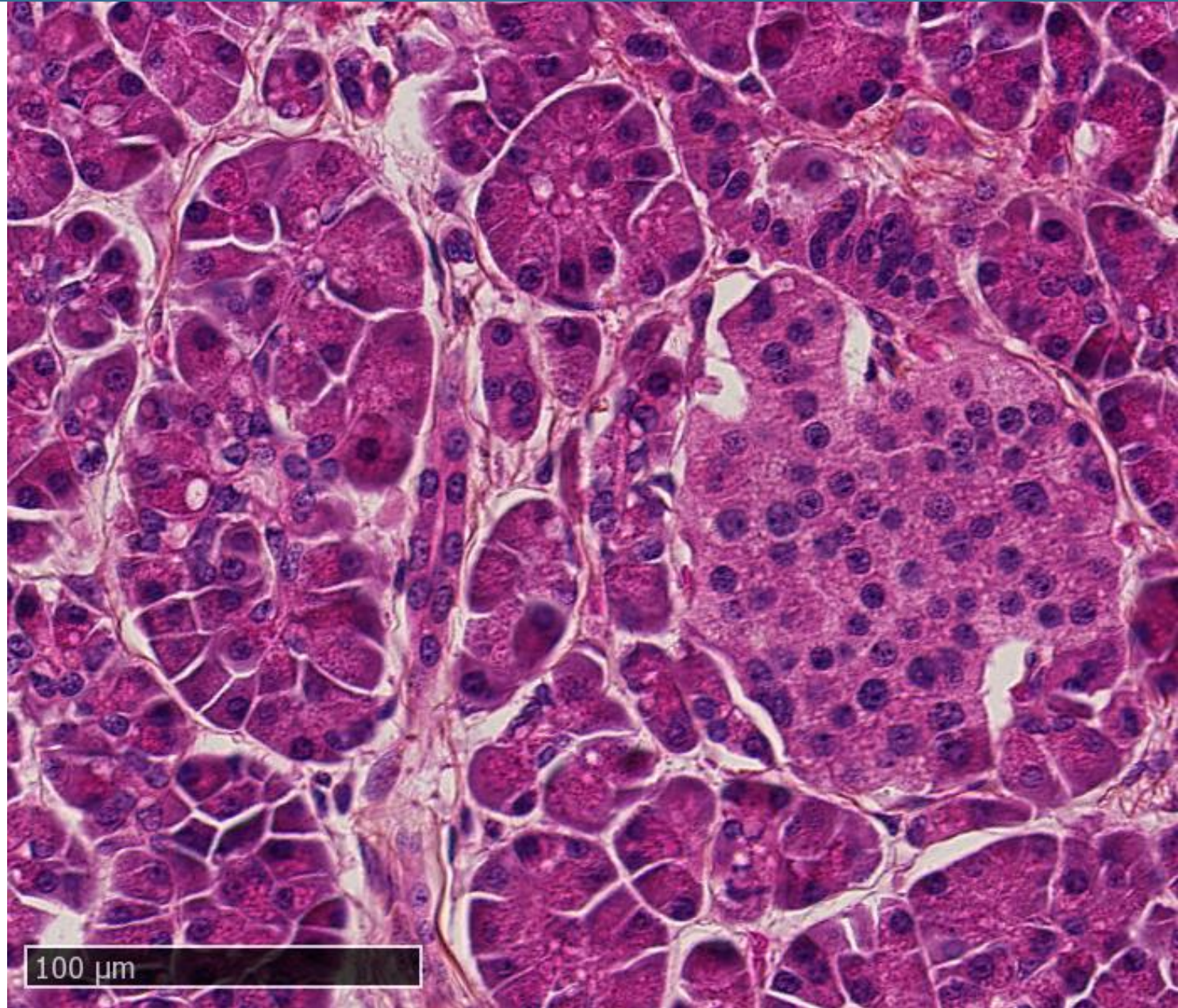
Cellule acinaire

Cytoplasme basal basophile

Grains de sécrétion acidophile

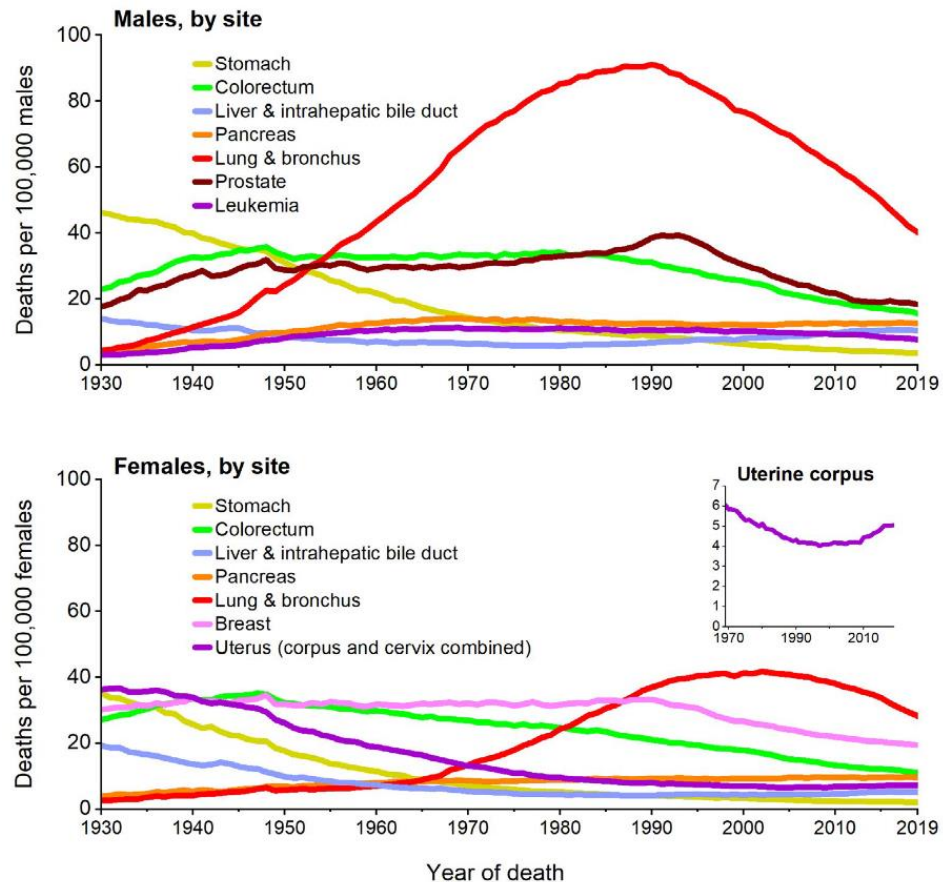
Cellule centro-acineuse

Canal intercalaire



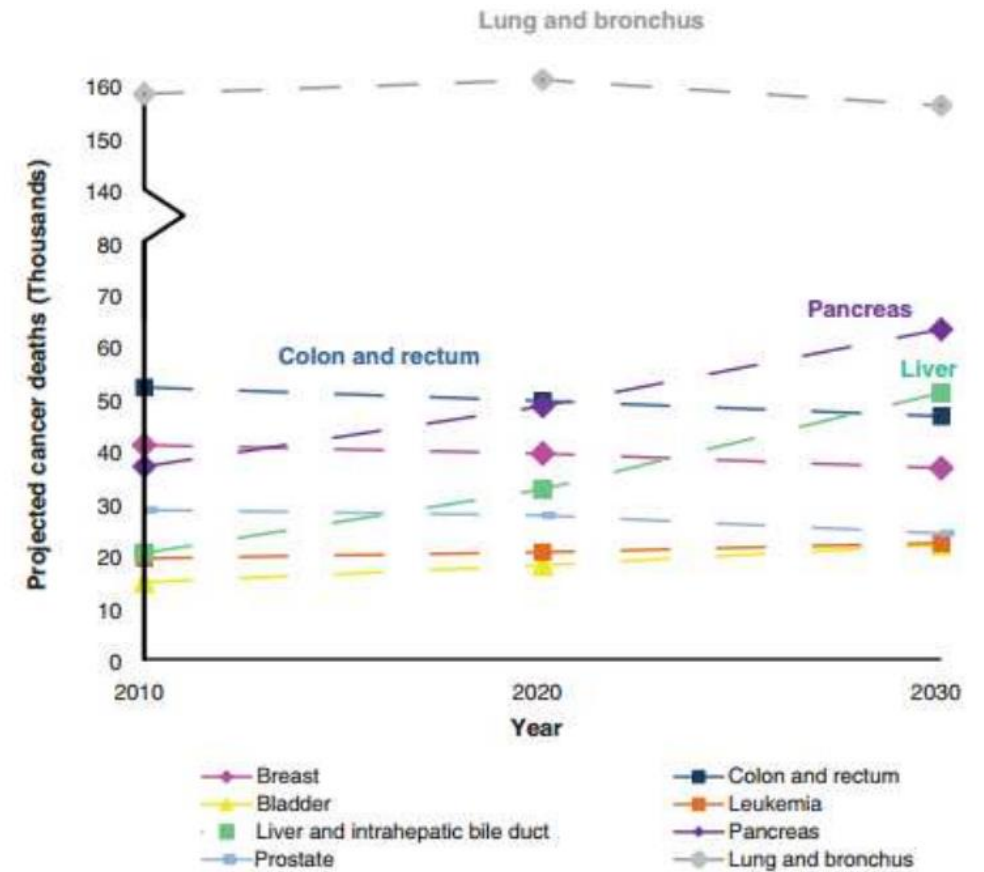
Épidémiologie du cancer du pancréas

Tendances des taux de mortalité par cancer et par sexe aux États-Unis de 1930 à 2019



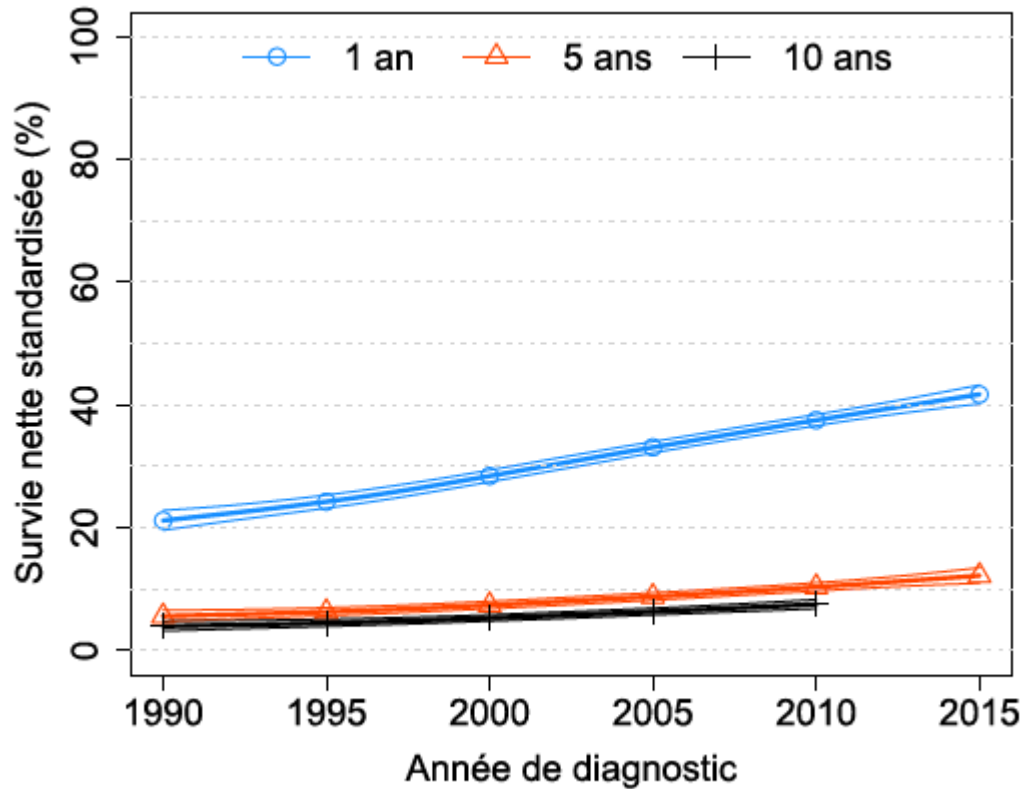
Siegel et al. 2022

Estimation de la mortalité liée aux principales causes de décès par cancer en 2030



Rahib et al. 2014

Pronostic



Données INCa, 2020

Symptômes peu spécifiques

Découverte souvent tardive

Environ 20% de patients opérables

Pronostic très défavorable

Stratification ? Biopsie pré-thérapeutique ?

Stratification du risque

Stadification TNM

- cTNM (imagerie) ou
- Conditionne l'accès à une résection
- pTNM (sur pièce opératoire, meilleure

Marge de résection pour les 20% opérés

Survie à 5 ans	
M+	1-2%
Localement avancé (Stade III)	10%
Opérable (stade I et II, rarement stade III)	15-20%



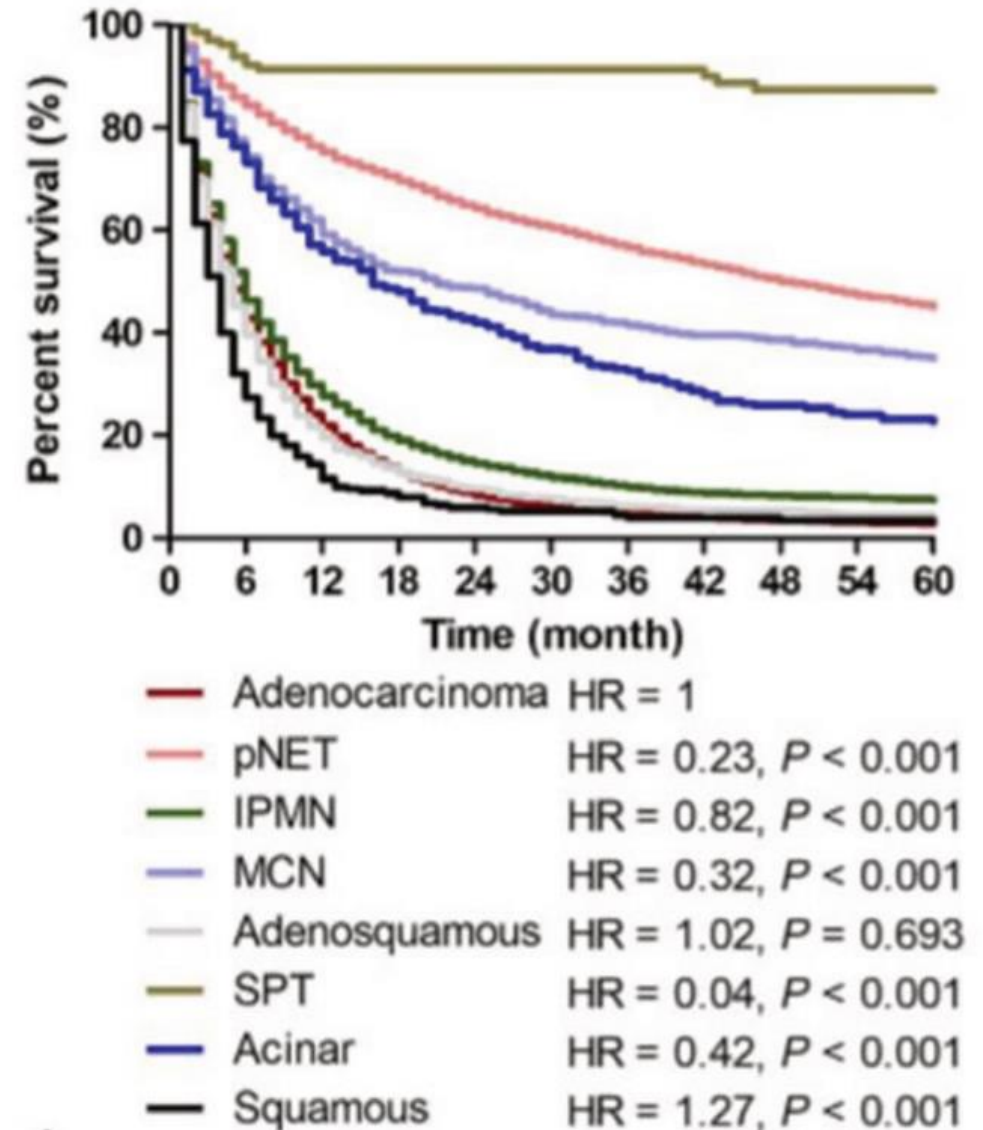
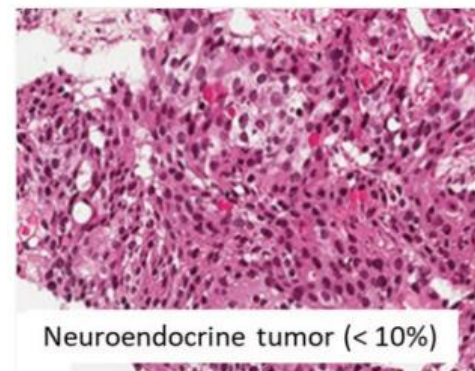
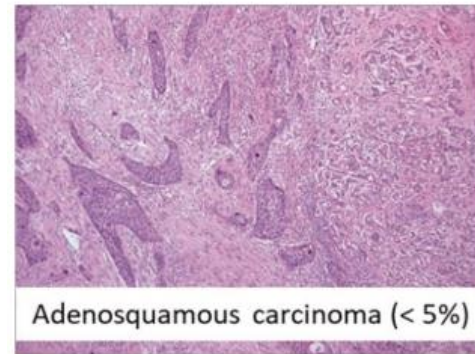
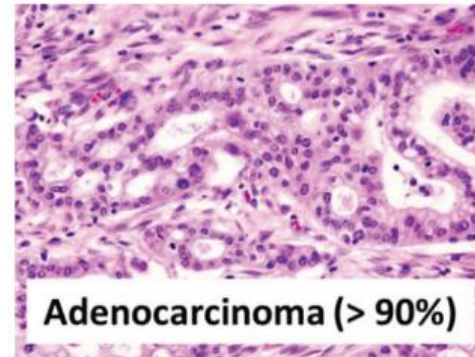
20% opérables

Objectif 1

Nécessité de rechercher d'autres approches pour une meilleure stratification applicable en situation néo-adjuvante

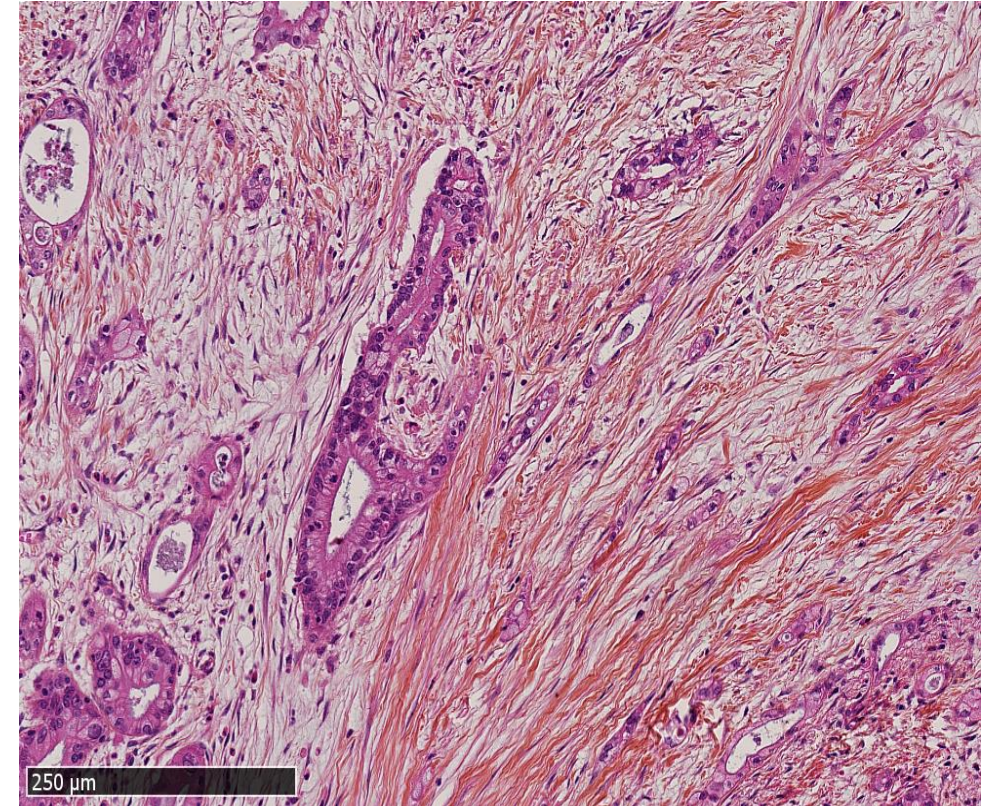
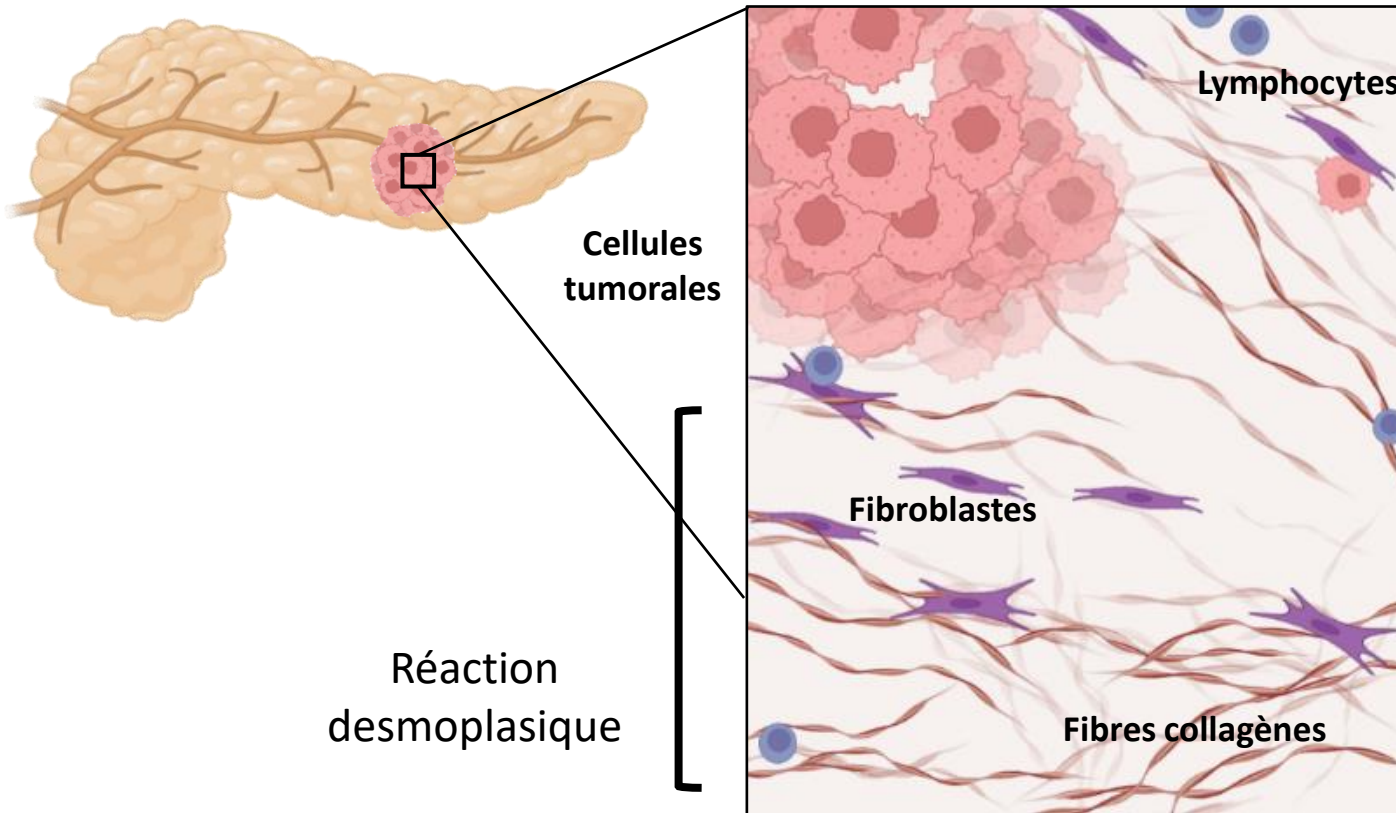
Histologie du cancer du pancréas

- 90% des cancers sont des adénocarcinomes canalaire (ADC)
- simplification du modèle en se concentrant sur ce type histologique



L'adénocarcinome canalaire

Volume tumoral constitué de cellules tumorales et d'une importante réaction stromale composée de fibroblastes associés au cancer (CAFs), cellules immunitaires, fibres collagènes

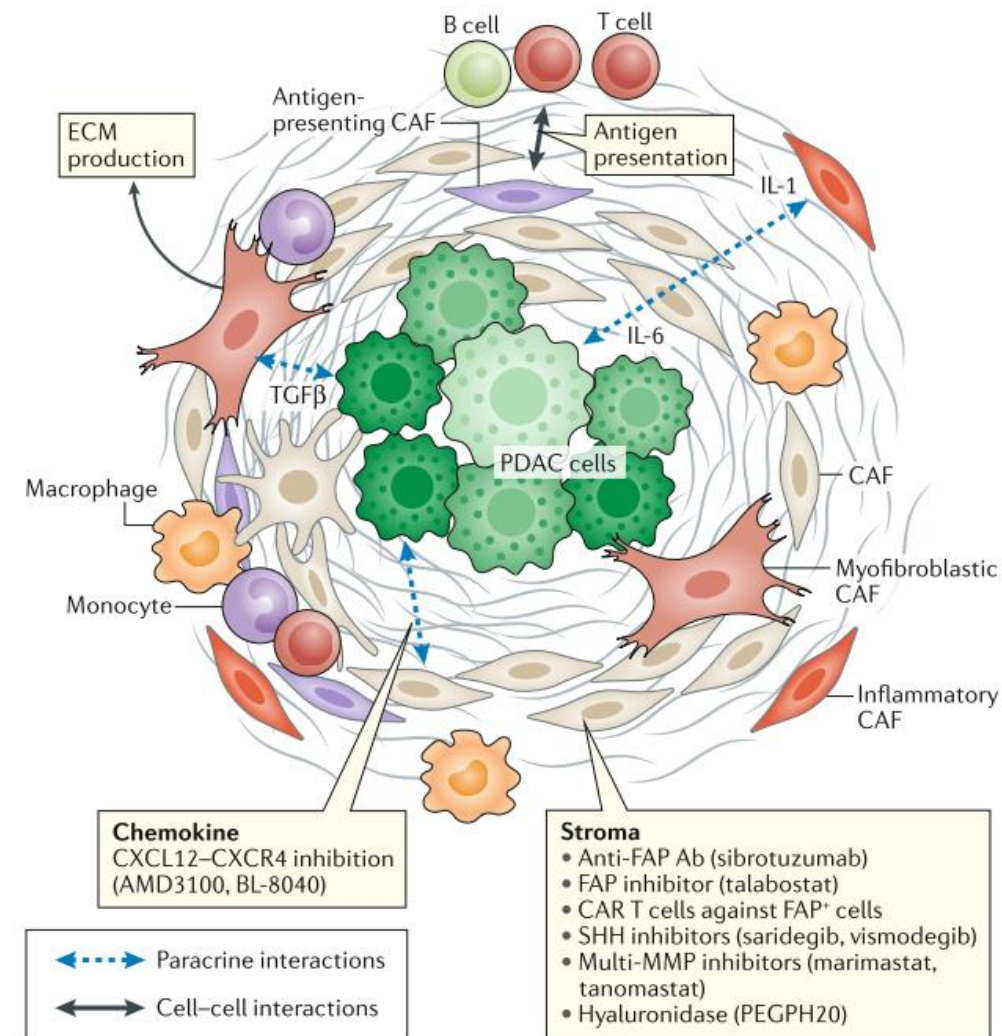


Microenvironnement du cancer du pancréas

- Implication de cette réaction stromale dans la résistance au traitement
- Rôle des CAF dans la croissance tumorale, la suppression immunitaire et la dissémination métastatique
- Hétérogénéité des CAFs
- Interaction avec le compartiment immunitaire

Objectif 2

Une meilleure compréhension des mécanismes régissant les CAFs serait utile pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et trouver des stratégies pour reprogrammer le micro-environnement tumoral (TME).



Oncogénèse de l'ADC du pancréas

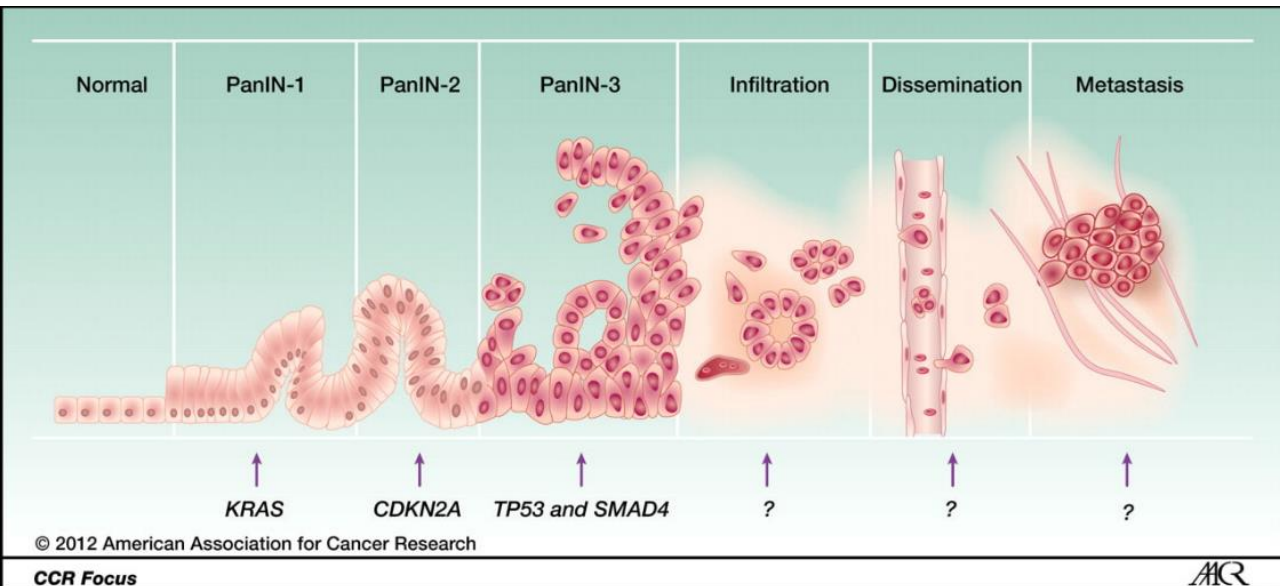


Telomere Shortening

KRAS2

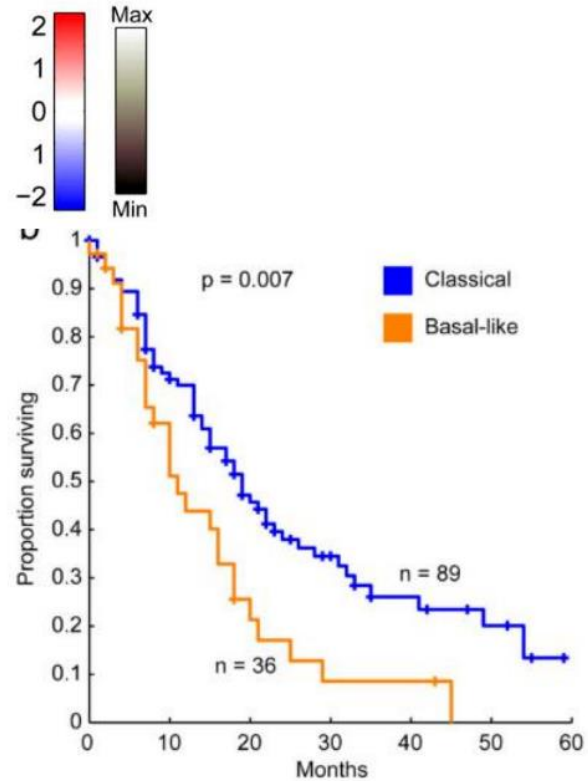
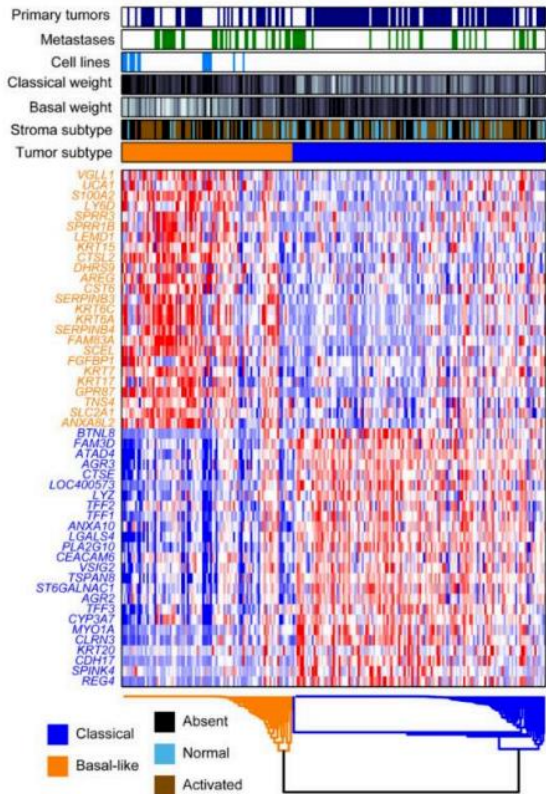
CDKN2A

TP53
SMAD4



Iacobuzio-Donahue et al. 2012

Classifications moléculaires



Moffit et al. 2015

Coûteux

Peu de matériel sur biopsie

Bulk

Classifications

Moffit et al.: $n = 206$; microarray (145 primary and 61 metastatic)

- Median cellularity unknown
- Validated using RNAseq in 15 + 40 PDXs and cell lines
- Transcripts found in normal pancreas and stroma excluded from analysis

TCGA: $n = 150$; primary PDAC

- Median cellularity unknown
- No histological variants
- Median cellularity 33%

Collisson et al.: $n = 85$; primary PDAC

- Microdissected epithelium
- No histological variants
- Median cellularity not applicable

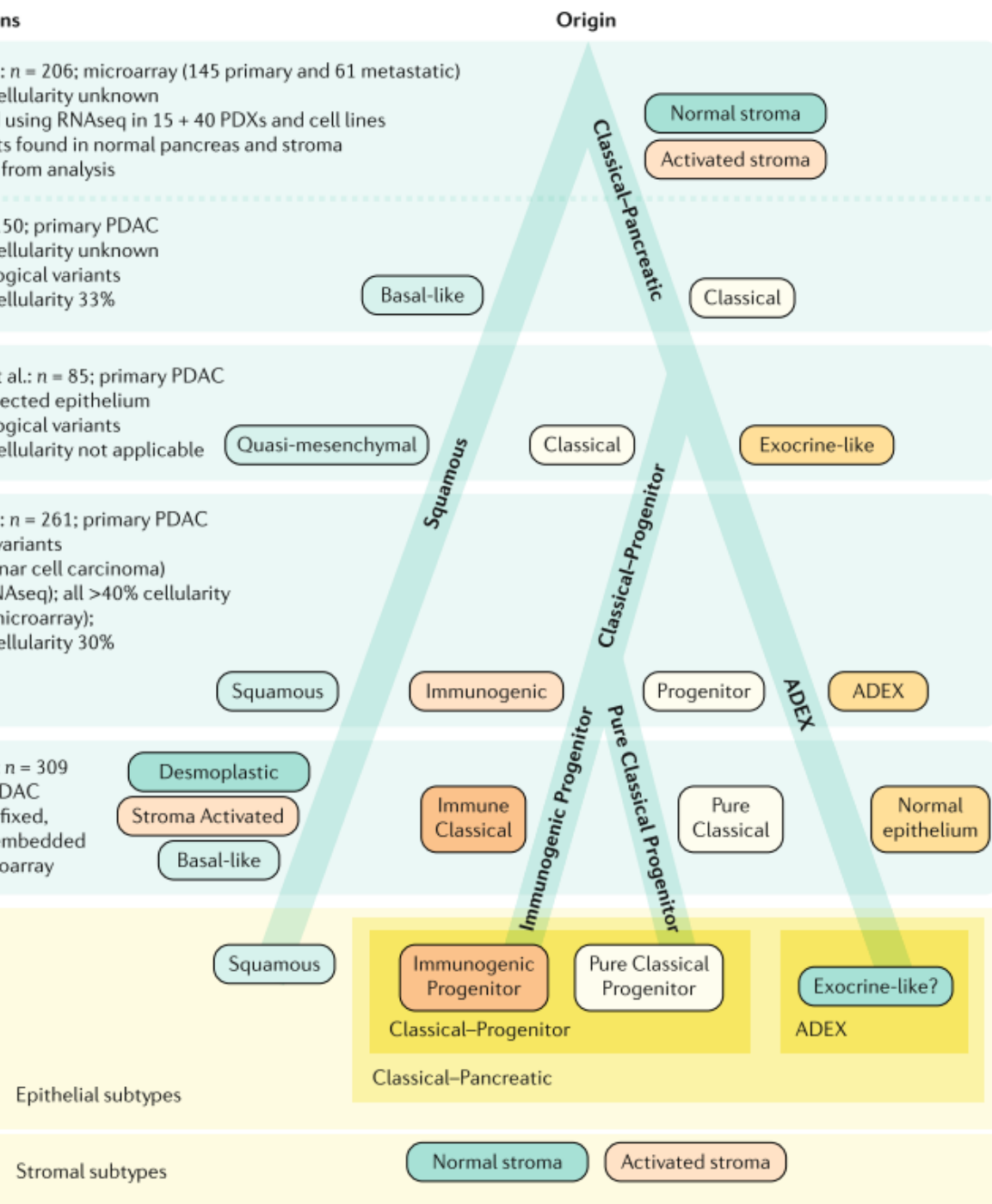
Bailey et al.: $n = 261$; primary PDAC

- Includes variants ($n = 2$; acinar cell carcinoma)
- $n = 87$ (RNAseq); all >40% cellularity
- $n = 261$ (microarray); median cellularity 30%

Puleo et al.: $n = 309$

- Primary PDAC
- Formalin-fixed, paraffin-embedded
- RNA microarray

Harmonized nomenclature

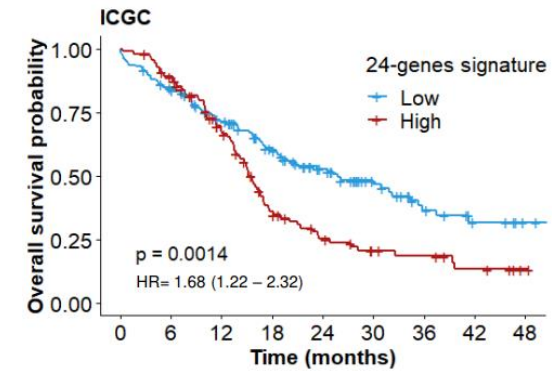
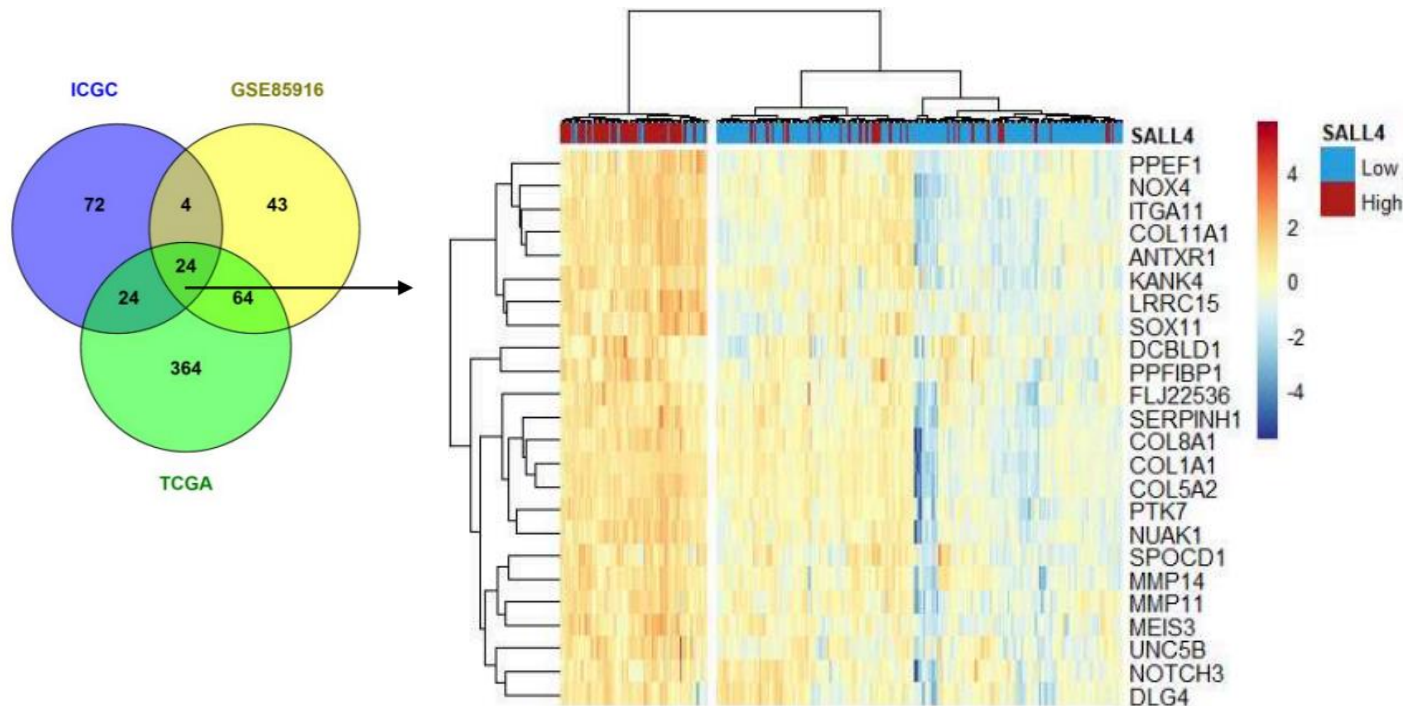


- Facteur de transcription
- *Kroemer et al. 2018* montrent l'immunogénicité de SALL4 et identifient deux peptides comme cibles potentielles pour la médecine personnalisée (cancer germinale, gastro-intestinal et myéloïde)
- Protéine conférant la pluripotence aux cellules souches hématopoïétiques.
- Détectable par immunohistochimie (IHC) dans les cellules germinales
- Utilisée par les pathologistes pour diagnostiquer les cancers germinaux

Sélection de marqueurs *in silico*

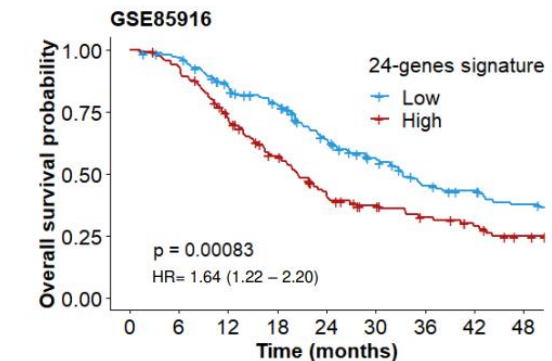
Signature liée à SALL4 (Vienot et al. 2023)

Bases de données transcriptomiques



Number at risk

Time (months)	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Low	145	120	95	71	49	31	19	11	7
High	112	97	64	30	18	11	9	5	1



Number at risk

Time (months)	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Low	155	147	123	105	79	62	46	41	34
High	133	123	92	67	45	35	28	22	16

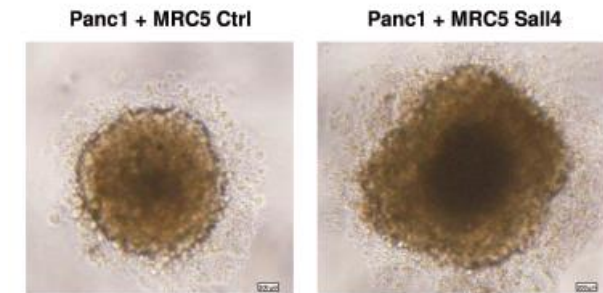
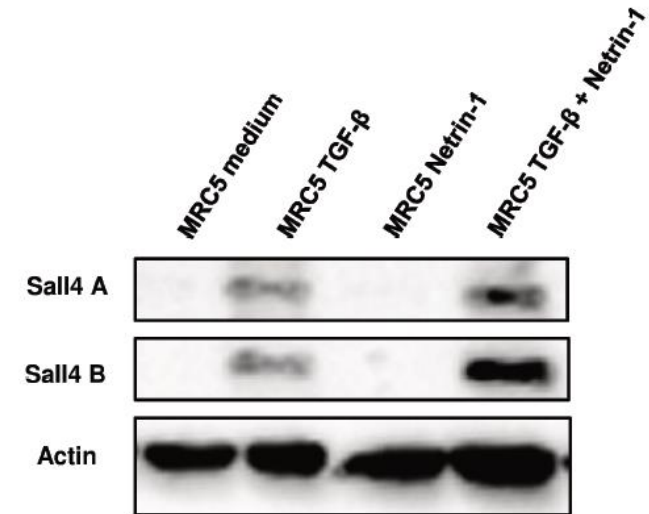
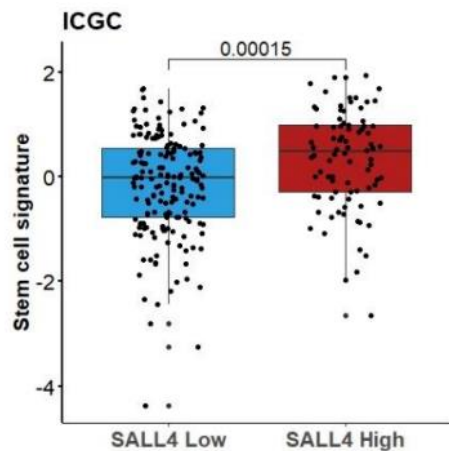
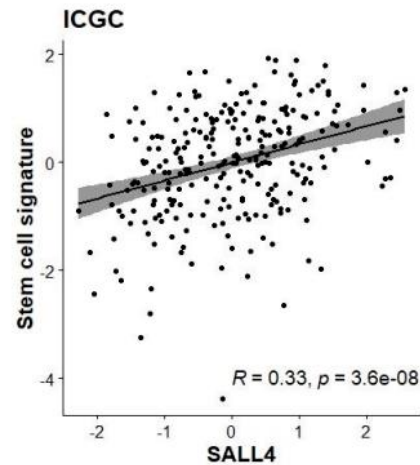
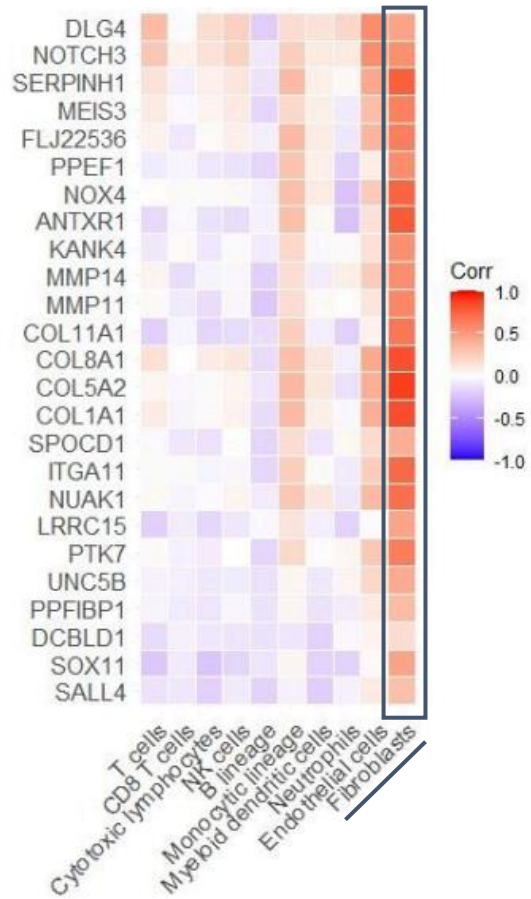
Pas de profils mutationnel particulier

Valeur pronostique supérieurs aux classifications (Multivarié)

Sélection de marqueurs *in silico*

Signature liée à SALL4 (Vienot et al. 2023)

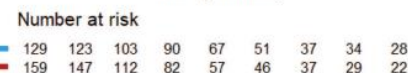
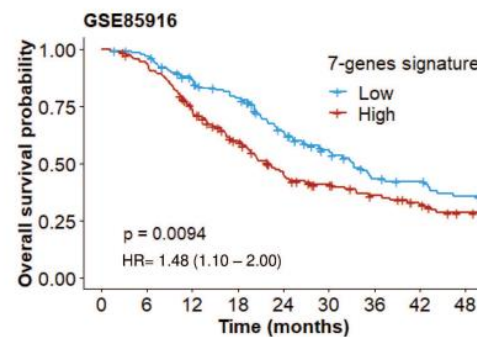
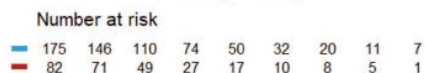
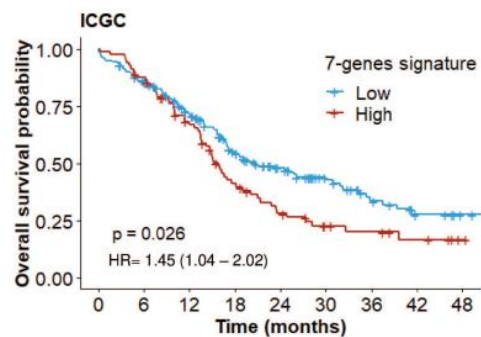
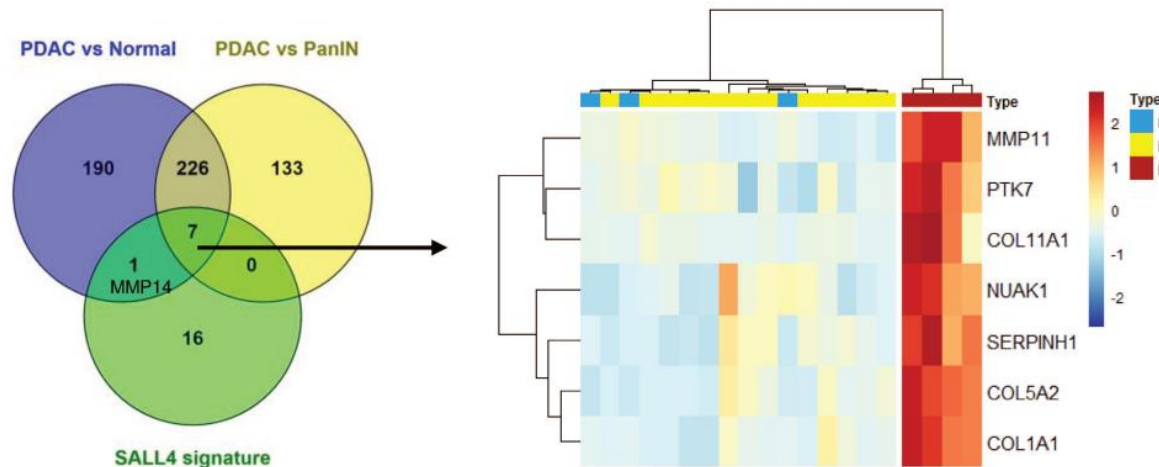
Corrélée à une signature fibroblastique et CSCs



Sélection de marqueurs *in silico*

Signature liée à SALL4 (Vienot et al. 2023)

Spécificité



IHC CAFs :

PTK7

HSP47

LRRC15

+ FAP

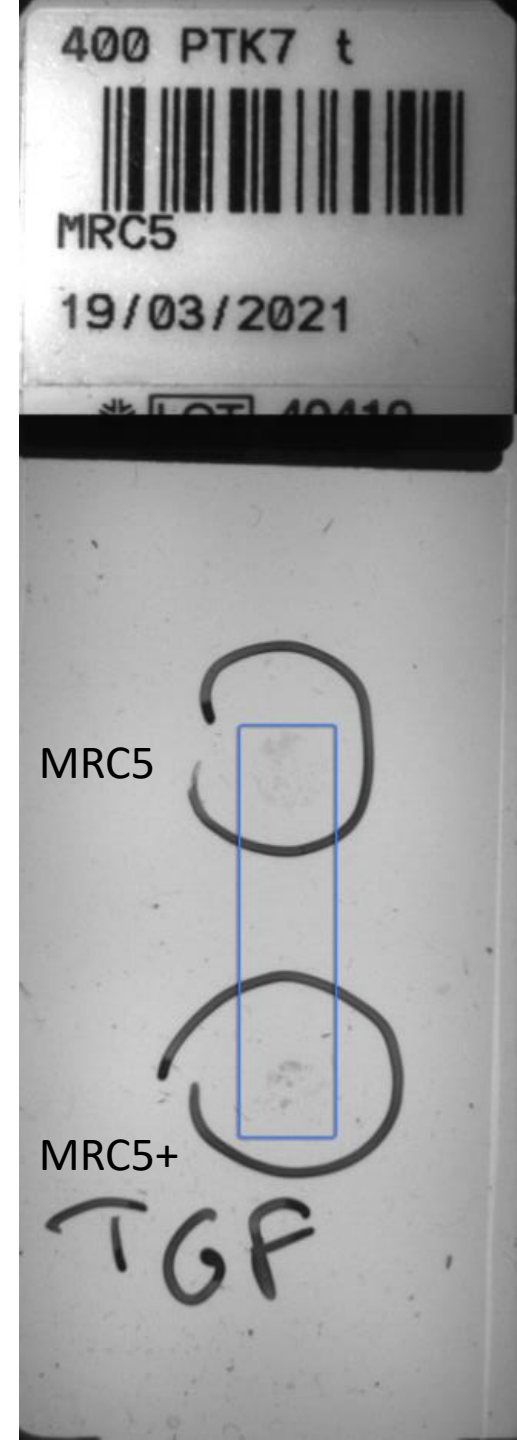
+ α -SMA

Collagène :

Picrosirius

SALL4 ???

- MRC5 vs MRC5 + TGF- β (Adeline Bouard)
 - ✓ 10ng/ml
 - ✓ 7 jours
- FFPE cell block from a cytological sample (histogel)
- IHC panel:
 - ✓ α SMA
 - ✓ FAP
 - ✓ HSP47
 - ✓ LRRC15
 - ✓ PTK7
 - ✓ SALL4
- Numerisation and image analysis



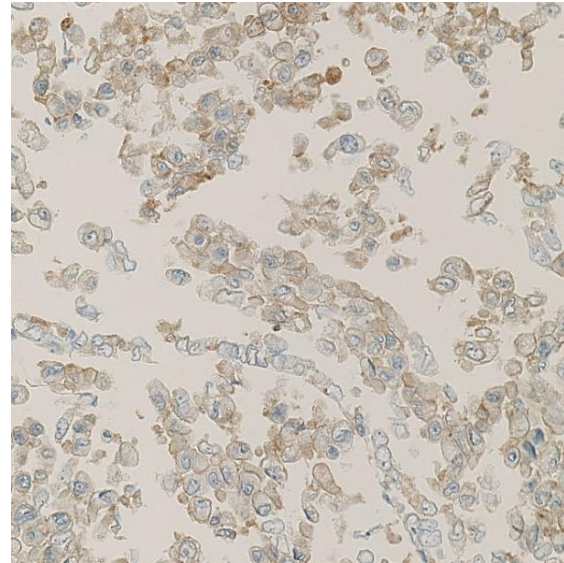
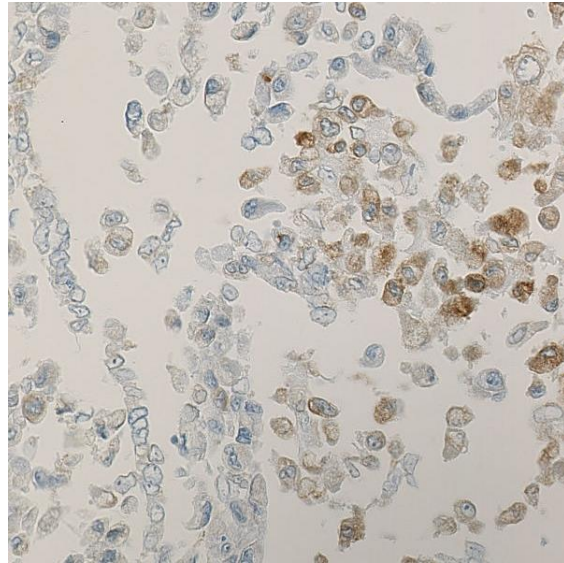
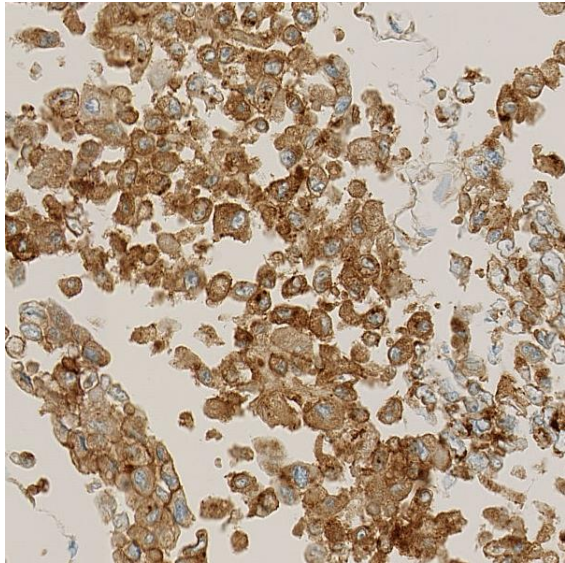
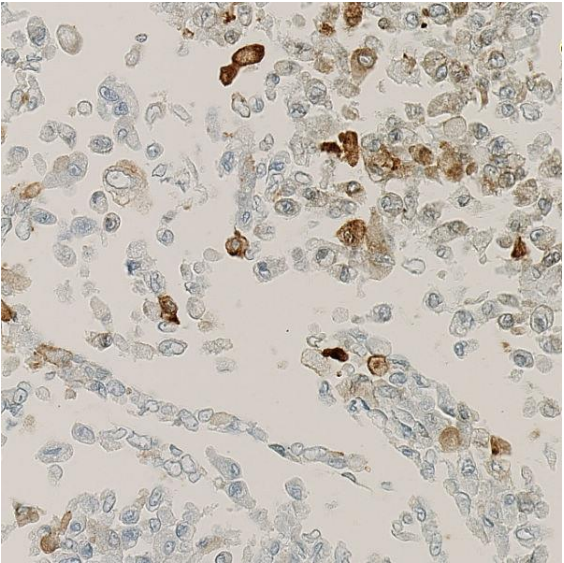
α SMA

FAP

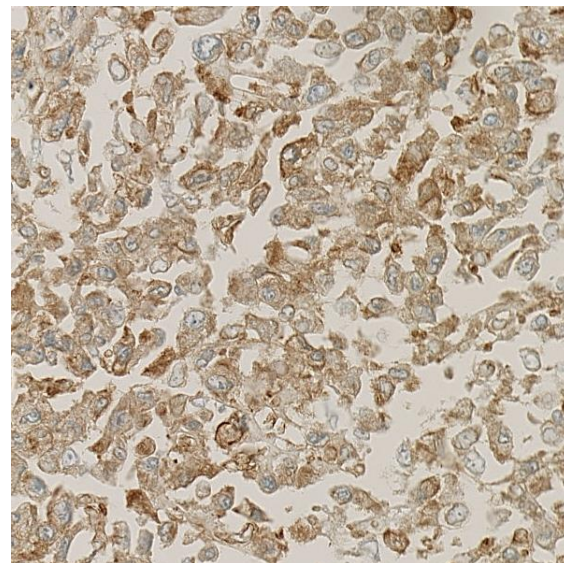
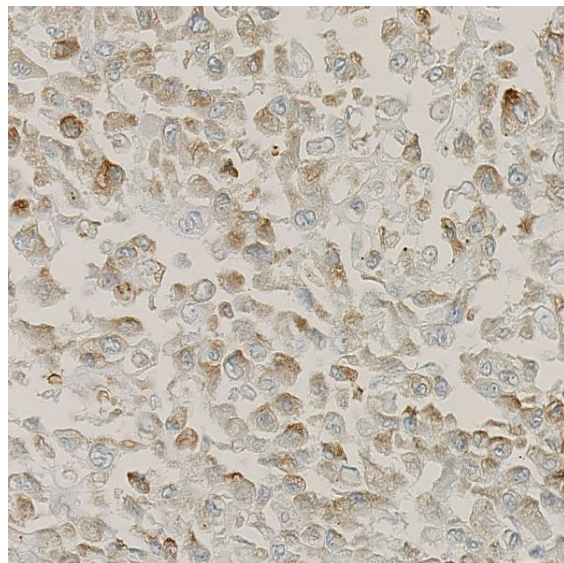
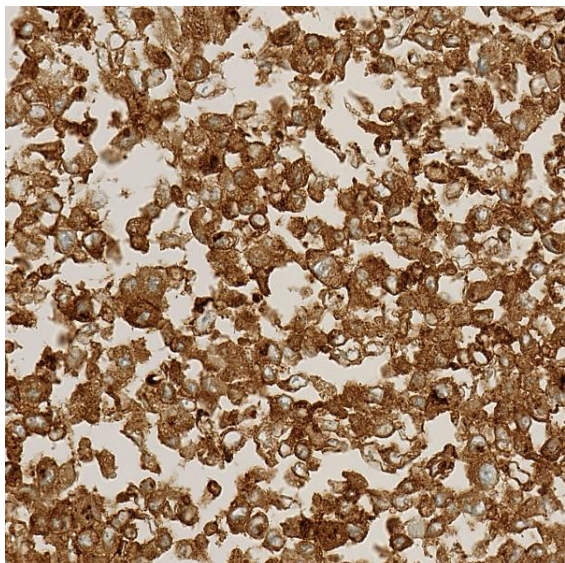
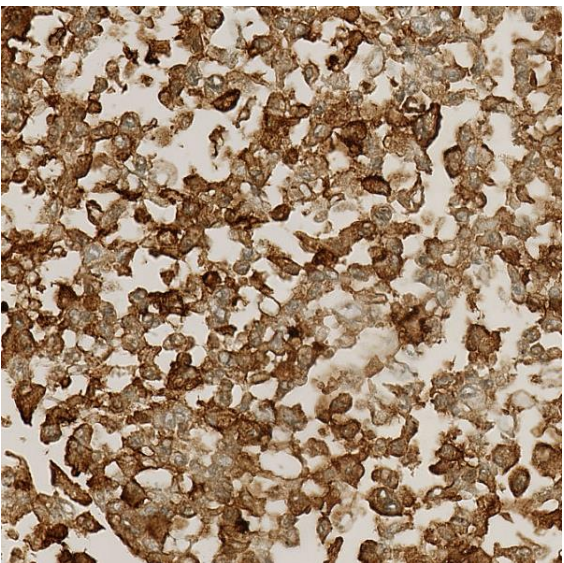
HSP47

PTK7

MRC5



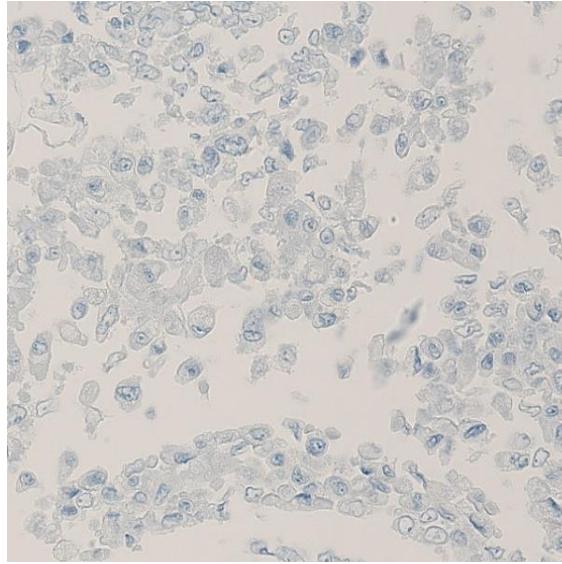
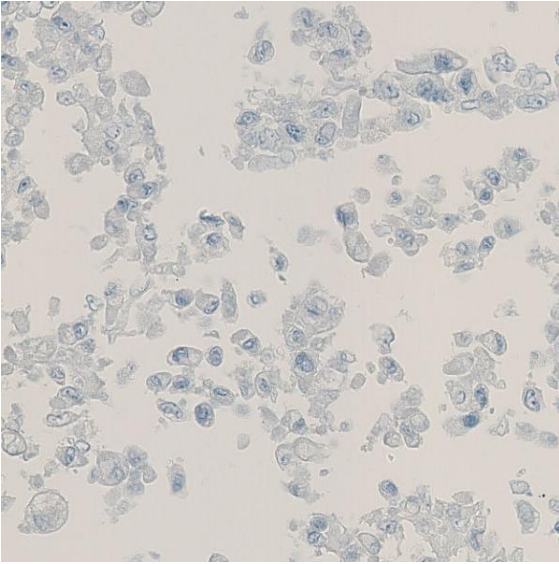
MRC5 TGF β



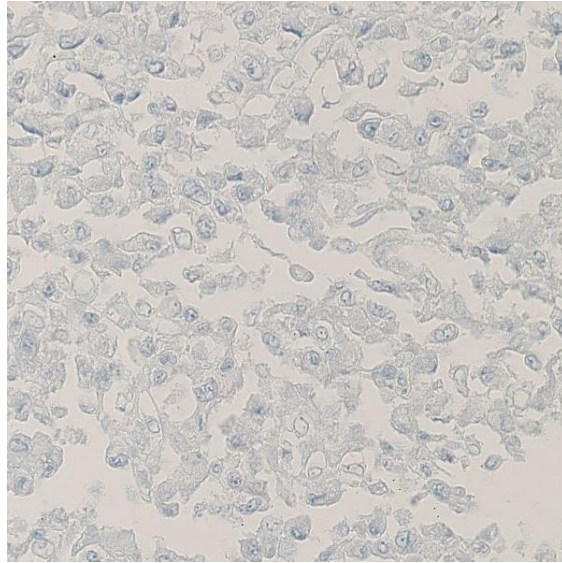
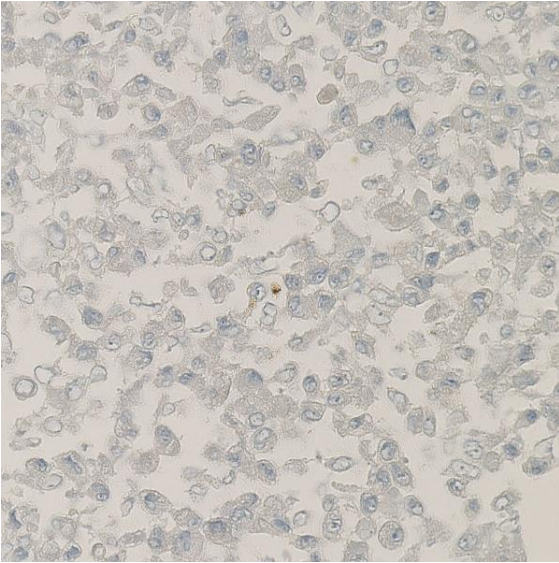
LRRC15

SALL4

MRC5

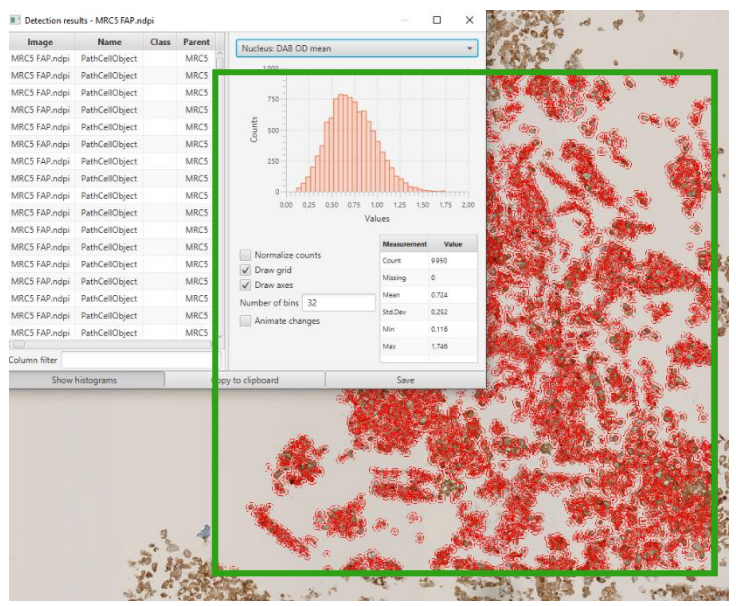


MRC5 TGFB β



?

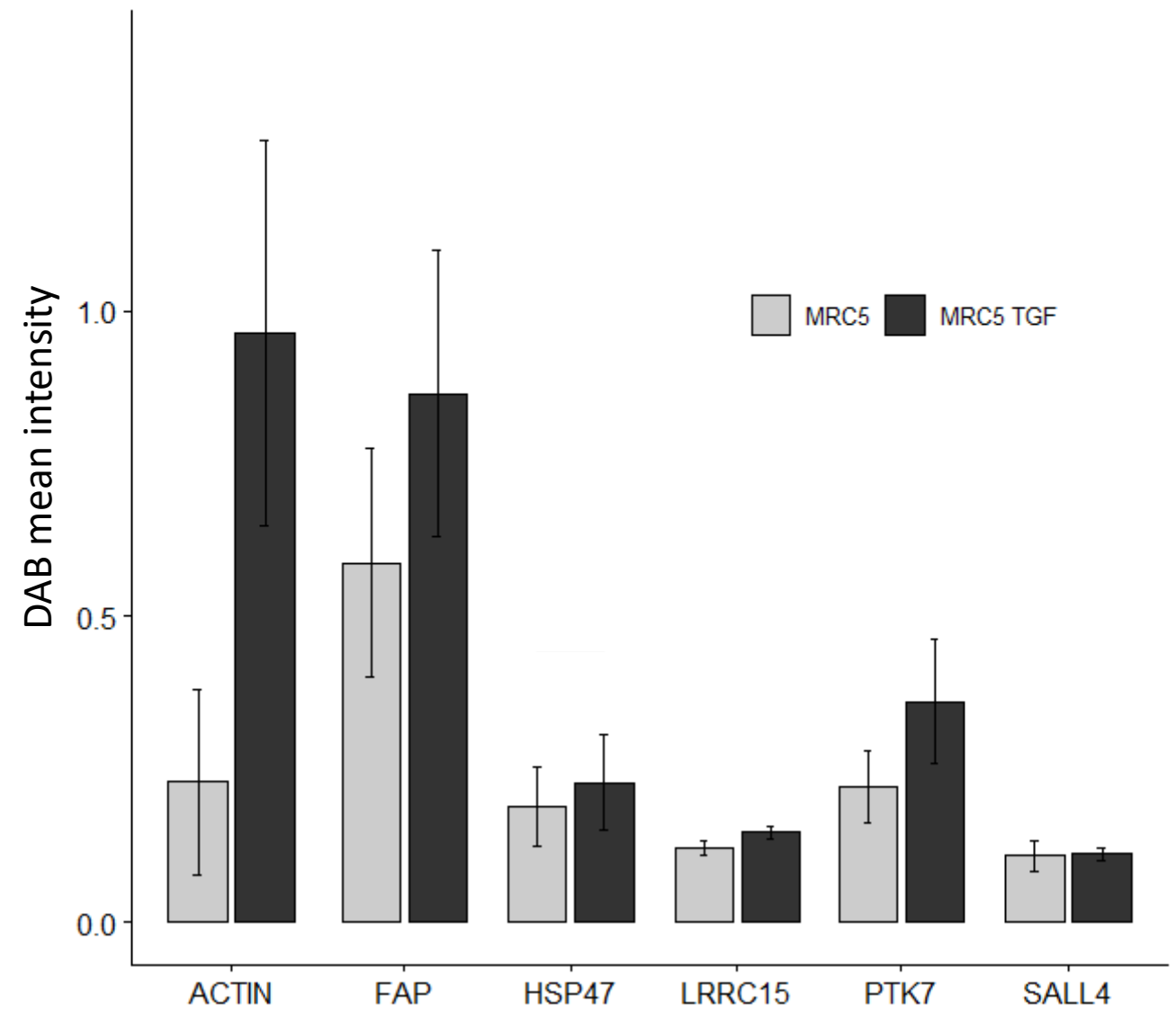
Intensité du signal



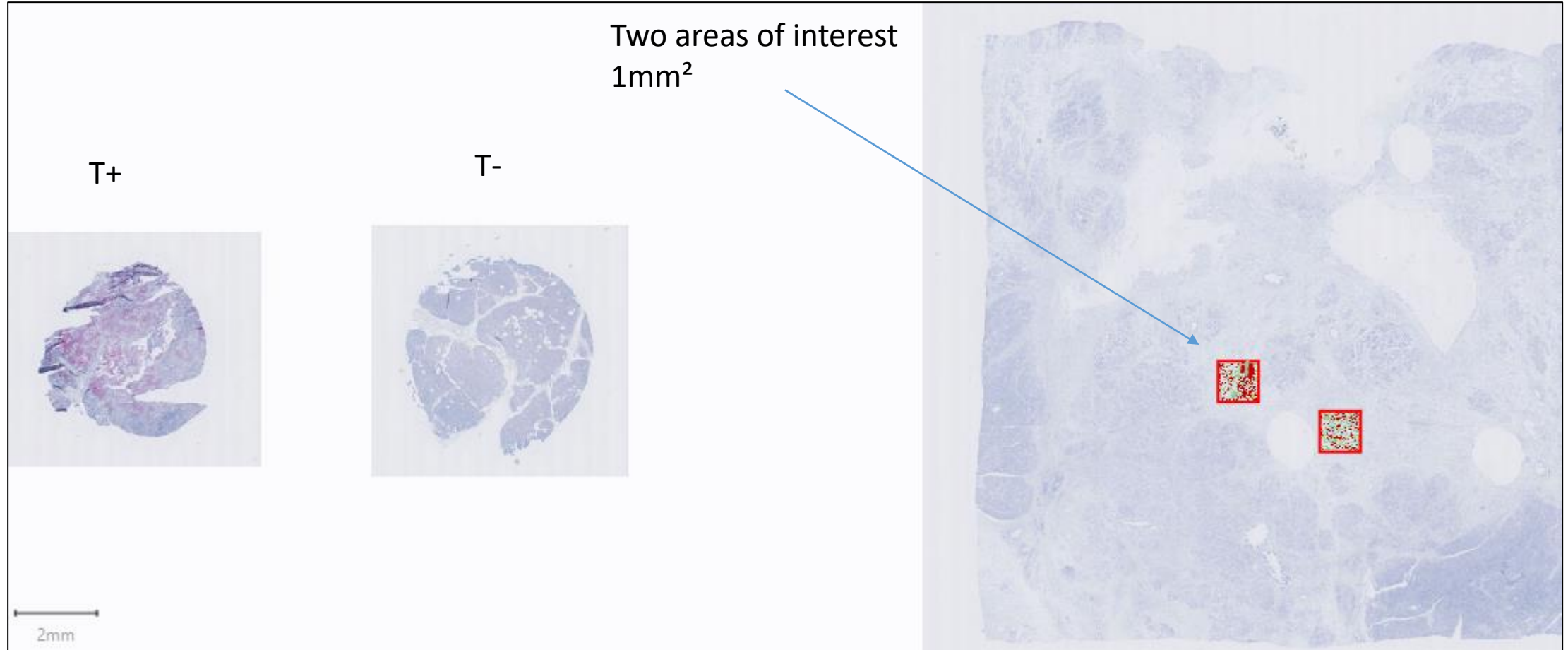
1 x 1 mm

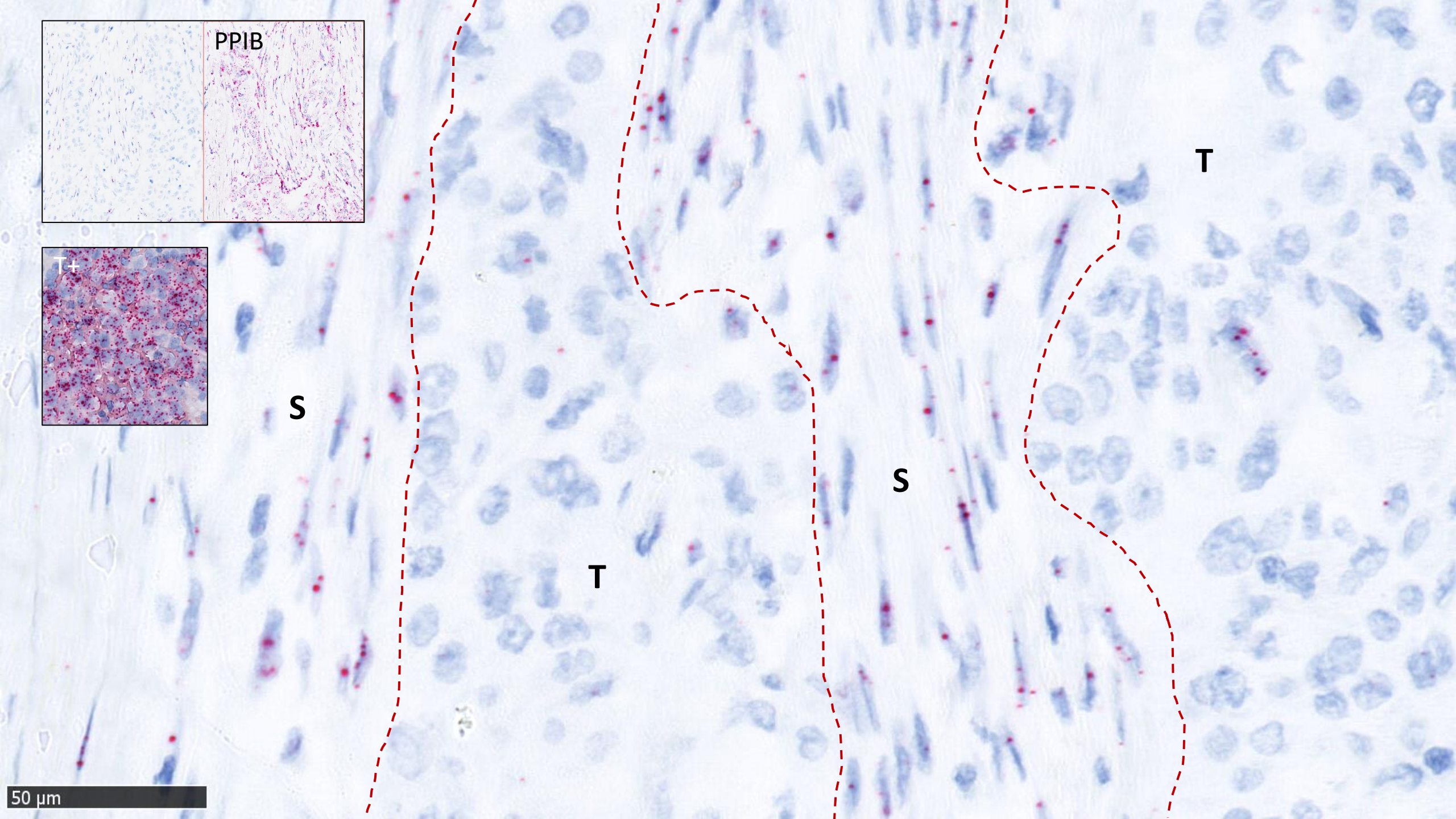
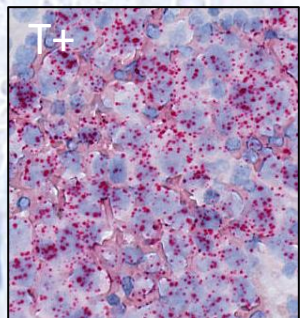
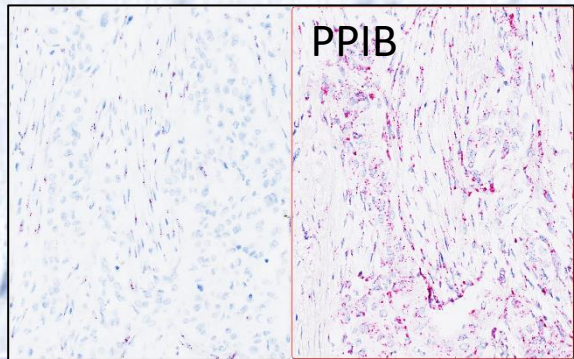
DAB OD mean

Measurement	Value
Count	9950
Missing	0
Mean	0,724
Std.Dev	0,252
Min	0,116
Max	1,746

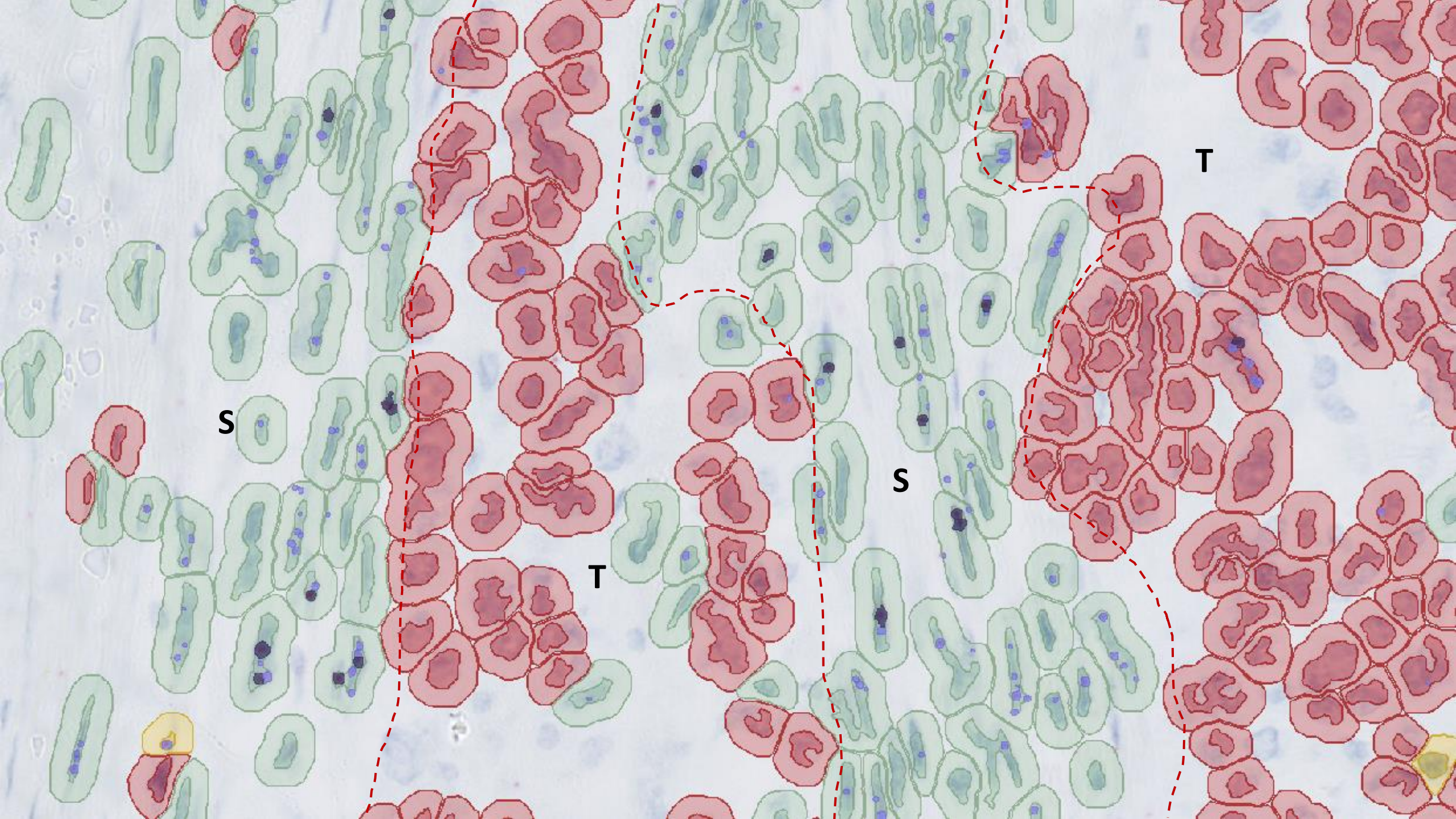


RNAscope™ SALL4





50 μ m



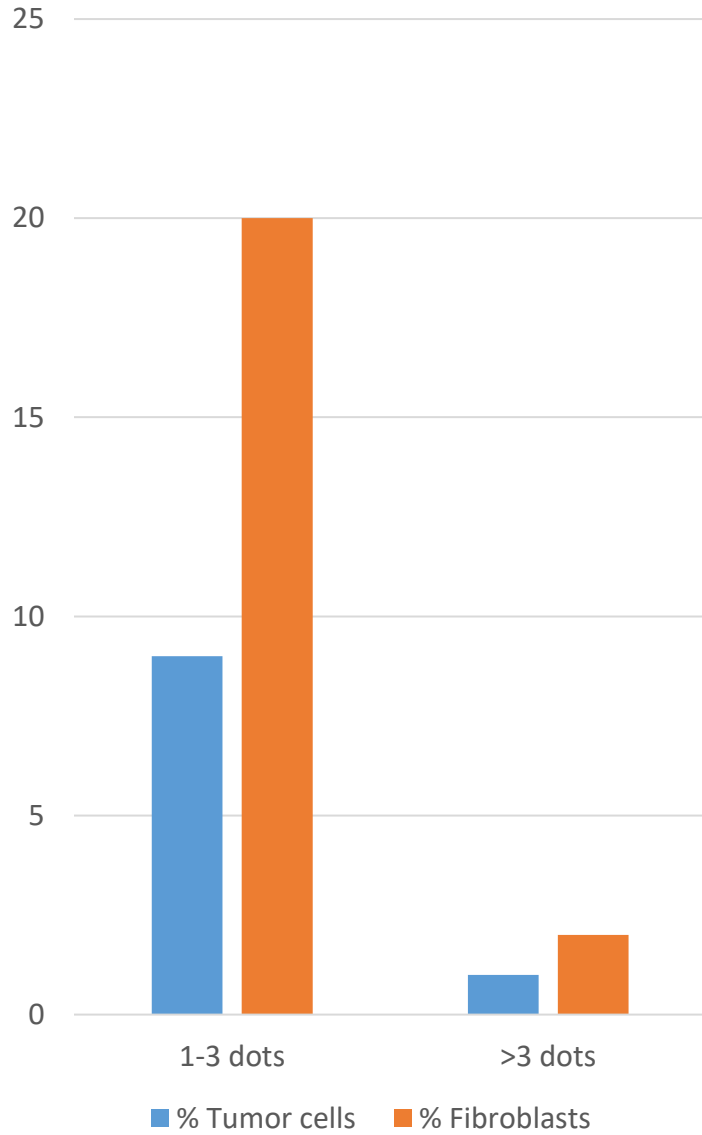
S

T

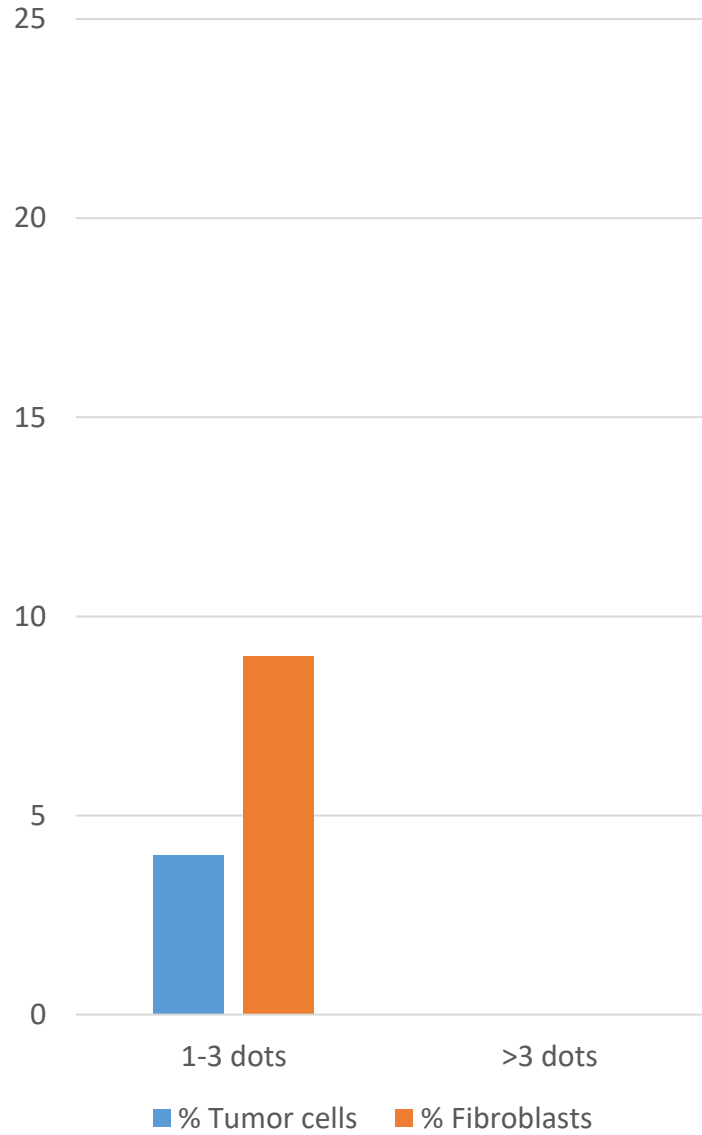
S

T

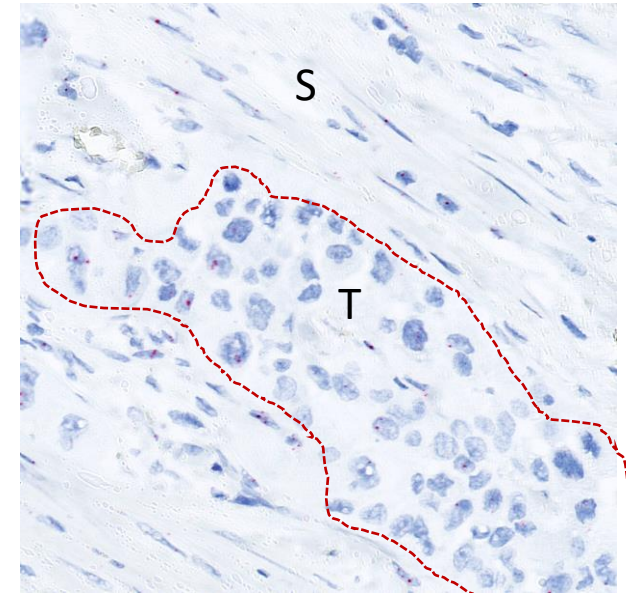
Five short survivors



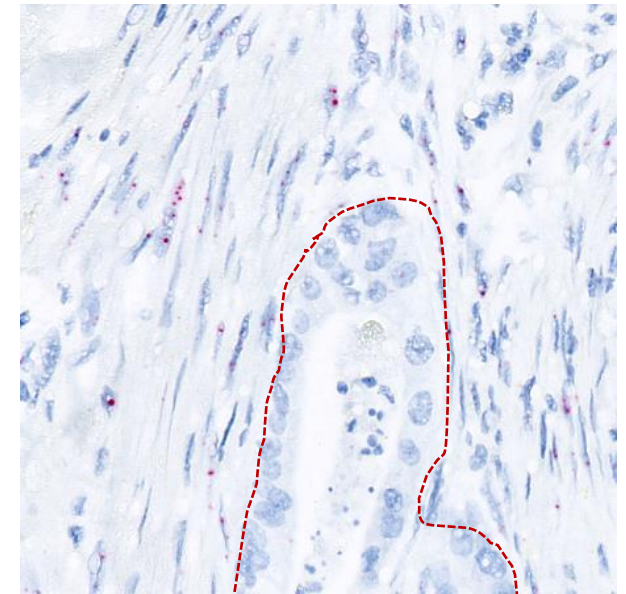
Three long survivors



CAF 1+ Tumor 1+



CAF 2+ Tumor 0



**Marqueurs
pronostiques ?**

- Monocentric retrospective observational study
- Patient who had pancreatectomy between 01/01/2000 and 31/12/2017
- Pancreatic ductal adenocarcinoma histologically assessed
- Survival
 - OS: calculated from the date of surgery to death or last follow-up
 - PFS: calculated from the date of surgery to the first disease progression, death or last follow-up.
 - Disease progression was defined as the earliest radiological evidence of neo- plasm growth after resection

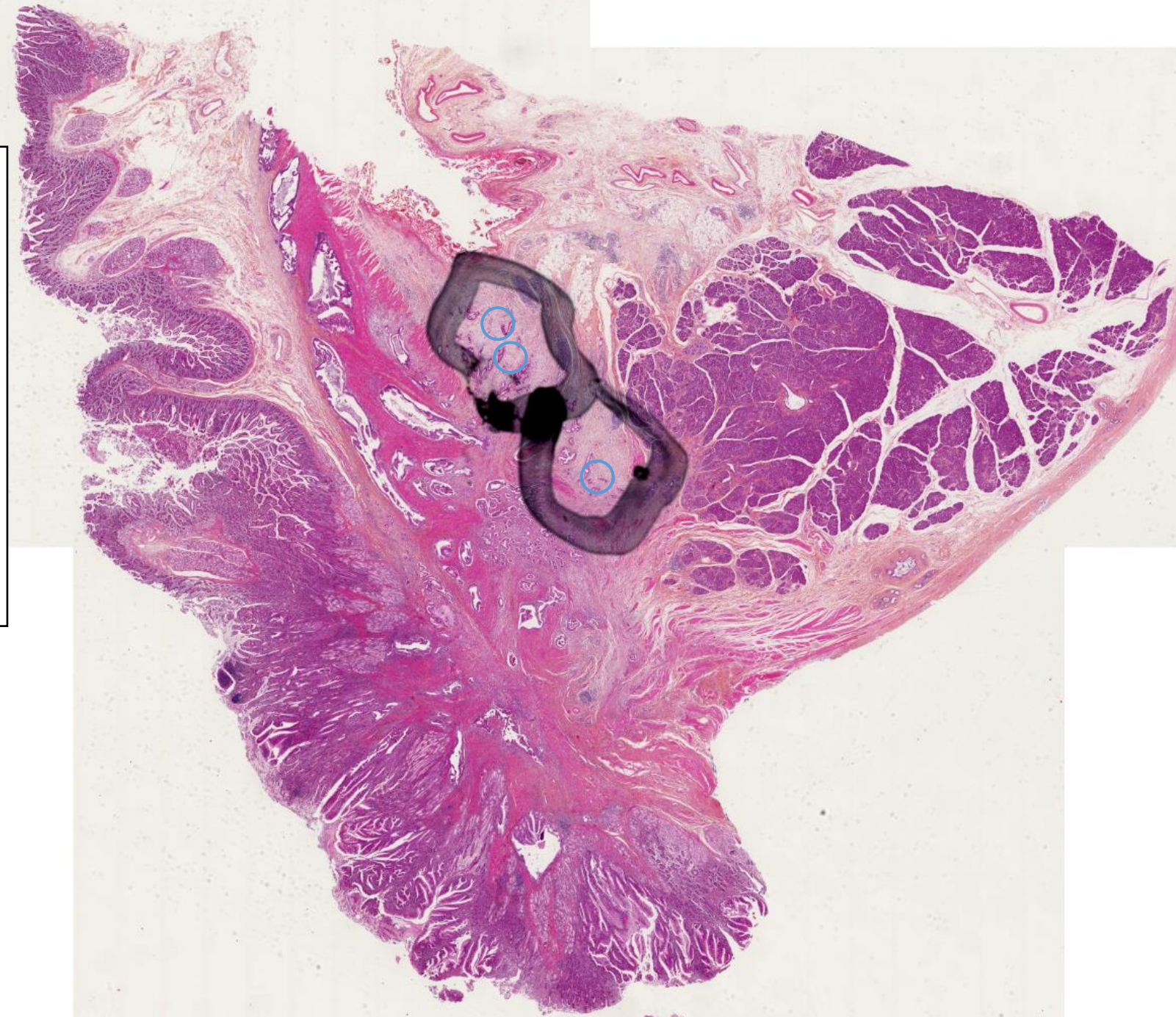
253 patients operated for
pancreatic resection
between 2000 and 2017



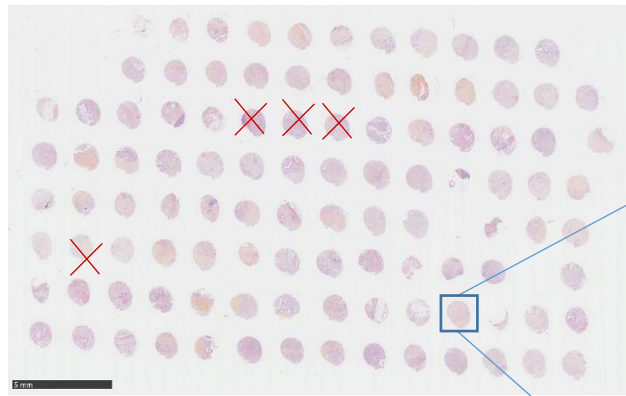
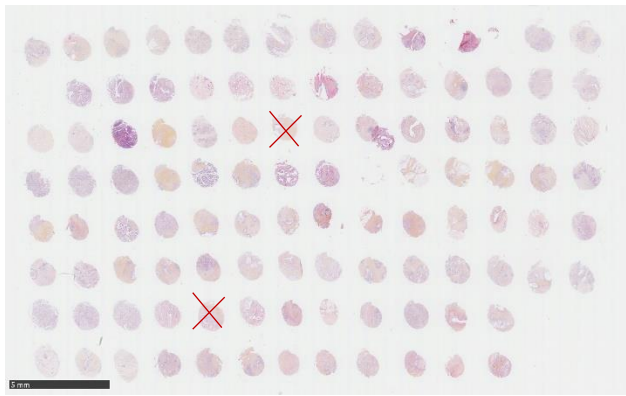
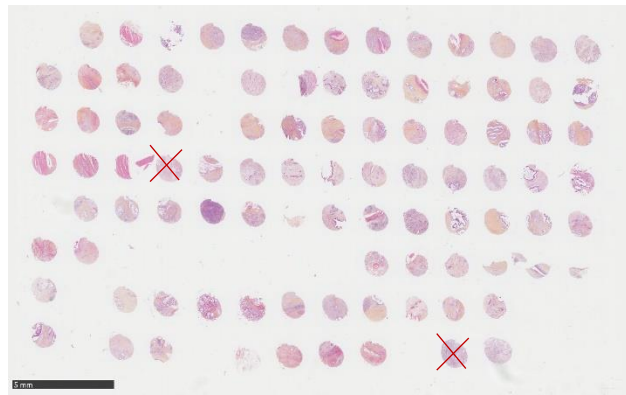
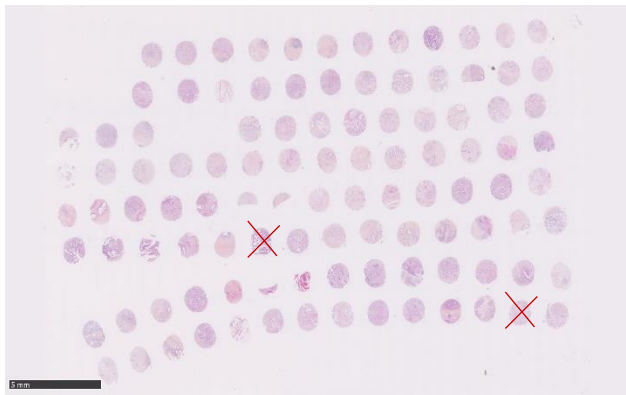
- Blocs not found in the archives n = 7
- Without residual tumor cells n = 1
- Unknown patient n = 1
- Non adenocarcinoma tumour n = 19
- Remaining macroscopic tumor tissue after pancreatic resection n = 2
- Unknown resection statut n = 2
- Death within 30 days following surgery n = 1

Eligible for TMA
construction
N = 220

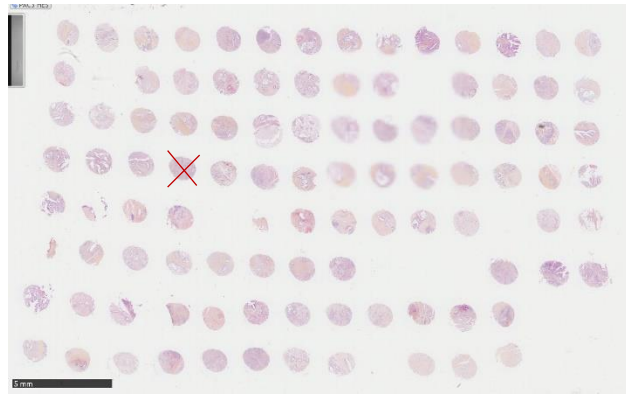
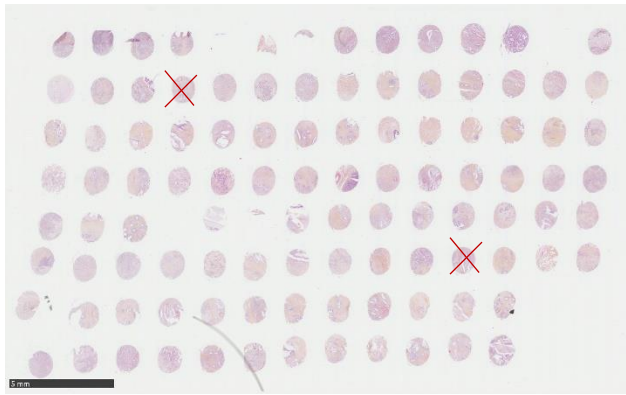
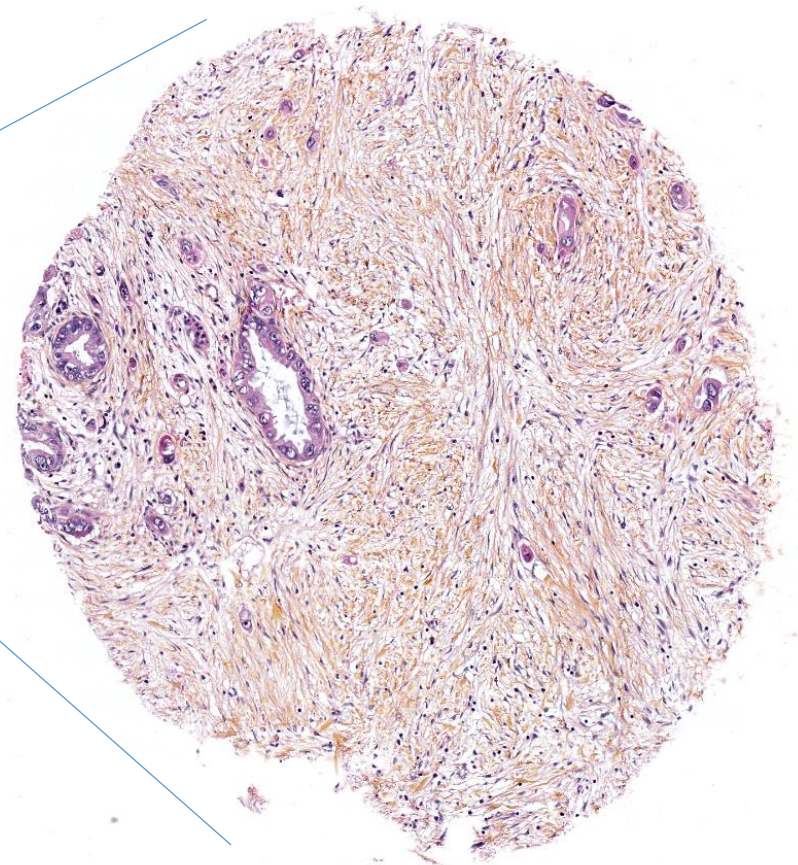
At least one exploitable spot
per patient N = 217



5 mm



HES

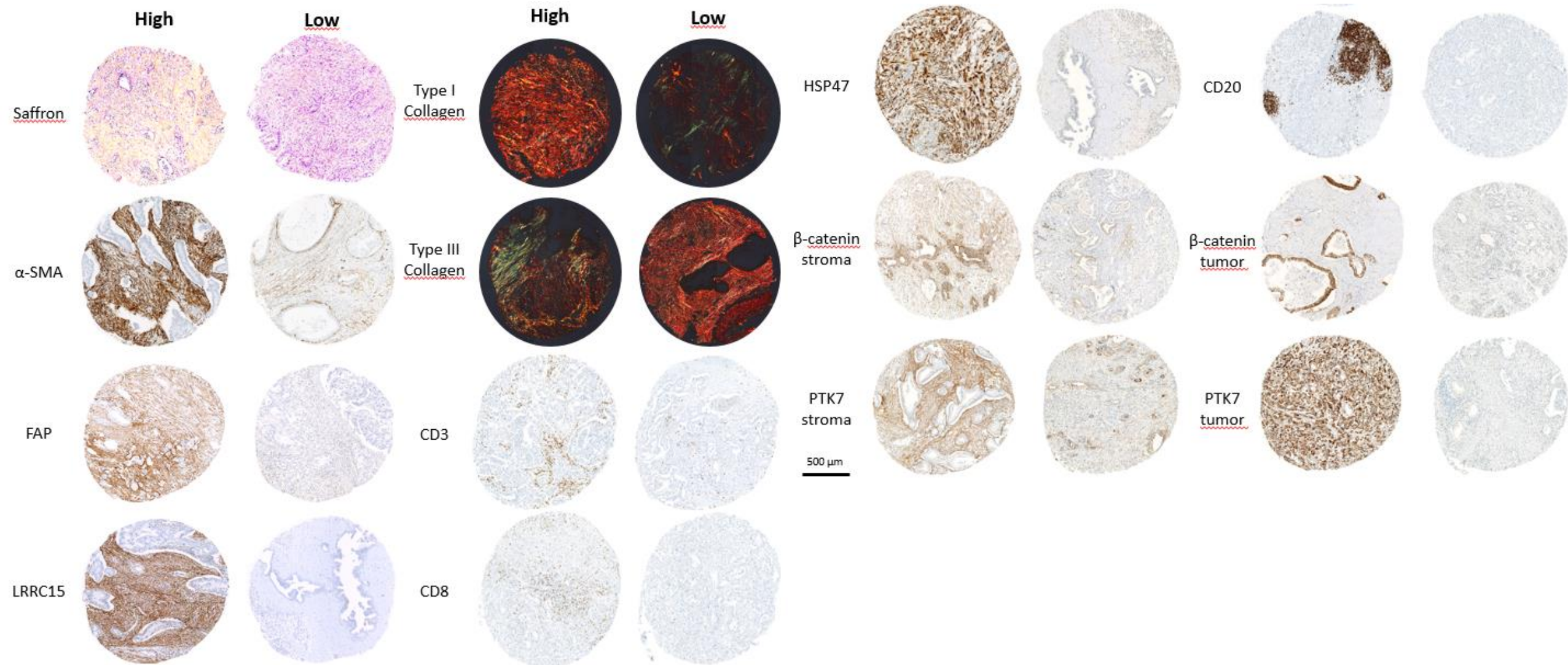


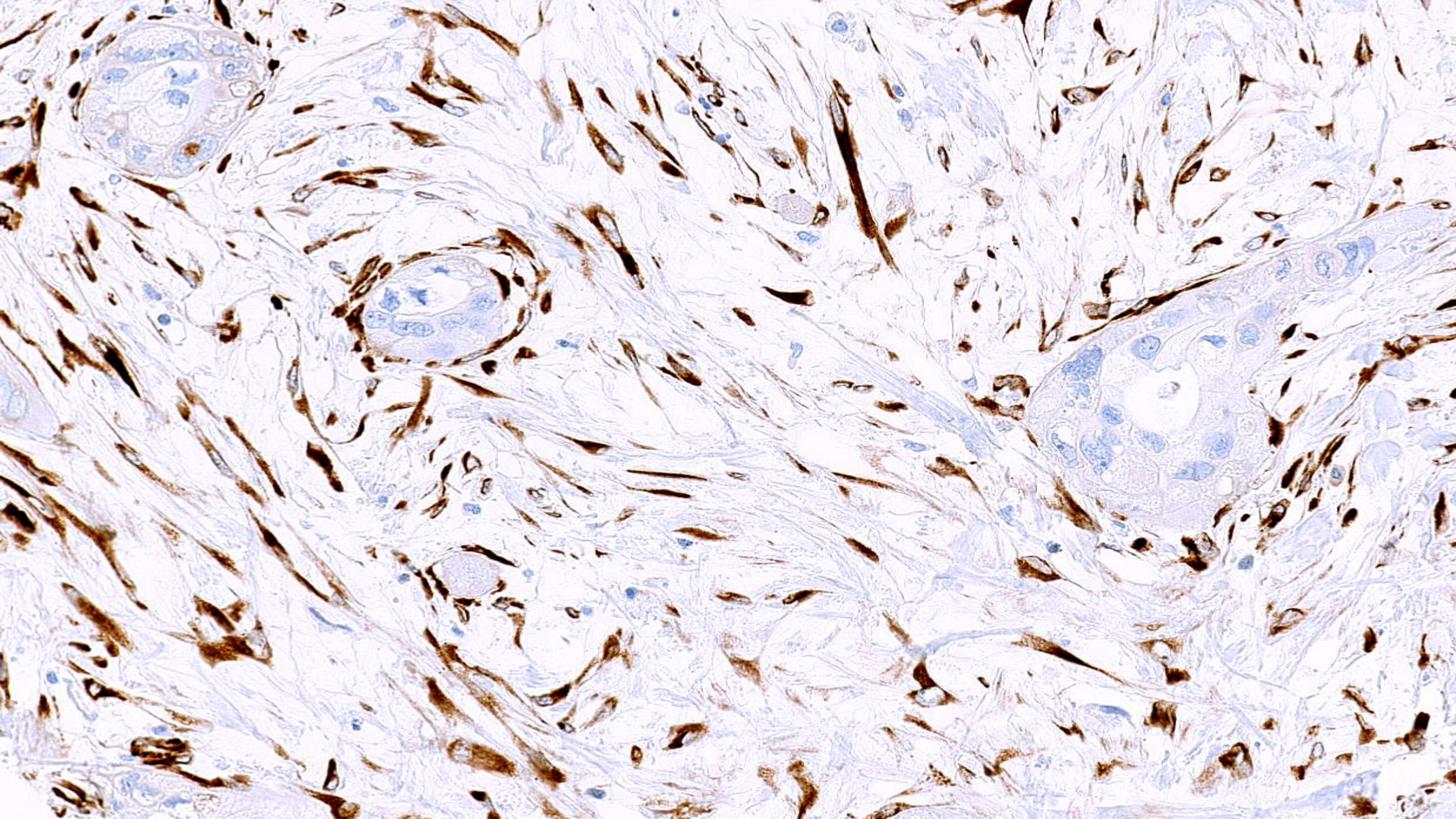
Valeurs pronostiques → translationnel

- 217 APC, patients opérés entre 2010 et 2017
- Tissue MicroArrays
- Immunohistochimie (IHC) et Colorations spéciales



CD3	Lymphocyte T	Cellules immunitaires	Dénombrement automatique Cellules / mm ²
CD8	Lymphocyte T cytotoxiques		
CD20	Lymphocytes B		
Safran	Collagène de type I	Collagène	Classifieur de pixels % de surface marquée
Rouge Sirius	Collagènes de type I & III		
FAP	Fibroblastes activés	Fibroblastes	
α-SMA	Fibroblastes activés		
HSP47*	Protéine chaperone du collagène		
LRRC15*	Protéine mésenchymateuse		
PTK7*	Regulating process in embryonic development	Fibroblastes et Cellules tumorales	Échelle visuelle semi-quantitative 0 1+ 2+ 3+
β-catenin	Adhésion cellulaire		

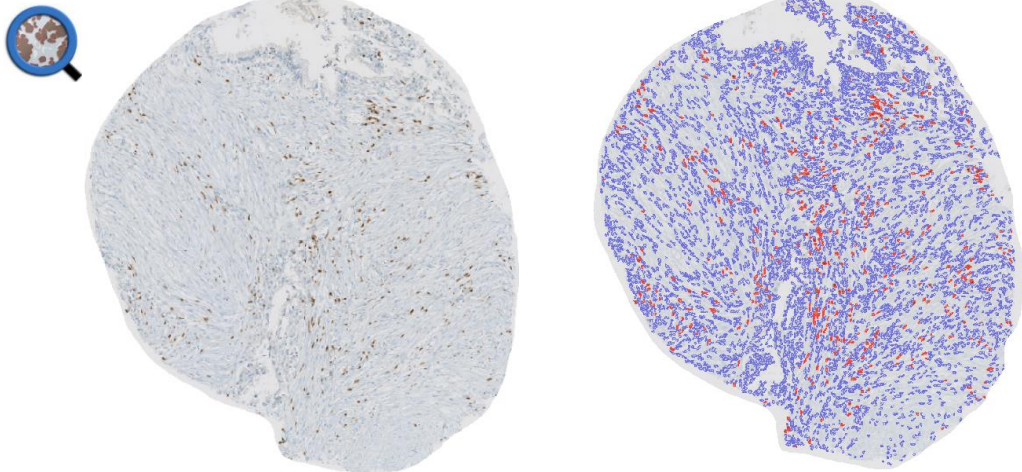




MATÉRIEL ET MÉTHODES

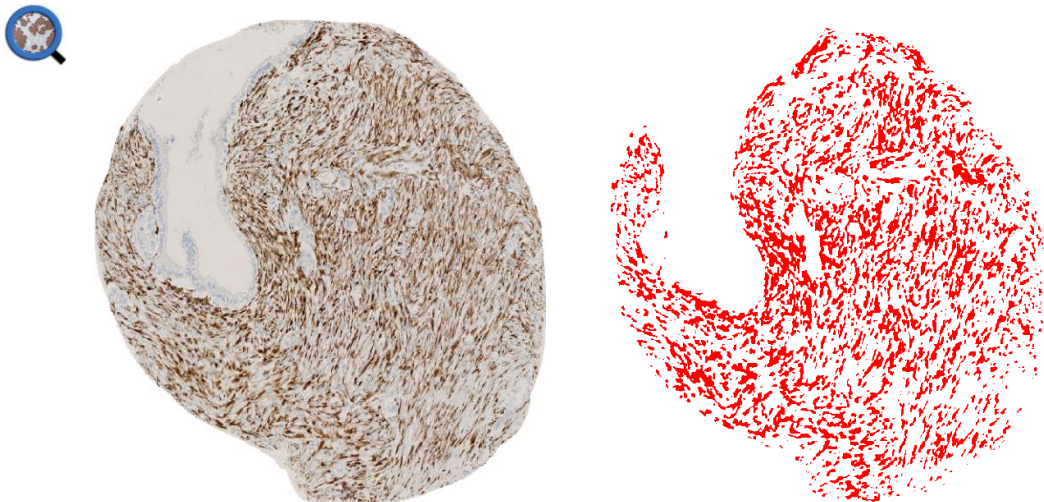
Nombre de cellules + / mm²

Lymphocytes : exemple CD3



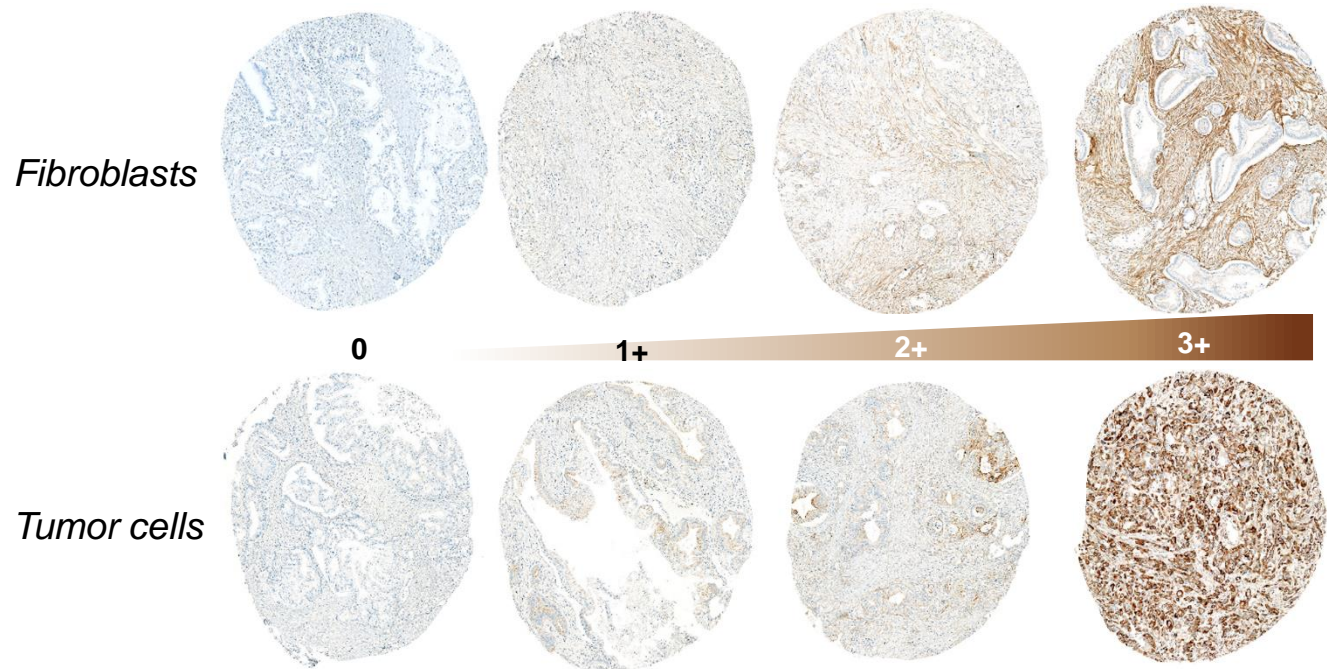
% de Surface marquée

Fibroblastes : exemple FAP



Échelle semi-quantitative

Exemple β -Catenin



Données brutes



Analyse
de cluster

MOYENNE
des spots

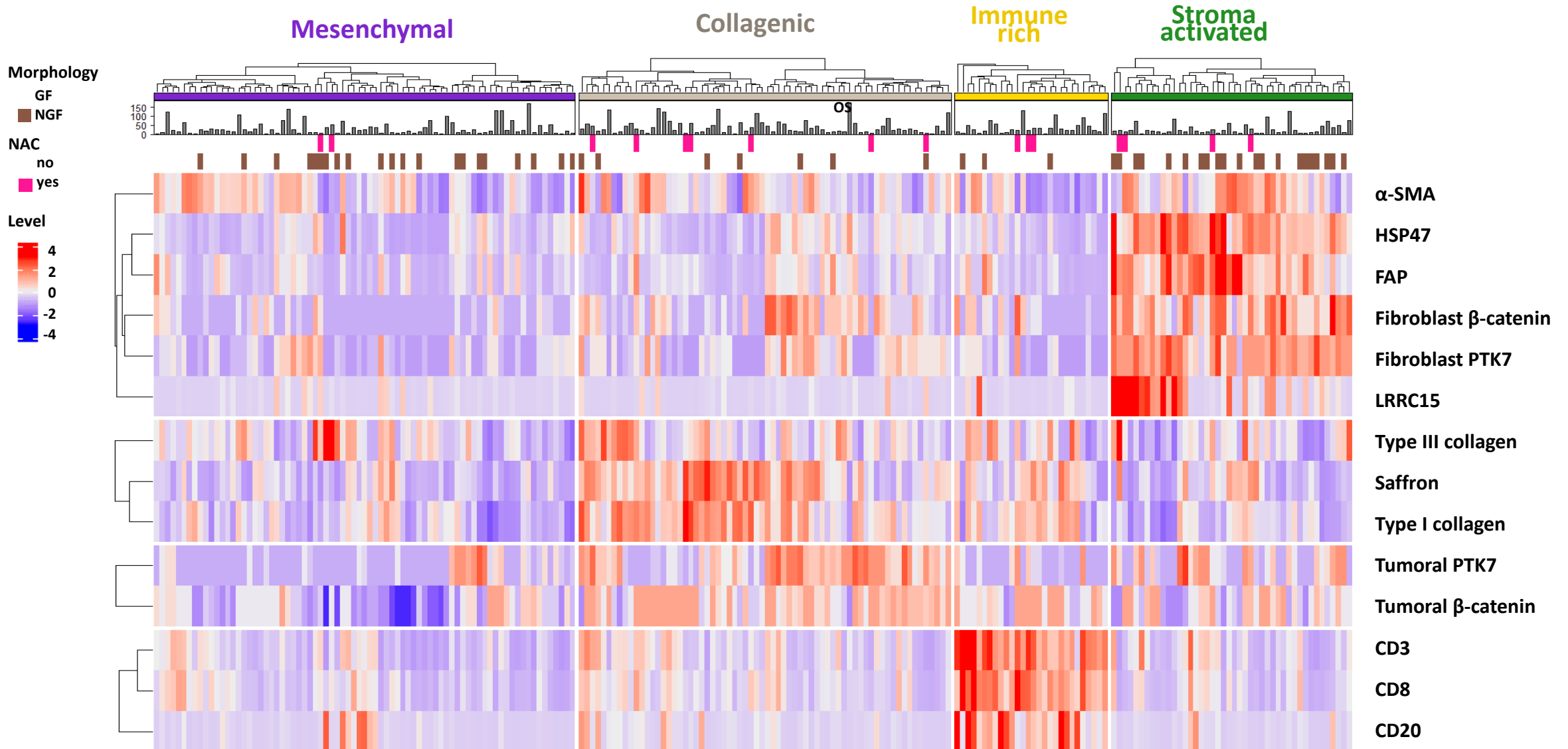
Dichotomisation



Analyse
de survie

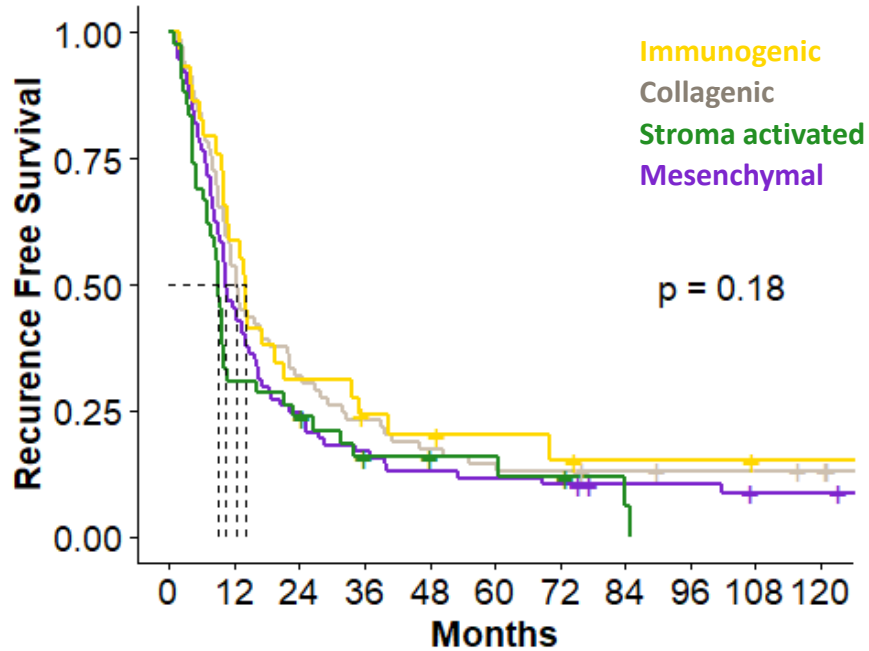
RÉSULTATS

Données brutes standardisées → 4 sous groupes



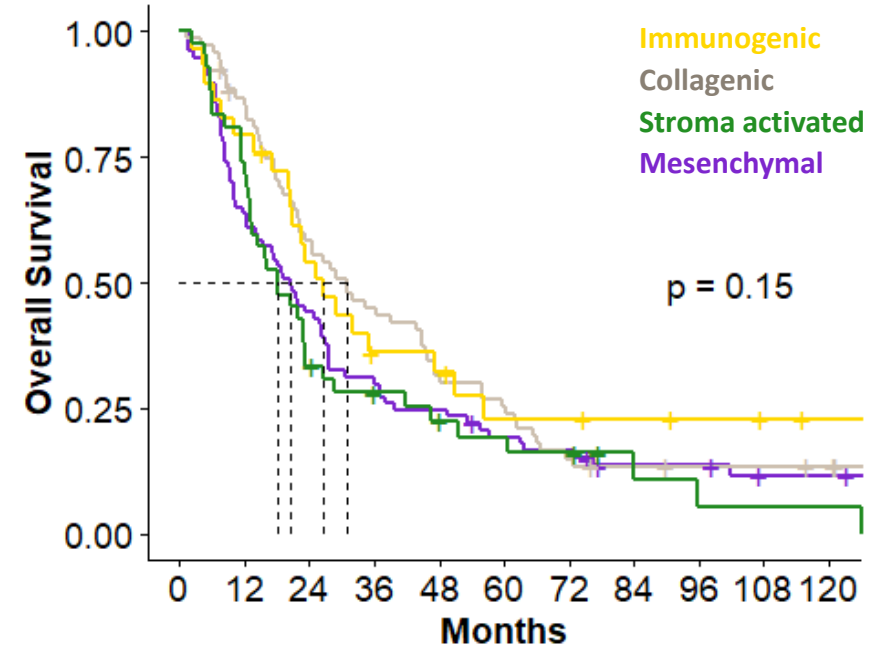
RÉSULTATS

Survie Sans Progression



	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Immunogenic	77	35	19	13	10	9	8	6	6	4	4
Collagenic	69	37	22	16	12	10	9	8	7	7	6
Stroma activated	29	17	9	6	5	4	3	2	2	1	1
Mesenchymal	42	13	10	6	5	4	3	1	0	0	0

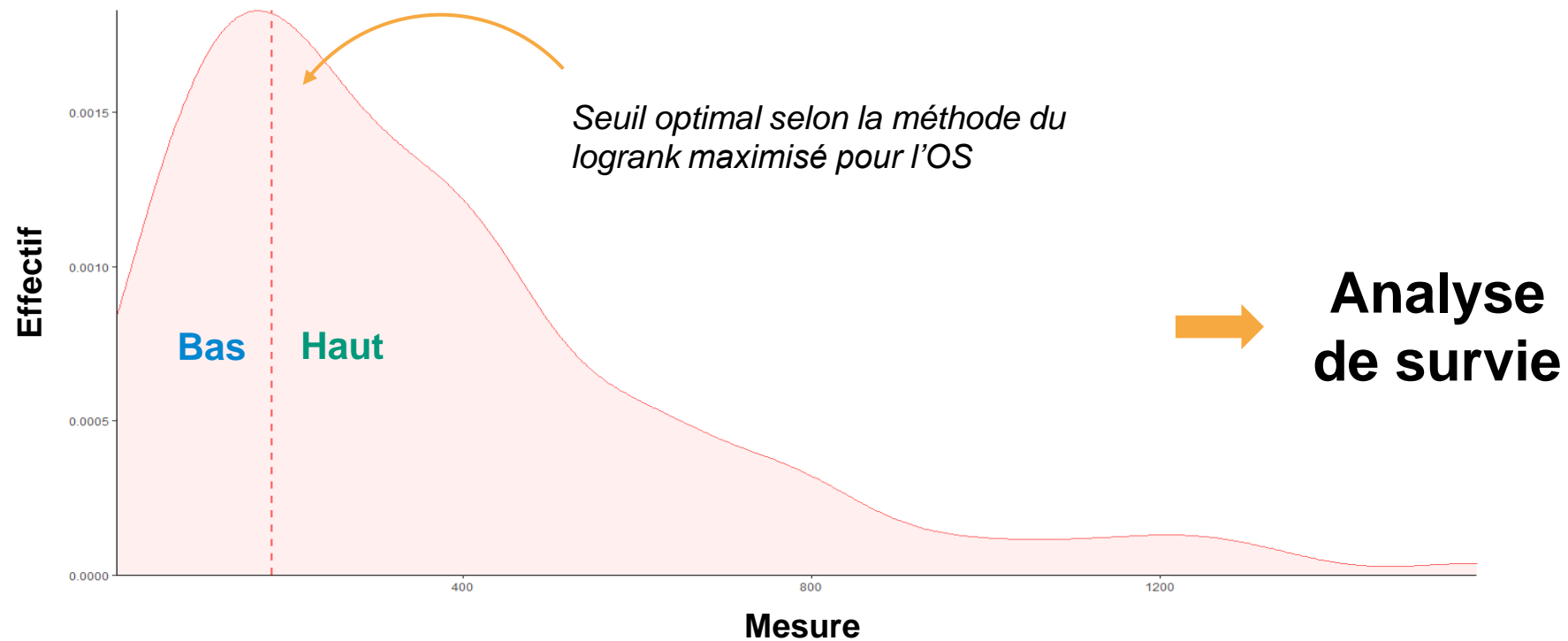
Survie Globale



	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Immunogenic	77	49	34	23	19	14	12	8	8	5	5
Collagenic	69	58	39	30	21	17	10	8	7	7	6
Stroma activated	29	23	15	9	8	5	5	4	3	2	1
Mesenchymal	42	31	14	11	8	6	5	2	1	1	1

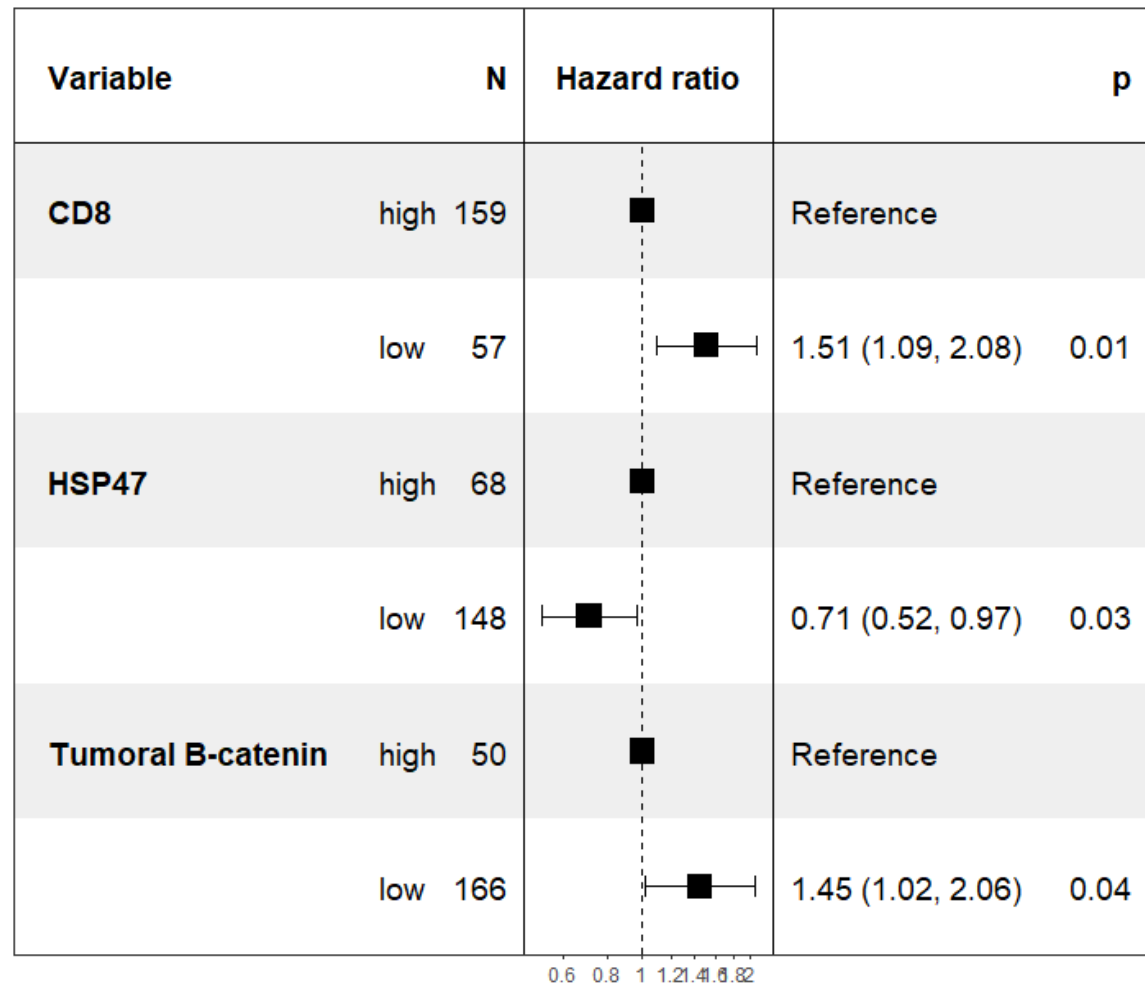
RÉSULTATS

SEUILLAGE de la moyenne des mesures des spots pour chaque patient



Résultats

Analyse multivariée: survie sans progression

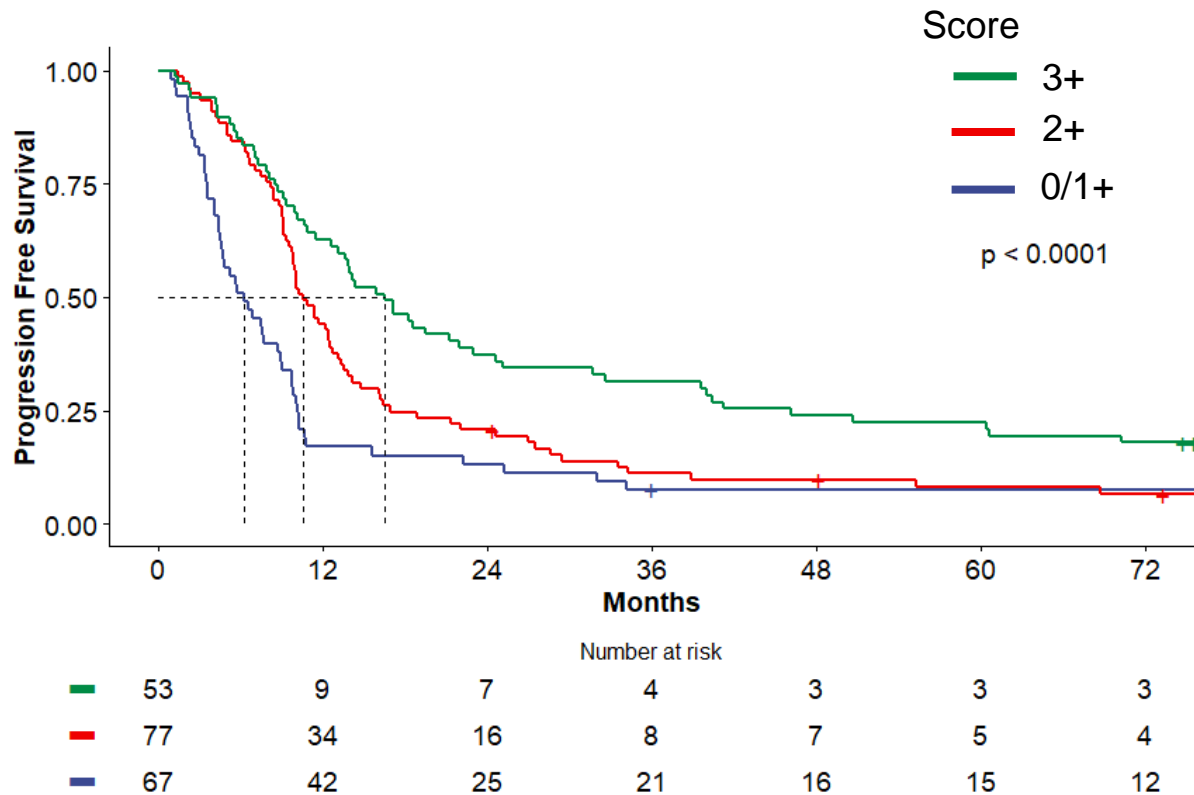


Résultats

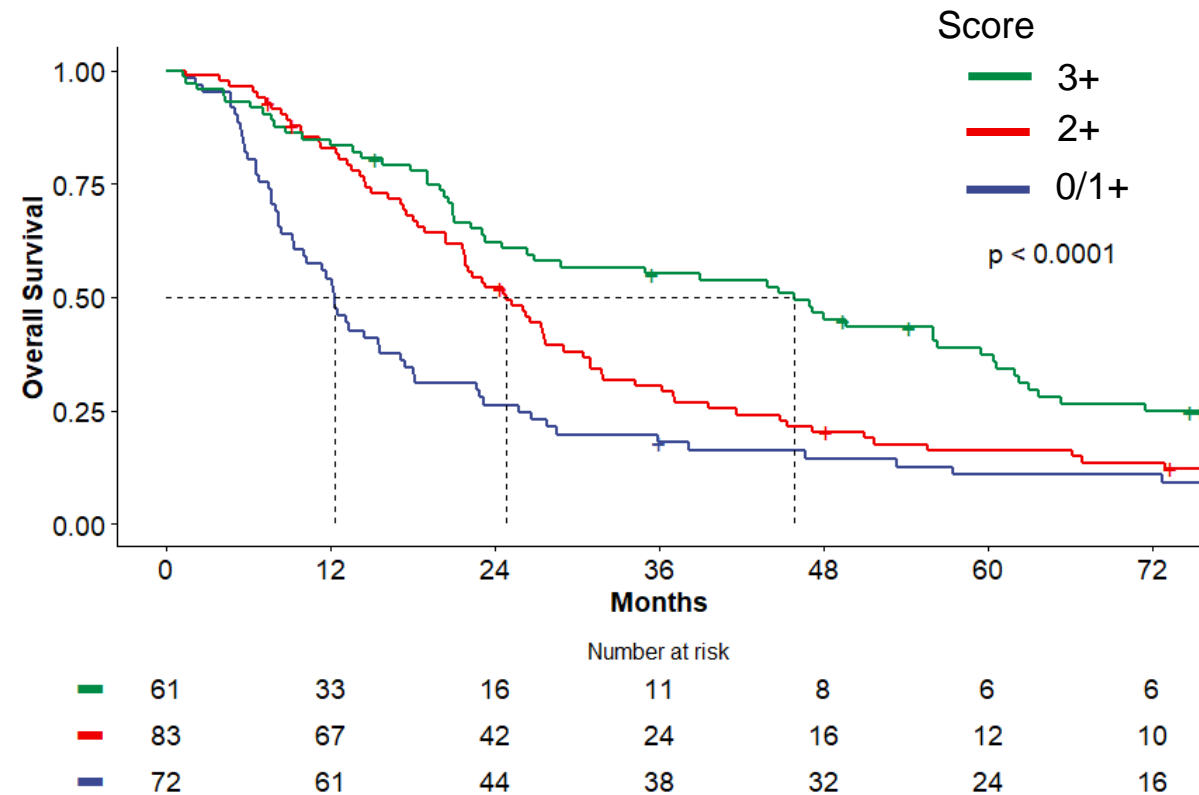
Combinaison des marqueurs → Score de 0 à 3

- β-caténine élevée → 1 point
- CD3 élevé → 1 point
- HSP47 bas → 1 point

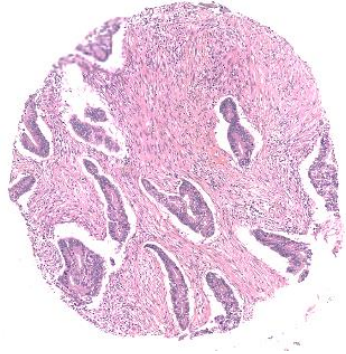
Survie sans progression



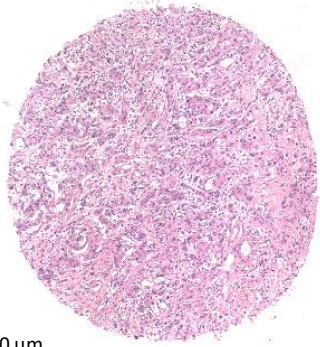
Survie globale



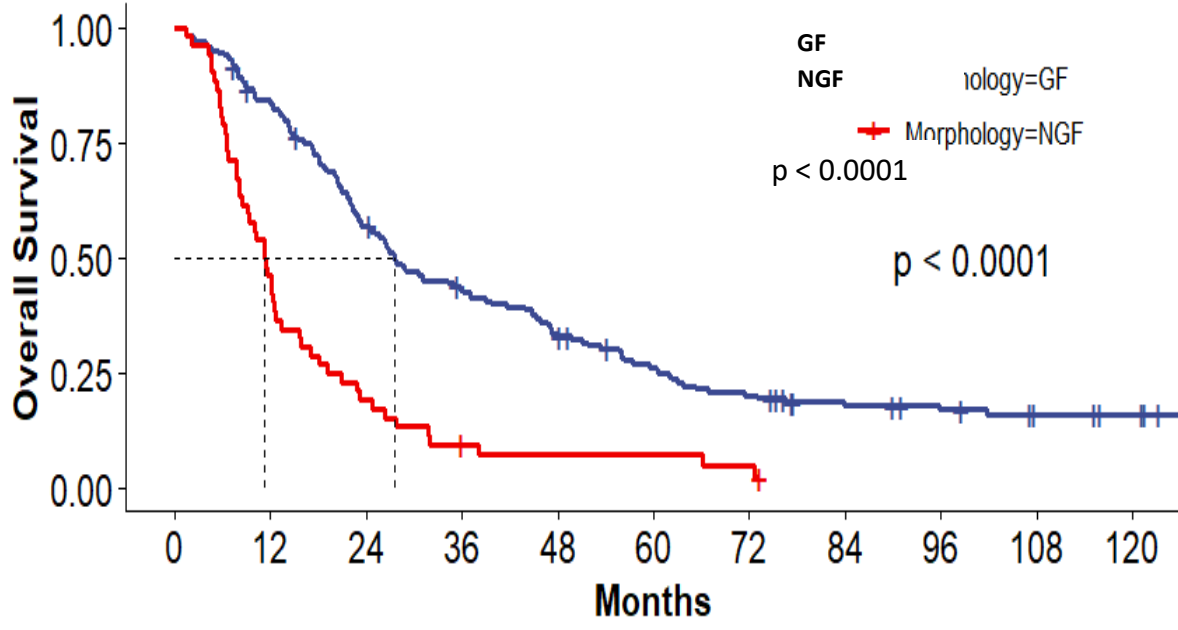
Gland Forming (GF)



Non Gland Forming (NGF)

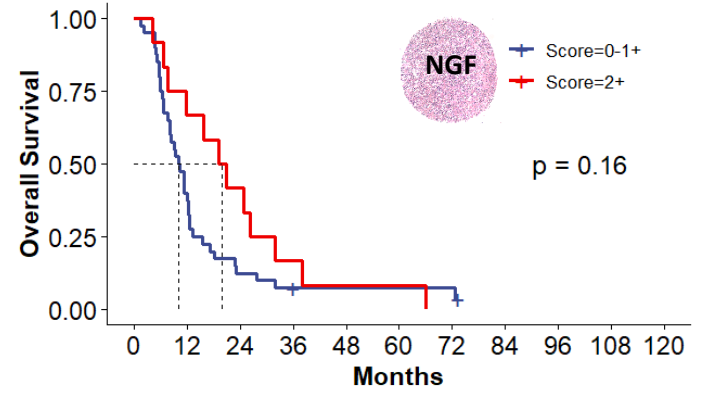


500 μm



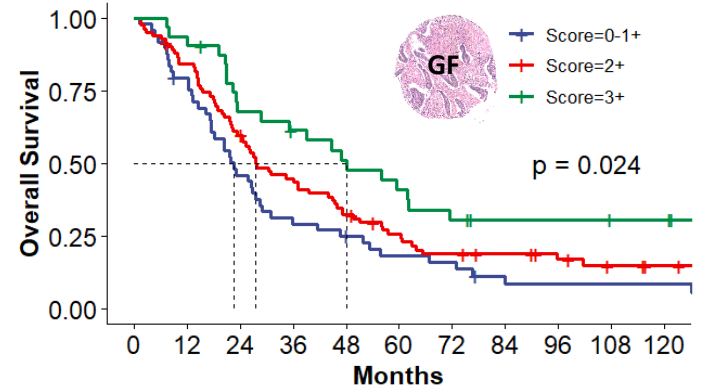
Number at risk

165	137	92	68	53	39	30	22	19	15	13
52	24	10	5	3	3	2	0	0	0	0



Number at risk

40	16	5	3	2	2	2	0	0	0	0
12	8	5	2	1	1	0	0	0	0	0

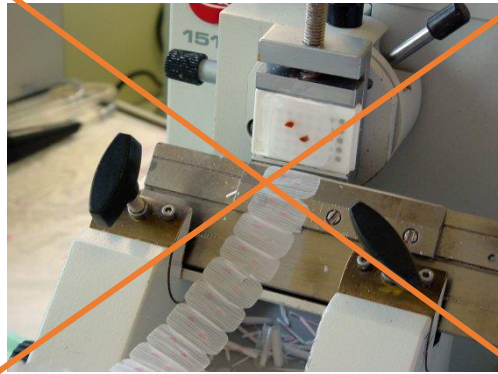


Number at risk

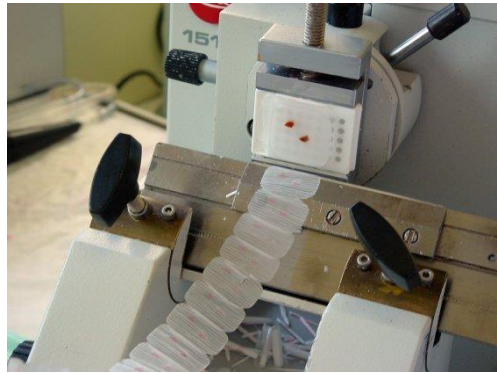
32	30	21	18	15	12	9	7	7	6	6
49	38	22	14	12	8	7	3	3	3	3
83	69	49	36	26	19	14	12	9	6	4

CONCLUSIONS

- Intérêt de caractériser dans les APC **simultanément** les 3 compartiments **épithéliaux**, **immunitaires** et **fibroblastiques**
- Impact pronostique objectivé pour la première fois de **HSP47** et confirmé pour la **β -caténine**
- Illustration de la faculté des CAFs actifs à créer une matrice défavorable
- Approche tissulaire d'un panel immunohistochimique sur **pièces opératoires** : premier pas vers une **applicabilité sur biopsies** ?
- Caractère **prédictif** de cette classification ?

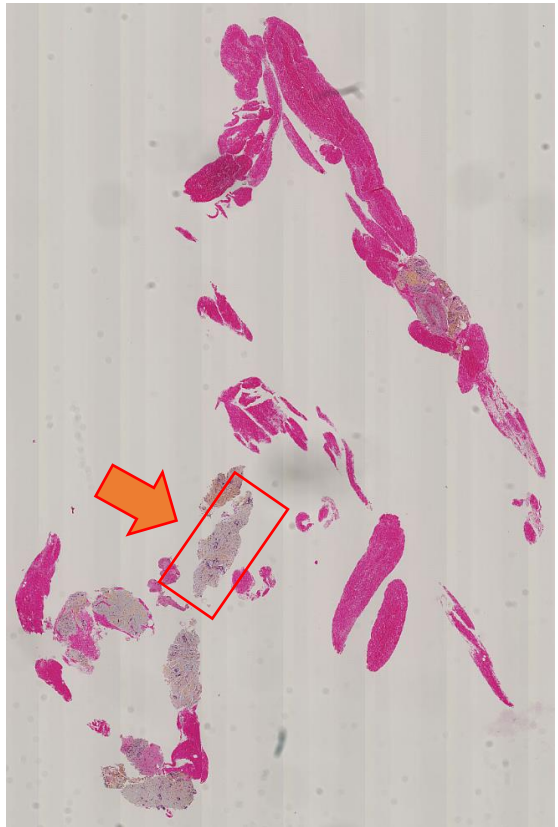


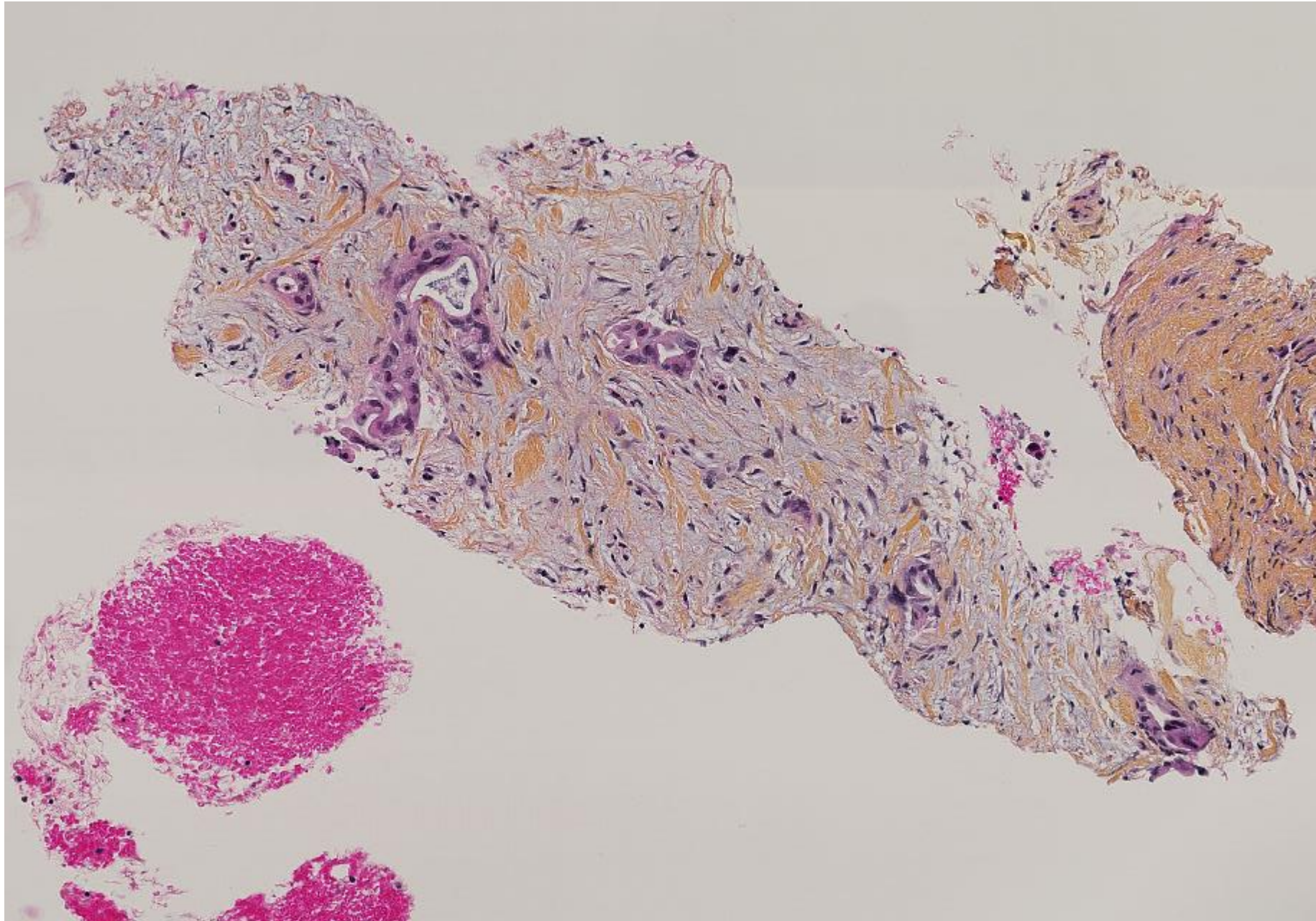
1



2

3





CK7+
CK19+
CK20-
CDX2-
P53+

GF/NGF ?

➔ Pannel IHC

➔ ruban

REMERCIEMENTS

CHU Besançon - Pathologistes Marie-Paule Algros, Sophie Félix, Chloé Molimard, Marine Abad, Charlotte Chaouat, Nikolaus Zirganos, Francine Arbez-Gindre, Frédéric Bibeau, les internes **Tumorothèque** Stéphane Maillery, Lucie Bourgeois, Marthe Bigand **Oncologues** Christophe Borg, Angélique Vienot, Julien Viot, Marine Jary **Chirurgiens** Bruno Heyd, Zaher Lakkis **Techniciens Anapath** Christophe Bracieux, Sabine Zeller, Monique Guyot **UMR Right - Équipe TIM-C & Plateforme ITAC** Adeline Bouard, Jean-René Pallandre, Romain Loyon, Kamal Azgarov, Virginie Mougey, Laurie Spehner, les doctorants **CGFL** Valentin Derangère



La Tumorothèque Régionale de Franche-Comté

Anatomie pathologique – CHU Besançon



Historique

- 2005 Structuration AAP DGOS
 - Équipement (congélateur, cuve azote, logiciels)
 - Personnel
 - UF du service 'anatomie pathologique
- 2009 AAP INCa « promotion de réseaux régionaux permettant l'accès à une tumorothèque de référence »
 - Réseau régional
- 2014 certification Centre de Ressources Biologiques (CRB)

Pourquoi ?

Biologie moléculaire

Objectif **sanitaire** à visée diagnostic, pronostic ou thérapeutique

- Lymphomes
- Sarcomes
- Tumeurs pédiatriques
- Tumeurs cérébrales
- Tumeurs broncho-pulmonaires (femmes non fumeuses)
- Cancers colo-rectaux (moins de 60 ans)

Objectif **scientifique** : projet de recherche

- Tumeurs digestives
- Cancers du Sein
- Carcinomes pulmonaires
- Tumeurs cérébrales
- Mélanomes

Mission 1 = sanitaire

- Préserver les échantillons biologiques
- Garantir aux médecins la possibilité de revenir sur ces archives biologiques
- Conditionne l'autorisation des établissements de santé pour le traitement du cancer
- Assurer la cryoconservation dans le cas où elle s'avère être un prérequis à la réalisation des examens

Mission 2 = scientifique

- Collections de ressources biologiques (données comprises)
- Recherche en cancérologie (plan cancer)
- Stratégie d'établissement et de consortiums scientifique
- Enjeu important

Aspects réglementaires

art. 1243-4 et 1235-1 du CSP

- Déclaration de collection pour ses propres besoins DC-2014-1234
- Déclaration de collection à des fins de cession AC-2018-1234
 - Renouvelable tous les 5 ans
 - Bilan d'activité
- Autorisations d'export/import IE-2020-1234
 - Pour chaque destinataire
 - 2 mois de délais maximum
 - Cellules ministère recherche
 - Valable 5 ans



**MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Aspects éthique et réglementaire

- RIPH

- CPP
- déclaration de collection en fin d'étude
- Réutilisation

- Hors RIPH

- recueil dans le cadre du soin
- pas geste supplémentaire
- déclaration de la collection

Info + Non opposition

OU

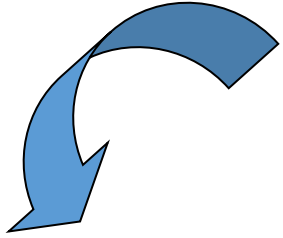
Consentement (génétique constitutionnelle)

OU

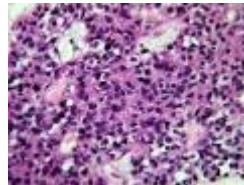
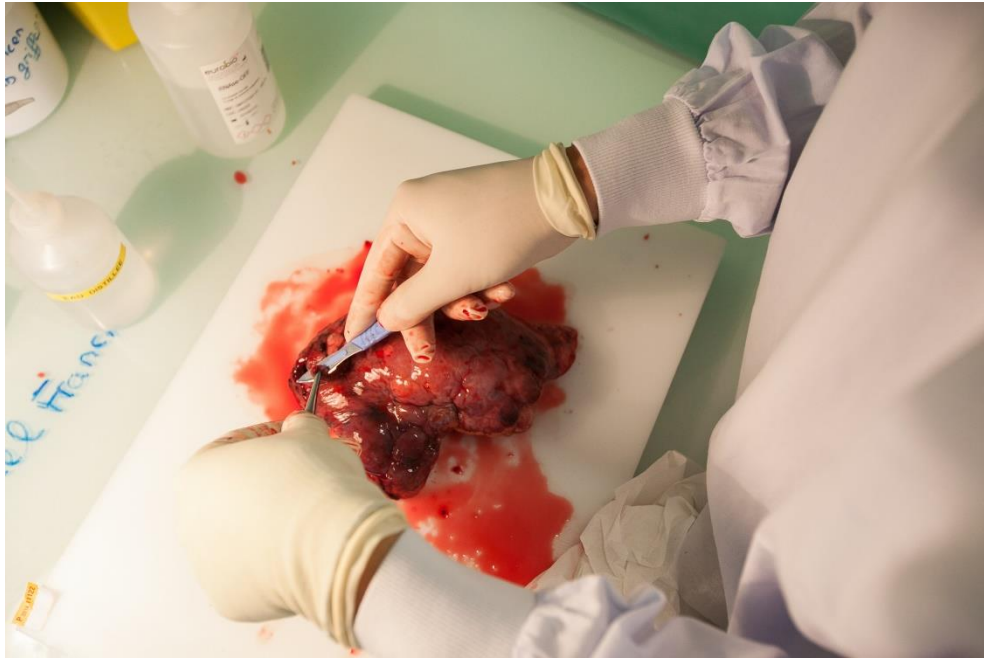
Possibilité d'interroger le CPP pour déroger
(études rétrospectives, selon pathologies...)

Données associées

- CNIL
 - Données de santé
 - À caractère personnel
- RGPD
- DPO
- Méthodologie de référence MR



Prise en charge d'un
prélèvement pour
tumorothèque

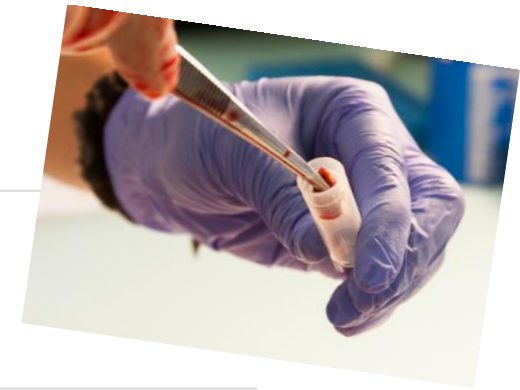
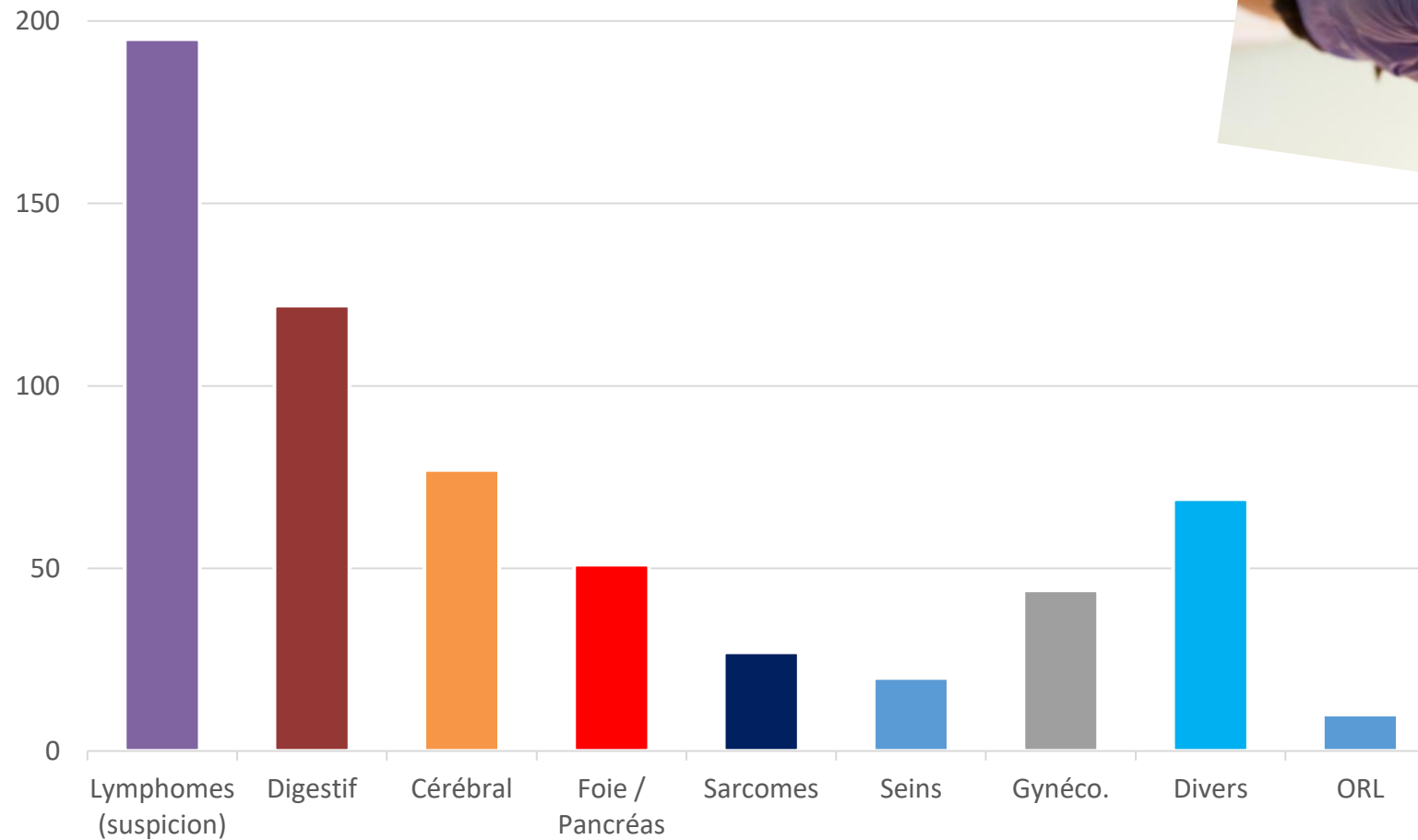


Contrôle (lame miroir)

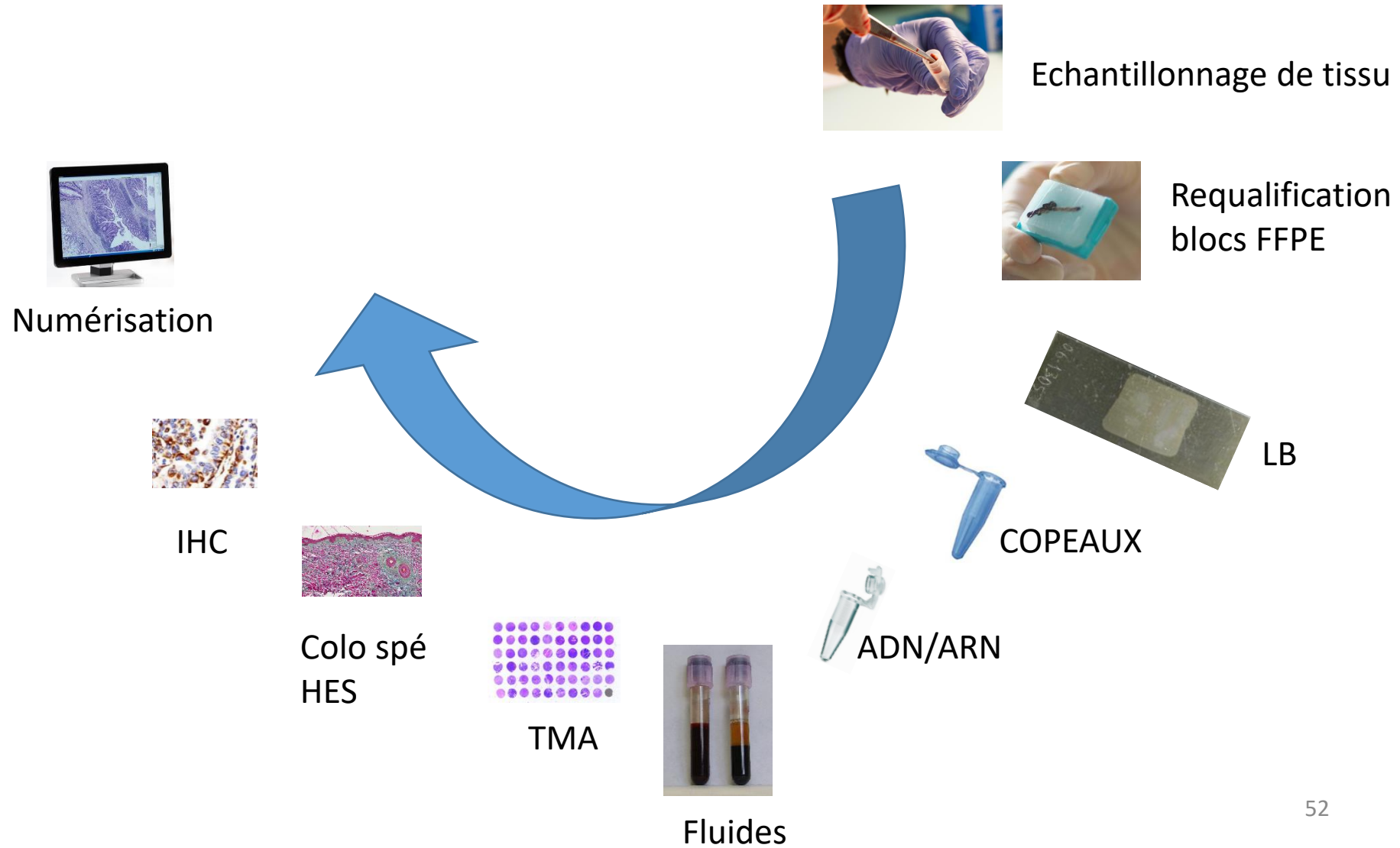
Processus Réception



Congélations 2022



Processus Préparation



Processus Stockage



Gestion des collections de prélèvements

GIBERT ADMIN TumoroteK® v1.07

Vous êtes connecté sur: IMM Aide Adulact Quitter

PATIENT PRÉLÈVEMENT ECHANTILLON STOCKAGE CESSION ADMINISTRATION

Sélection des échantillons à déplacer

Sélectionnez un conteneur: CONGELATEUR TAMPON

CONGELATEUR TAMPON

Boîte : B2 (LYMPHOMES)

Code	Adresse
190506002356.102.C1.T1.B2.1 X	Tout effacer

Code Adresse

190506002356.102.C1.T1.B2.1 X

[Tout effacer](#)

Retour Deplacer les échantillons

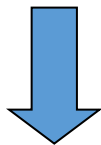
CONGELATEUR TAMPON

- C1 [1181]
 - T1 [385]
 - B1 GETUG 12 [92]
 - B2 LYMPHOMES [98]
 - B3 REIN IGR [100]
 - B4 [95]
 - T2 [396]
 - T3 [400]
- C2 [1200]
- C3 [1200]
- C4 [1200]

SGL / DPP



ADN
Congélateur -80° C



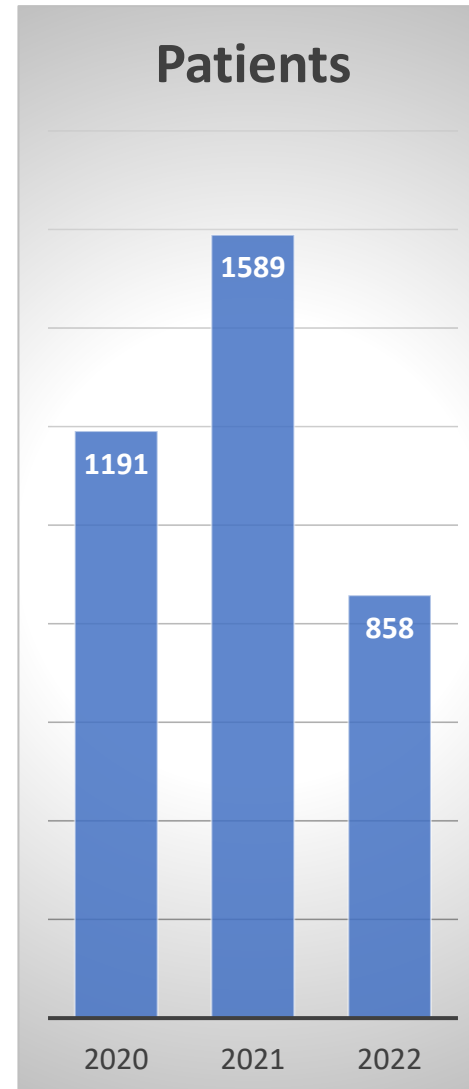
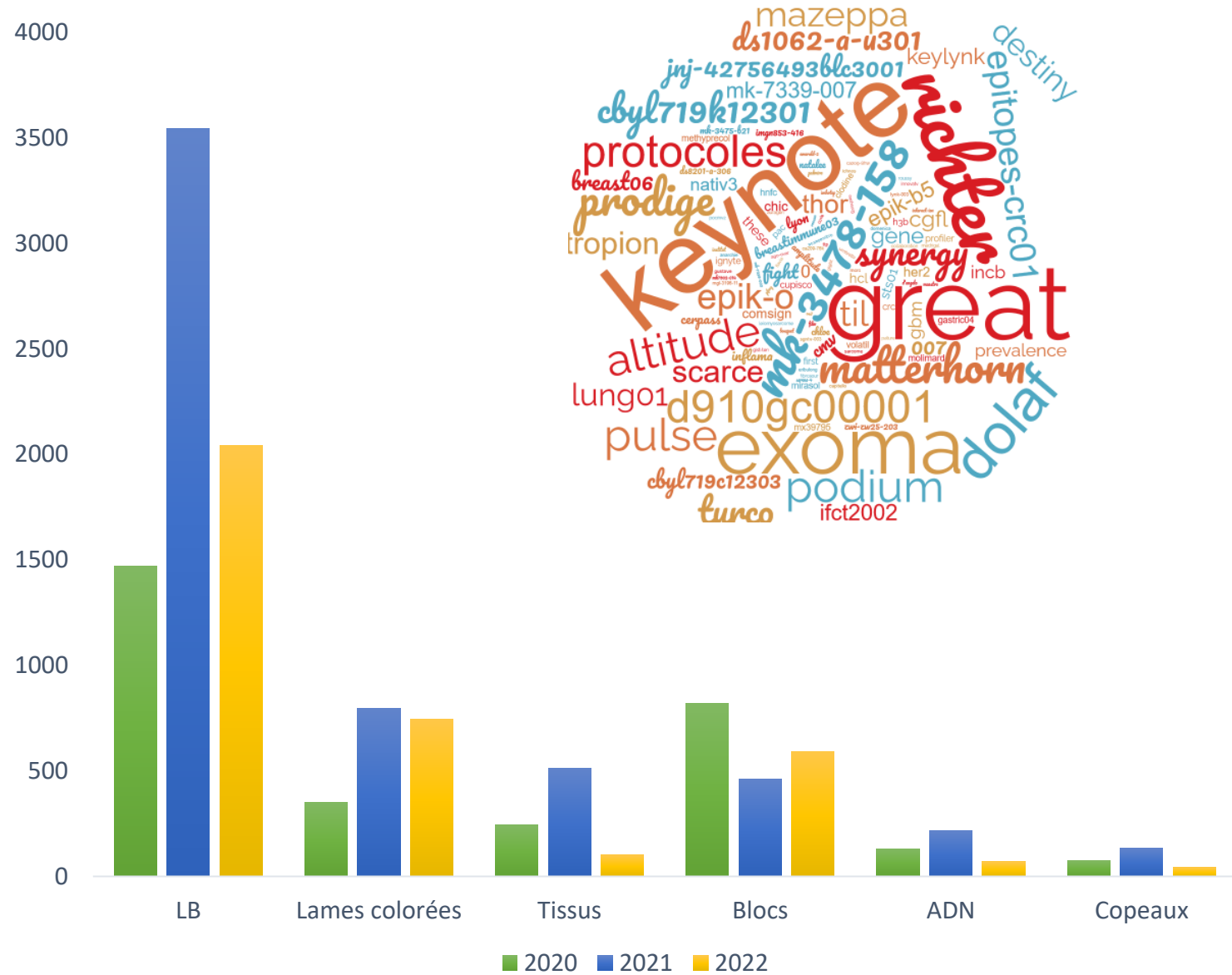
Tissus / cellules
Cuve à azote -196° C



Blocs



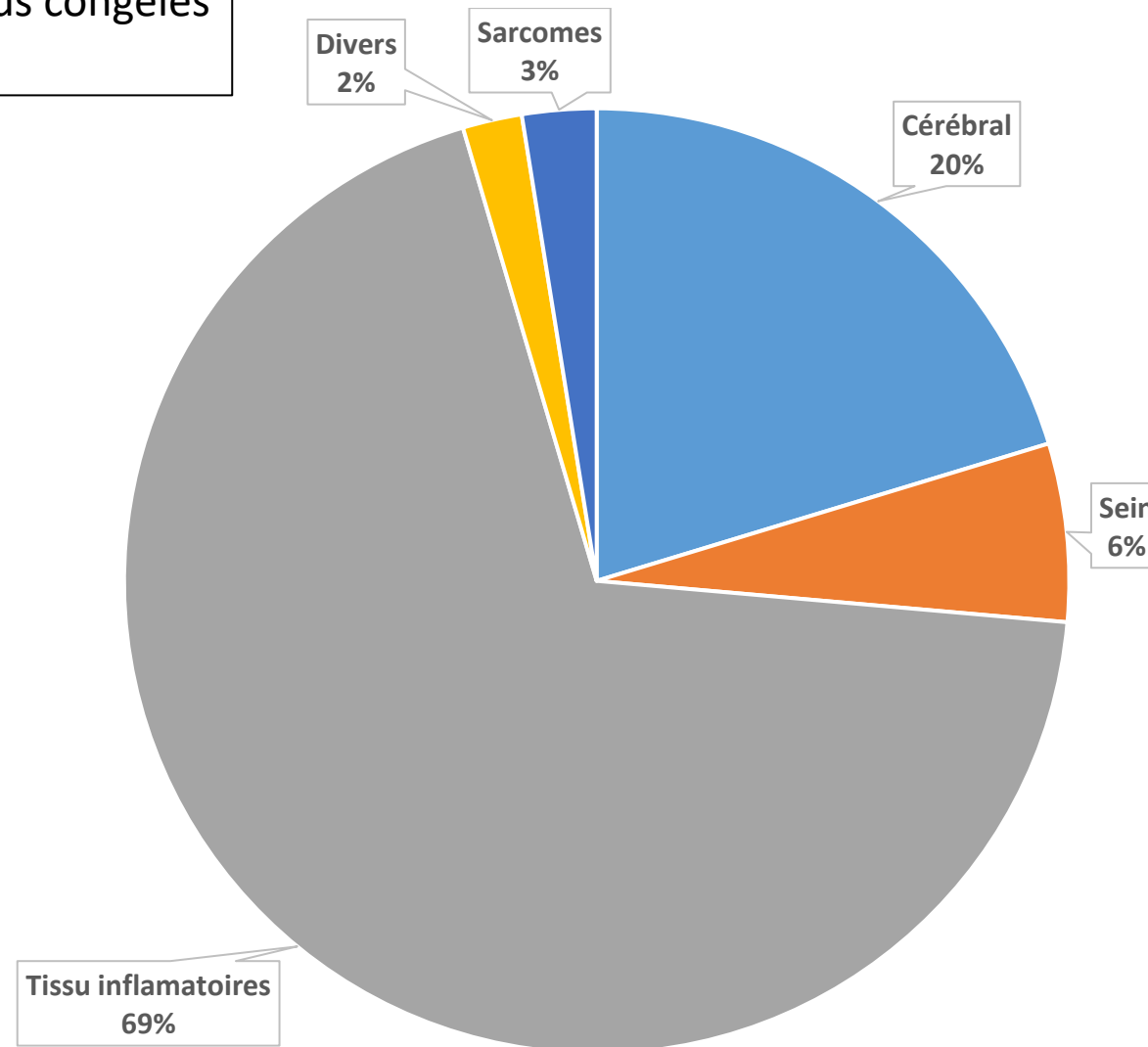
Processus mise à disposition



Processus mise à disposition



Cessions de tissus congelés
2022





Enseignement

- Environ 60h ETD hors temps de travail hospitalier
- Diagnostic cellulaire *in situ* et biostatistiques

Collaborations diverse

- Thèses d'universités (UMR1098 : Molimard, Viot, Monnier...)
- Thèses exercice (D'Angelo, Mazars, Braunstein, Dor...)
- Master2 (CX3CR1 mCRC, HERV sein)

Expertise avec l'appuis des médecins pathologistes

- Immunohistochimies
- hybridation *in situ*
- numérisation de lames
- interprétation
- analyse d'image
- TMA

Extractions de données (registre, chirurgie digestive, oncologie...)

Publications

« Blocs thèque »

- Protocoles recherche FFPE
- Suivi rigoureux depuis 2017 (étude de faisabilité, base recherche, facturation...)
- Application des procédures congélation aux blocs FFPE
 - Collections
 - Demandes de mise à disposition
 - Cession
- Culture qualité qui s'installe dans le pôle et le service (traçabilité, habilitation, recueil des non-conformités, rédaction de mode opératoires etc...)

Procédure

- **Mise à disposition / mise en place de collection**
- Formalisation site internet
- Faisabilité => base de données / consentements / éléments technique
- Conseil scientifique (15 jours de délais)
- Contractualisation / MTA selon demandeur

Suivi de l'organisation des tumorothèques

- Bilan annuels
 - Données d'activité
 - Recensement des collections
 - Estimation des volumes
 - Estimation du niveau d'organisation
 - Qualité des contributions scientifiques

→ Financements

- Aujourd'hui déclaration possible uniquement si certification



La norme NF S96-900

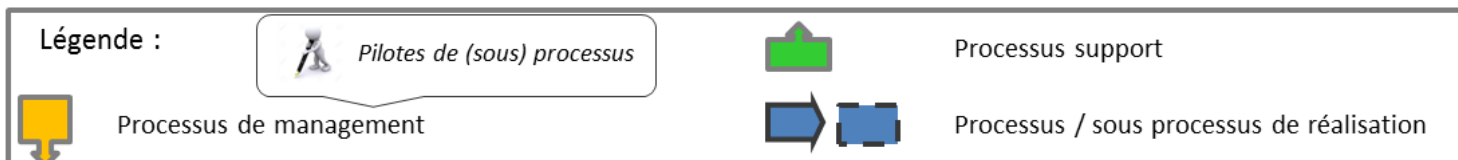
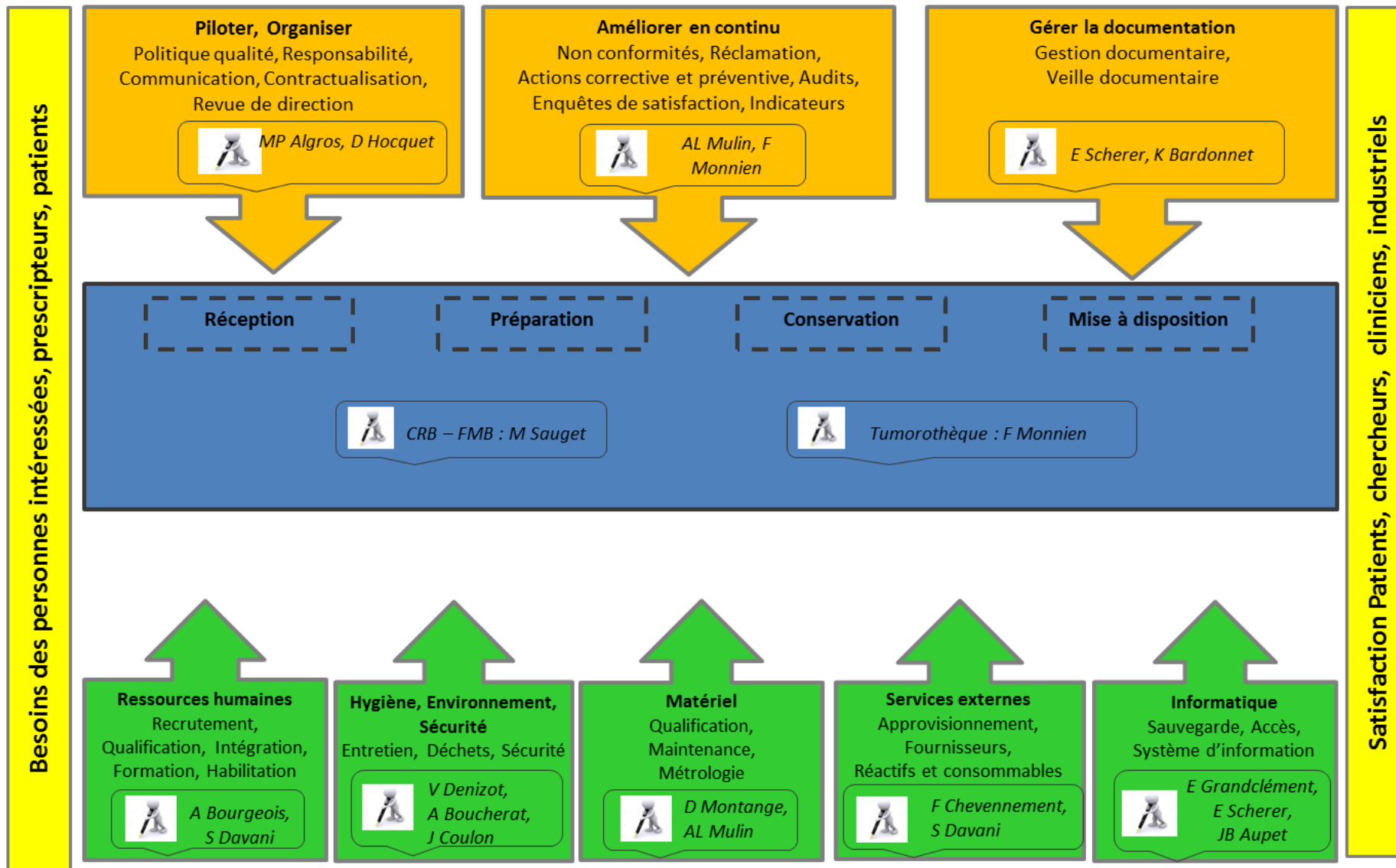
- Centre de Ressources Biologiques « filière tissu » → Recherche
- Maîtriser la qualité de l'échantillon
- = « confiance en l'outil » pour le chercheur
- Standardisation

2014 → Certification

2017 → renouvellement + extension du périmètre filière micro-organisme

2020 → renouvellement + extension du périmètre blocs FFPE (et filière fluide)

2023 → passage norme ISO20387



Les acteurs de la recherche au CHU



Le centre d'investigation clinique : Inserm CIC 1431 [↗](#)

- uMETH - unité de méthodologie [↗](#)
- Plateforme DinaMic pour l'évaluation clinique des dispositifs médicaux [↗](#)
- SINETIC - soutien investigation clinique [↗](#)

- Unité de méthodologie et de qualité de vie en cancérologie [↗](#)

- Le Centre de ressources biologiques (CRB) :
 - CRB Tumorothèque [↗](#)
 - CRB-Filière microbiologique [↗](#)

- Registre des tumeurs du Doubs [↗](#)

La délégation à la recherche clinique et à l'innovation

Les plateformes thématiques :

- Groupe Cochrane cancer du poumon [↗](#)
- Plateforme de neuroimagerie fonctionnelle et neurostimulation - Neuraxess [↗](#)
- Plateforme de télémédecine [↗](#)
- Thérapeutiques immuno-moléculaires des cancers et des maladies inflammatoires : 6 plateformes dédiées

La suite ...

- Tumorotheque = outil
- Aide à la structuration de l'activité recherche du service
- Réserve de sujet (entre autre) liés aux demandes de mise à disposition
- Pas uniquement en cancérologie (traumato, néphro, hépato, gynéco...)
- Congélation « tout venant » vs ciblée et prospectif