



# Étude des mutations des gènes KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, MET et de l'expression des protéines P53 et PTEN et leurs implications cliniques dans le carcinome ovarien de haut grade

Shuhui Chen

## ► To cite this version:

Shuhui Chen. Étude des mutations des gènes KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, MET et de l'expression des protéines P53 et PTEN et leurs implications cliniques dans le carcinome ovarien de haut grade. Cancer. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0093 . tel-01754671v2

**HAL Id: tel-01754671**

**<https://hal.science/tel-01754671v2>**

Submitted on 17 Dec 2016

**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.



**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**Par CHEN Shuhui**

**Etude des mutations des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET* et de l'expression des protéines P53 et PTEN et leurs implications cliniques dans le carcinome ovarien de haut grade**

**28 juillet 2016**

**Membres du jury :**

- Rapporteurs : M Cyril Touboul, MCU-PH, HDR, CH Intercommunal Créteil et Université Paris Est, INSERM U965, Hôpital Lariboisière, Paris
- M Alain Jung, Chercheur, HDR, EA3430 Université de Strasbourg et Centre Paul Strauss, Strasbourg
- Examineurs : M François Guillemin, PU-PH, Faculté de Médecine, CNRS UMR 7039 CRAN Université de Lorraine et Institut Jean Godinot, Reims
- M Jean-Christophe Sabourin, PU-PH, Faculté de Médecine, et CHU Rouen, INSERM U1079, Rouen
- M Alexandre Harlé, MCU-PH associé, Faculté de Pharmacie, CNRS UMR 7039 CRAN Université de Lorraine et Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy
- Directeur de thèse : M Jean-Louis Merlin, PU-PH, Faculté de Pharmacie, CNRS UMR 7039 CRAN Université de Lorraine et Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy

**CRAN : Centre de Recherche en Automatique de Nancy**

**Campus Science, Bld des Aiguillettes-BP 70239, 54506 VANDOEUVRE LES NANCY CEDEX**

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse :

A mon maître et directeur de thèse, Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN. Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Biologie des Tumeurs et de m'avoir encadrée pour ma thèse. Merci d'avoir partagé vos connaissances et votre expérience, de m'avoir prodigué vos conseils depuis notre première rencontre et tout au long de ce travail. Merci pour votre rigueur scientifique, votre patience et pour la confiance que vous m'avez accordée. Veuillez-trouvez ici, encore une fois, ma plus sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Alain JUNG. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail et d'en être rapporteur. Merci pour votre gentillesse et vos conseils en tant que membre du comité de suivi de ma thèse où j'ai eu le plaisir de faire votre connaissance.

A Monsieur le Docteur Cyril TOUBOUL. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. J'ai le plaisir et l'honneur de voir mon travail jugé du point de vue de la gynécologie oncologique auprès de vous. Merci pour votre disponibilité. Veuillez accepter toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur François GUILLEMIN. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de témoigner l'aboutissement de mes études depuis l'année 2007. J'ai beaucoup appris auprès de vous, tant au bloc opératoire qu'en salle de RCP. Recevez mes remerciements les plus sincères pour des années empreintes de vos gentillesse.

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'y apporter votre point de vue d'anatomo-pathologiste. Merci pour votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Alexandre HARLÉ, assistant du laboratoire de l'Unité de Biologie des Tumeurs mon ami. Merci d'avoir accepté de juger mon travail. Durant toute ma thèse, tu m'as su partager avec moi tes connaissances et ton expérience, merci pour ton aide, ton soutien et ton amitié. Reçois tous mes remerciements pour le temps que tu as consacré à la correction des multiples versions de ma publication.

Ensuite, je voudrais exprimer ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail :

Au Directeur de l'UMR 7039 CRAN, Monsieur le Professeur Didier WOLF. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre laboratoire. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame Catherine BARLIER. Merci d'avoir participé à ma thèse en tant qu'anatomo-pathologiste. Vous êtes toujours là quand j'ai besoin d'aide et d'opinion. Merci de m'avoir présenté la branche Lorraine de l'Association Française des Femmes Médecins. J'ai

beaucoup appris à chaque fois des rencontres de l'association. Veuillez trouver ici le témoignage de mes plus sincères remerciements.

Au stagiaires Yonca GULER et Elisa CAVAZZA. Merci d'avoir participé aux manipulations de ma thèse. Merci et bonne continuations à vos travaux et vos études.

Aux techniciennes du laboratoire de l'Unité de Biologie des Tumeurs et mes amies : Carole RAMACCI, Cindy DUBOIS, Marie HUSSON et Marie ROUYER. Merci de m'avoir appris de nombreuses techniques appliquées dans ma thèse et de m'avoir partagé vos expériences de vie. J'ai eu le plaisir de faire des soirées « de filles » avec vous et Maëva LION et je suis sûre que ça me manquera une fois rentrée en Chine !

A Madame Julia SALLERON. Je vous remercie pour vos compétences professionnelles du côté de l'analyse statistique de mon travail et vos gentillesse lors de la relecture de ma publication.

Enfin, je voudrais dire merci à mes amis chinois. Merci d'avoir participé à la réunion bihebdomadaire et partagé vos connaissances scientifiques. Merci pour votre entourage et votre soutien. Je souhaite bon courage à ceux dont les études sont encore en cours et je me réjouis de revoir ceux qui sont retournés en Chine après avoir fini leurs études en France.

Particulièrement, je voudrais dire merci à l'ensemble de ma famille et à ma belle-famille. Merci tout d'abord à ma maman, grâce à vous j'ai pu aller à l'école étant qu'une fille née et ayant grandi dans un petit village éloigné en Chine. Votre persévérance m'a ouvert une piste de vie toute différente. Je ne serais pas là sans vous. Ensuite merci à mon conjoint Philippe, merci pour ton amour, ton soutien, ta confiance et ton encouragement, grâce à toi, ces 5 ans de vie en France deviennent fructueux, tant au plan professionnel qu'au plan personnel. Je dédie cette thèse à ma maman, à toi et à notre fils Isidore.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	i
INDEX DES FIGURES .....	vii
INDEX DES TABLEAUX .....	ix
ABREVIATIONS .....	xi
RÉSUMÉ .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
A. CARCINOME DE L'OVAIRE .....	2
1. Généralités .....	2
2. Epidémiologie .....	2
3. Classifications des cancers de l'ovaire.....	6
3.1 Classification clinique des tumeurs selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) 2014 .....	6
3.2 Classification histologique de l'OMS 2014.....	8
3.2.1 Les carcinomes séreux.....	8
3.2.2 Les carcinomes endométrioides.....	11
3.2.3 Carcinomes à cellules claires.....	12
3.2.4 Carcinomes mucineux .....	13
3.3 Classification basée sur la pathogénèse-moléculaire.....	14
3.3.1 Les mutations activatrices des voies de signalisation .....	14
3.3.3.1 Les mutations des gènes <i>KRAS</i> et <i>NRAS</i> .....	15
3.3.3.2 Les mutations du gène <i>BRAF</i> .....	16
3.3.3.3 Les mutations du gène <i>PIK3CA</i> .....	16
3.3.3.4 Les altérations du gène <i>MET</i> .....	16
3.3.2 Les mutations engendrant une perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs .....	16
3.3.3.1 Les altérations du gène <i>TP53</i> .....	16
3.3.3.2 Les altérations du gène <i>PTEN</i> .....	18
4. Stratégies thérapeutiques .....	19
4.1 Traitement standard .....	19

4.1.1 La chirurgie .....	19
4.1.2 La chimiothérapie cytotoxique .....	20
4.1.3 Nouvelles stratégie thérapeutiques .....	21
4.1.3.1 Les traitements anti-angiogéniques .....	21
4.1.3.2 Les inhibiteurs de PARP .....	21
5. Facteurs pronostiques.....	23
5.1. Facteurs de risque liés à la tumeur .....	23
5.1.1 Stade FIGO .....	23
5.1.2 Type histologique.....	23
5.1.3 Grade histologique.....	23
5.1.4 Facteurs biologiques.....	24
5.1.5 Profils d'expression génique .....	24
5.2 Facteurs pronostiques liés aux patientes .....	24
5.3 Facteurs pronostiques liés aux traitements.....	24
5.3.1 Qualité de la chirurgie et résidu tumoral en fin de l'intervention. ....	24
5.3.2 Intervalle libre sans progression .....	25
PARTIE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL .....	26
B. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS.....	27
1. Justification et hypothèses de travail.....	27
2. Objectifs de travail .....	27
C. PATIENTES, MATERIEL ET METHODES .....	28
1. Sélection des patientes .....	28
2. Traitement des prélèvements.....	28
3. Méthodes d'analyses .....	29
3.1. Recherche de mutations somatiques par les techniques de biologie moléculaire .....	29
3.1.1. Etape pré-analytique : préparation des coupes sur lames et coloration à l'hématoxyline-Eosine-Safran (HES), détermination du pourcentage de cellules tumorales .....	29
3.1.2. Extraction des ADN à partir des prélèvements congelés .....	31
3.1.3. Dosage de l'ADN extrait .....	31
3.1.4. Analyse des mutations par PCR-HRM ( <i>Polymerase Chain Reaction High Resolution Melting</i> ) .....	32
3.1.5. Analyse de mutations par séquençage haut-débit.....	35

3.1.5.1. Préparation de la librairie .....	35
3.1.5.1.1. Amplification des séquences d'intérêt .....	35
3.1.5.1.2. Contrôle des produits de PCR sur gel d'agarose .....	37
3.1.5.1.3. Purification des amplicons .....	37
3.1.5.1.4. Dosage des amplicons.....	37
3.1.5.2. La PCR en émulsion .....	39
3.1.5.2.1. Amplification sur billes de la librairie .....	39
3.1.5.2.2. Enrichissement des ADN sur billes .....	41
3.1.5.3. Préparation du run de séquençage .....	43
3.1.5.4. Pyroséquençage .....	44
3.2. Détermination du statut de P53 et de PTEN par Immunohistochimie .....	45
4. Méthodes statistiques.....	48
D. RESULTATS .....	49
1. Caractéristiques des patientes.....	49
2. Analyse des mutations somatiques .....	50
2.1 Dosage des ADN extraits .....	50
2.2 Recherche de mutations par PCR-HRM .....	50
2.3 Recherche de mutations par séquençage haut-débit.....	54
3. Analyse de l'expression tissulaire des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie (IHC) .....	57
3.1 Etude de l'expression de la protéine P53 .....	57
3.2 Etude de l'expression de la protéine PTEN.....	57
3.3 Analyse statistique d'association de l'expression des protéines P53, PTEN et les caractéristiques clinico-pathologiques .....	59
4. Analyse statistique des survies .....	60
4.1 Analyse statistique de la survie sans progression (SSP) .....	60
4.2 Analyse statistique de la survie globale (SG) .....	60
E. DISCUSSION .....	63
1. Détection des mutations <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> et <i>PIK3CA</i> par PCR-HRM .....	63
2. Détection des mutations <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> et <i>MET</i> par séquençage haut-débit (NGS).....	64
3. Comparaison de la technique de PCR-HRM avec celle de séquençage NGS.....	68
4. Analyse de l'expression des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie .....	68

<b>4.1 P53 .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 PTEN .....</b>	<b>70</b>
<b>5. Patientes porteuses de mutations germinales de <i>BRCA</i> dans notre étude .....</b>	<b>71</b>
<b>F. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>95</b>



## INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Schémas de l'appareil génital féminin en coupes frontale et sagittale. ....	3
Figure 2 : Schéma représentant la coupe transversale d'un ovaire. ....	4
Figure 3 : Evolution du nombre de cas et de décès (histogramme) et des taux standardisés monde correspondants (TSM) (courbe, échelle logarithmique) de cancers de l'ovaire de 1995 à 2015 en France. ....	5
Figure 4 : Hypothèse d'origine pathogénique des carcinomes ovariens. ....	10
Figure 5 : Sections tumorales de carcinomes séreux de bas-grade (A) et de haut-grade (B) en coloration hématoxyline éosine. ....	10
Figure 6 : section tumorale des carcinomes endométrioides de bas-grade en présence des glandules accolées dos à dos en coloration hématoxyline éosine. ....	12
Figure 7 : section tumorale des carcinomes à cellules claires avec les architectures papillaire (A), tubulokystique (B) et solide (C) et présence des cellules cloutées (D). ....	13
Figure 8 : section tumorale des carcinomes mucineux de type intestinal avec invasion stromale de façon expansible (A) et de façon expansible (en haut) et infiltrante (en bas) (B). ....	14
Figure 9 : La voie de signalisation des MAP kinases. ....	15
Figure 10 : Schéma récapitulatif de la voie de la PI3 kinase après activation par un Récepteur à activité tyrosine kinase. ....	17
Figure 11 : Sous-types histologiques et moléculaires des carcinomes ovariens. ....	19
Figure 12 : Implications des protéines BRCA1/2 et PARP dans les processus de réparation de l'ADN. ....	22
Figure 13 : Illustration de la procédure de la sélection des patientes. ....	29
Figure 14 : Photographies du Cryostat Leica 1850 lors de la coupe d'un fragment congelé. ....	30
Figure 15 : Photos de coupes tumorales établies au cryostat, posées sur lames et colorées par Hématoxyline, Eosine, Safran (HES). ....	30
Figure 16 : Schéma de principe de l'extraction d'ADN à l'aide du kit « QIAamp DNA mini kit » (Qiagen). ....	32
Figure 17 : Photo du NanoVuePlus™. ....	32
Figure 18 : Représentation schématique de la libération du Resolight® (en vert) de différents amplicons (1), (2) et (3) lors de l'augmentation de la Température. ....	34
Figure 19 : Comparaison des courbes de fusion haute résolution de deux échantillons analysés avec celles des témoins muté et non muté. ....	34
Figure 20 : Dérivées des courbes de fusion par rapport à la courbe du témoin non muté. ....	35
Figure 21 : Programme du thermocycleur pour les PCR TAG et MID. ....	36
Figure 22 : Schémas représentatifs des PCR TAG et MID. ....	36
Figure 23 : Diagramme du mode opératoire de la « High Pure PCR Product Purification » (Roche Diagnostic). ....	38
Figure 24 : Schéma de principe de la purification « Agencourt AMPure XP » (Beckman Coulter, USA). ....	39

Figure 25 : Droite d'étalonnage obtenue par dosage au Picogreen d'une gamme de dilutions d'ADN standard. ....	39
Figure 26 : Schéma récapitulatif de la réaction de PCR en émulsion. ....	41
Figure 27 : Programme du thermocycleur pour la PCR en émulsion.....	41
Figure 28 : Schéma de principe de l'enrichissement des billes suivant l'étape de PCR en émulsion.....	42
Figure 29 : Le «GS Junior emPCR Bead Counter» (Roche Diagnostics).....	43
Figure 30 : Représentations macroscopique (B) et microscopiques (A et C) de la «PicoTiterPlate». ....	44
Figure 31 : Schéma de principe de la réaction de pyroséquençage. ....	45
Figure 32 : Photo de l'automate BenchMark Ultra®. ....	46
Figure 33 : Schéma de principe de la révélation immunohistochimique par l'« UltraView Universal DAB Detection Kit ». ....	47
Figure 34 : Détermination du Cycle Threshold (Ct) sur les courbes de PCR en temps réel..	52
Figure 35 : Exemple d'une analyse par PCR HRM chez une patiente mutée pour l'exon 3 du gène NRAS. ....	52
Figure 36 : Exemple d'une analyse par PCR-HRM pour une tumeur non mutée pour le gène recherché. ....	54
Figure 37 : Exemples de contrôle d'amplicons par migration sur gel d'agarose.....	55
Figure 38 : Paramètres qualitatifs du 1er run de séquençage. ....	56
Figure 39 : Pyrogrammes de la séquence mutée c.181C>A du gène NRAS chez la tumeur 28. ....	57
Figure 40 : Analyse de l'expression tissulaire des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie (IHC) (X20).....	58

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Les gènes de susceptibilité au cancer de l'ovaire.....	6
Tableau 2 : Stadification des cancers de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO).....	7
Tableau 3 : Fréquences relatives des différents sous-types de carcinomes ovariens .....	8
Tableau 4 : Principaux protocoles de chimiothérapie adjuvante des carcinomes ovariens primaires .....	20
Tableau 5 : Caractéristiques clinico-pathologiques des patientes. ....	49
Tableau 6 : Pourcentages de cellules tumorales estimés sur les coupes histologiques des prélèvements et concentrations d'ADN obtenues après extraction de ces tissus. ....	51
Tableau 7 : Analyse de mutations somatiques par PCR-HRM et séquençage haut-débit. ..	53
Tableau 8 : Association entre l'expression de P53 et PTEN et les caractéristiques clinico-pathologiques.....	59
Tableau 9 : Facteurs pronostiques de la survie sans progression (SSP) (A) et la survie globale (SG) (B). ....	61
Tableau 10 : Essais cliniques en cours évaluant des inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. ....	73
Tableau 11 : Essais cliniques des thérapies ciblées combinées sur des carcinomes ovariens. ....	74
Tableau 12 : Essais multi-centriques destinés à étendre l'AMM des inhibiteurs de PARP dans le carcinome ovarien. ....	75
Tableau 13 : Essais cliniques de phase III d'association des inhibiteurs de PARP et des agents anti-angiogéniques . ....	76

## TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Mode opératoire de la coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) en méthode manuelle. ....	93
ANNEXE 2 : Protocole d'extraction d'ADN à partir de tissu (QIAmp DNA Mini kit). ....	96
ANNEXE 3 : Feuille de travail pour la préparation d'une plaque de PCR-HRM (9 patients) pour l'analyse des mutations de l'exon 3 du gène <i>KRAS</i> et des exons 2, 3 et 4 du gène <i>NRAS</i> . ....	100
ANNEXE 4 : Exemples des schémas de plaques 96 puits pour les PCR TAG et PCR MID. ...	101
ANNEXE 5 : Schéma de plaque 96 puits du dosage de 26 échantillons au Picogreen. ....	102
ANNEXE 6 : Détermination de la dilution des échantillons purifiés suite au dosage par Picogreen. ....	103
ANNEXE 7 : Résultats d'analyse des échantillons par les techniques de PCR-HRM, séquençage et immunohistochimie. ....	104
ANNEXE 8 : Publication actuellement soumise dans une revue internationale à comité de lecture.....	107

## ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique	GAP : GTPase-activating proteins
AFA : alcool, formol, acide acétique	GDP : guanosine 5'-diphosphate
AMM : Autorisation de mise sur le marché	GRB2 : growth factor receptor-bound 2
ARID1A : AT-rich interaction domain 1A	GTP : guanosine 5'-triphosphate
ATM : ataxia telangiectasia mutated	HATs: histone acetyltransferases
ATP : adenosine triphosphate	HDAC : histone deacetylase
ATR : ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	HER2 : human epidermal growth factor receptor 2
ATU : autorisation temporaire d'utilisation	HES : hématoxyline-éosine-safran
BRAF : v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B	HIF-1 alpha : Hypoxia-inducible factor-1 alpha
BRCA : breast cancer	HR : homologous recombination
CA125 : carbohydrate antigen 125	HRP : horse radish peroxidase
CRAN : centre de recherche en automatique de Nancy	HSP90 : heat shock protein 90
CSBG : carcinome séreux de bas-grade	KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
CSHG : carcinome séreux de haut-grade	MAPK : mitogen-activated protein kinase
DART : diagnostic avancé et recherche translationnelle	MEB : microscope électronique à balayage
DMSO : dimethyl sulfoxide	MEK : mitogen-activated protein kinase kinase
dNTPs : deoxyribonucleotide triphosphate	MLH1 : mutL homolog 1
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid	MSH2 : mutS protein homolog 2
EGFR : epidermal growth factor receptor	MSH6 : mutL homolog 6
ERK : extracellular signal-regulated kinases	mTOR : mammalian target of rapamycin
FANCD2 : Fanconi anemia group D2 Protein	NGS : next generation sequencing
FMA : frequency of mutated alleles	NRAS : neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

PARP : Poly ADP (*Adenosine Diphosphate*)-Ribose Polymerase

PCR-HRM : polymerase chain reaction high resolution melting

PEG : polyéthylène glycol

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PMS2 : postmeiotic segregation increased 2

PPM1D : protein phosphatase magnesium-dependent 1δ

PTEN : phosphatase and tensin homolog

PTP : PicoTiterPlate

FIGO : fédération internationale de gynécologie et de l'obstétrique

OMS : Organisation mondiale de la santé

RTK : receptor tyrosine kinase

SBS : santé biologie signal

SH3 : src (*sarcoma*) homology 3 domain

SG : survie globale

SSP : survie sans progression

TBE : tris base, boric acid, EDTA

TP53 : tumor protein 53

UMR : unité mixte de recherche

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

## RÉSUMÉ

**Objectifs:** Malgré leur grande hétérogénéité histologique et moléculaire, la prise en charge clinique des carcinomes ovariens de haut-grade (COHG) reste peu variable. Le pronostic sombre de cette pathologie implique un réel besoin des nouvelles thérapies. Au delà des marqueurs pronostiques histologiques classiques et des enquêtes oncogénétiques, l'objectif de cette étude a consisté à rechercher des cibles moléculaires pharmacologiquement recrutables afin de pouvoir proposer aux patientes un accès à la thérapie innovante et personnalisée.

**Méthodes:** Cette étude a été réalisée chez 53 patientes (pts) (âge moyen 58,9 ans, intervalle 25-87) de COHG histologiquement prouvés dont 45 pts de sous-type séreux. 19 pts ont fait l'objet d'une consultation et d'un test oncogénétique sur la base d'antécédents familiaux / personnel de cancer de sein/ovaire. chez. L'expression de P53 et de PTEN a été évaluée sur des tissus fixés au formol et inclus en paraffine par immunohistochimie. Les mutations somatiques de *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* ont été recherchées par PCR-HRM (*Polymerase Chain Reaction High Resolution Melting*) puis vérifiées par NGS (*Next Generation Sequencing*) sur des extraits d'ADN préparés à partir d'échantillons de tumeurs congelés, prélevés au moment du diagnostic.

**Résultats:** Des mutations germinales de *BRCA1* / 2 ont été identifiées chez 7 pts, toutes atteintes des carcinomes séreux. Une mutation du gène *KRAS* (exon 2), 2 mutations du gène *NRAS* (exon 3), 6 mutations du gène *PIK3CA* (exon 5, 10 et 21) et 5 mutations du gène *MET* (exon 14 et 18) ont été identifiées chez les 53 tumeurs par NGS, dont deux mutations du gène *NRAS* et 2 mutations du gène *PIK3CA* détectées précédemment par PCR-HRM. Aucun profil mutationnel multiple n'a été retrouvé. La surexpression de P53 et la perte d'expression de PTEN ont été constatées chez 32 sur 53 (60%) et 19 sur 46 (41%) des tumeurs. L'analyse statistique n'a été réalisée que chez le sous-groupe de pts atteintes des carcinomes séreux à cause de l'effectif de l'étude. Avec un suivi médian de 38 mois (intervalle de 6-93), 35 pts ont eu une rechute de la maladie et 25 pts sont décédées. La survie sans progression à 2 ans est 28%, et la survie globale à 5 ans est 37%. La surexpression de P53 a été trouvée associée à une meilleure chimiosensibilité, une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale.

**Conclusion:** Pour des COHG, au delà des altérations de P53 et PTEN, des anomalies génétiques somatiques concernant les voies de signalisation PI3K et MAPK ne sont pas rares et peuvent être détectées par NGS. L'identification de ces anomalies somatiques pourrait offrir une possibilité des thérapies ciblées innovantes pour les patientes sur la base d'éléments diagnostiques moléculaires.

**MOTS CLÉS :** carcinome ovarien de haut-grade (COHG); voies de signalisation; PCR-HRM; NGS (Next Generation Sequencing); Immunohistochimie;thérapie ciblée

## ABSTRACT

**Objectives:** Despite the great histological and molecular heterogeneity, the clinical management of high-grade ovarian carcinoma remains univocal. As a major subgroup of ovarian carcinoma, high-grade ovarian carcinomas (HGOC) need novel therapy. Additionally to conventional histological prognostic markers and oncogenetic investigations, molecular diagnostic was performed using PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction High Resolution Melting) and NGS (Next Generation Sequencing) to identify "druggable" targets that could provide access to innovative personalized therapy.

**Methods:** This study was performed in 53 patients (pts) (mean age 58.9 years, range 25-87) with histologically proven HGOC of which 45 pts with serous carcinoma. BRCA1/2 germline mutations had been screened in 19 pts with familial/personal history of breast/ovarian cancer justifying oncogenetic investigations. P53 and PTEN expression was assessed on formalin fixed paraffin-embedded tissues using immunohistochemistry. Somatic mutations of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *MET* were screened using PCR-HRM and then confirmed using NGS on DNA extracts from frozen tumor specimens taken at diagnosis.

**Results:** Seven pts had *BRCA1* / 2 germline mutations, all had serous carcinomas. One mutation of *KRAS* (exon 2), 2 mutations of *NRAS* (exon 3), 6 mutations of *PIK3CA* (exon 5, 10 and 21) and 5 mutations of *MET* (exon 14 and 18) were identified using NGS, of which 2 mutations of *NRAS* and 2 mutations de *PIK3CA* detected previously by PCR-HRM, no multiple mutation was detected. P53 overexpression and PTEN loss of expression was detected respectively in 32 of 53 (60%) and 19 of 46 (41%) of all the tumors. Because of the effective of the study, statistical analyses were restricted to pts with serous carcinoma. With a median follow-up of 38 months (range 6-93), 35 pts had disease progression and 25 pts died during the follow-up. The 2-year progression-free survival (PFS) rate was 28% and 5-year overall survival (OS) rate was 37%. Overexpression of mutant P53 was found to be associated with chemosensitivity and longer PFS and OS.

**Conclusion:** In HGOC, beside P53 and PTEN alterations, somatic genetic abnormalities of PI3K and MAPK signaling pathways can be detected using NGS and provide molecular rationale for targeted therapies, potentially offering new therapeutic opportunities to the patients.

**KEYWORDS:** High-grade ovarian carcinoma; signaling pathway; HRM (High Resolution Melting) PCR; NGS; Immunohistochemistry; Targeted Therapy.



## PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## A. CARCINOME DE L'OVAIRE

### 1. Généralités

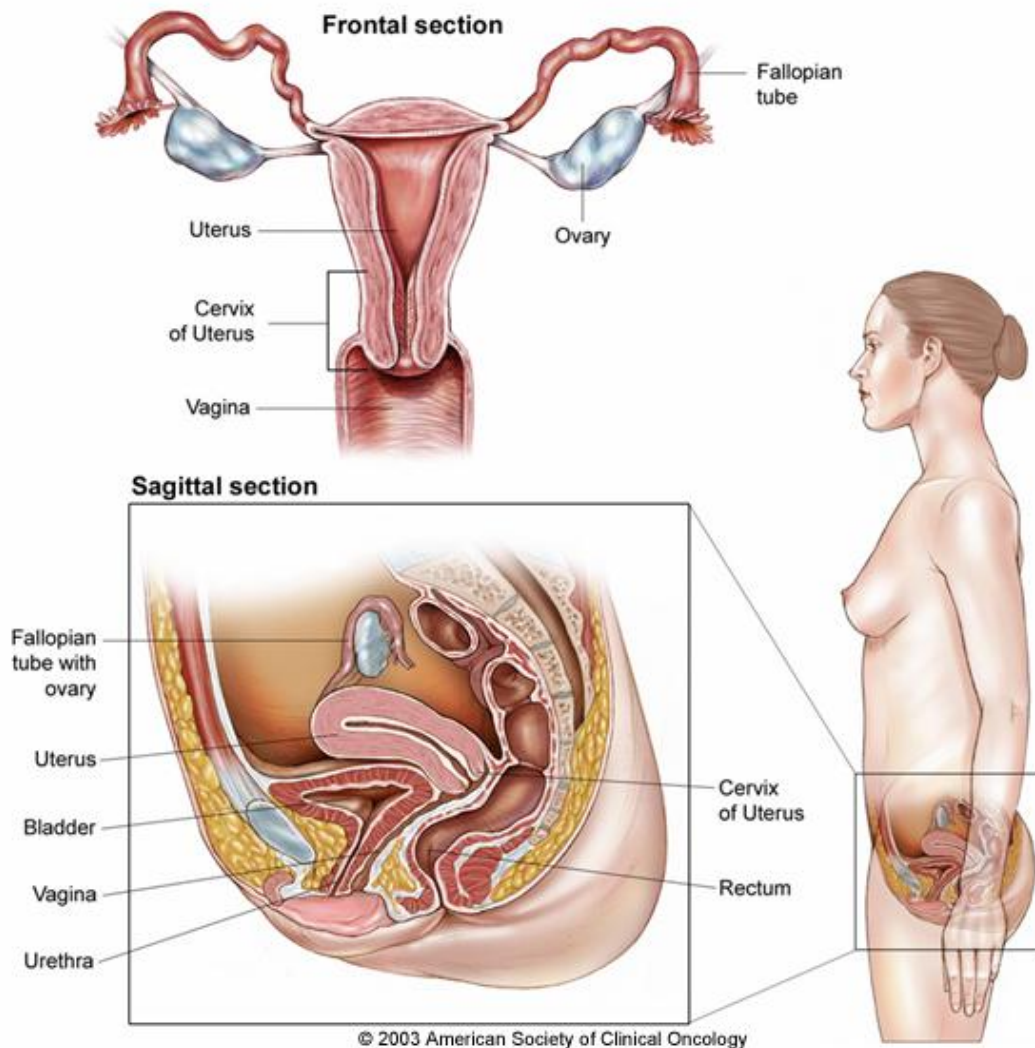
Les ovaires sont deux glandes appartenant à l'appareil génital féminin interne qui se situent dans le bassin de chaque côté de l'utérus et relient celui-ci par les trompes de Fallope (Figure 1). Entouré d'une mince couche de tissu appelée capsule, les ovaires sont constitués de trois types différents de cellules : les cellules épithéliales, qui forment la couche externe des ovaires (épithélium); les follicules ovariens contenant des cellules germinales situées sous les cellules épithéliales et à partir desquels les ovules sont fabriqués ; les cellules du stroma, un tissu conjonctif qui remplit l'intérieur des ovaires et les cordons sexuels, qui font le lien entre le corps de l'ovaire et la surface épithéliale (Figure 2). Les fonctions principales de l'ovaire sont la production cyclique des ovules et la sécrétion d'hormones sexuelles (principalement les œstrogènes et la progestérone) impliquées dans la régulation de la reproduction et le développement des caractères sexuels.

Dans les cancers de l'ovaire, la tumeur se développe à partir des cellules de l'épithélium (carcinome) dans environ 90% des cas. Dans d'autres cas, plus rares, les tumeurs se développent à partir des cellules germinales (cancer des cellules germinales) ou des cellules des tissus de soutien de l'ovaire (cancer stromal et des cordons sexuels) (1–3).

### 2. Epidémiologie

En 2015, on estime que 255 660 femmes ont été atteintes d'un cancer de l'ovaire dans le monde et 163 765 femmes sont décédées de cette maladie, plaçant cette pathologie au 8<sup>ème</sup> rang des cancers de la femme et constituant la première cause de décès par cancers gynécologiques (4). En France, avec 4575 nouveaux cas et 3132 décès recensés en 2015, le cancer de l'ovaire constitue la 4<sup>ème</sup> cause de décès lié au cancer chez la femme (derrière les cancers du sein, du colon et du poumon) et l'un des cancers gynécologiques le plus meurtrier (5).

Bien que l'on constate une légère augmentation du nombre de nouveaux cas recensés de cancer de l'ovaire en France depuis 1995, parallèle à l'augmentation de la population totale et celle de la population âgée, l'incidence et la mortalité standardisé de ce cancer a plutôt tendance à diminuer (Figure 3). Entre 1980 et 2012, l'incidence standardisée en France a diminué de 16% au total, soit de 0.6% par an en moyenne, et de 1.2% par an entre 2005 et 2012 (6), ceci étant en rapport avec l'augmentation du nombre de femme exposées aux facteurs protecteurs tels que la réalisation d'une hystérectomie ou d'une ligature des trompes (7), ainsi que l'utilisation de la contraception orale (8). Parallèlement à la diminution de l'incidence, la mortalité standardisée du cancer de l'ovaire a diminué de 15.8% au total pendant la même période, soit de 1.2% par an en moyenne, et de 3.3% par an entre 2005 et 2012 (6).



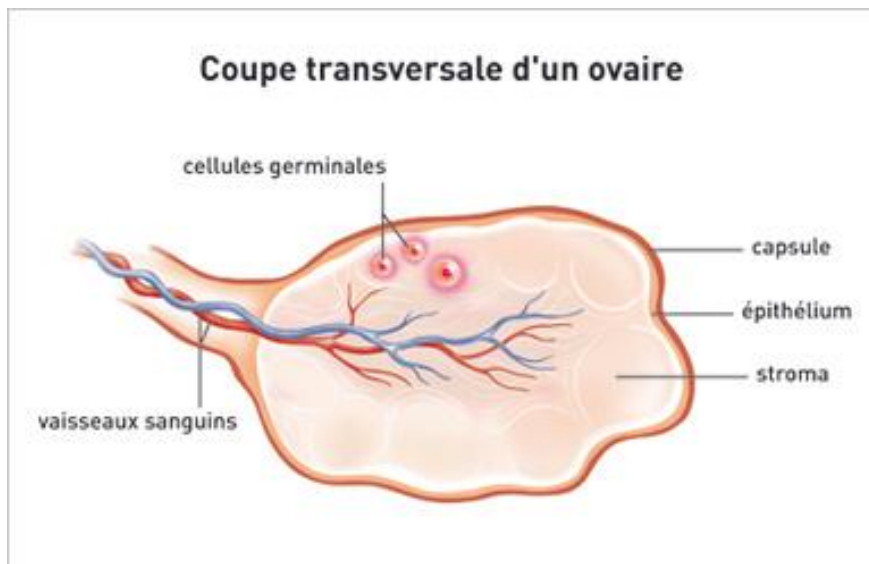
**Figure 1 : Schémas de l'appareil génital féminin en coupes frontale et sagittale.**

Les deux ovaires sont situés de chaque côté de l'utérus et reliés aux trompes de Fallope. Ils sont disposés dans la cavité pelvienne. Illustration d'après :

<http://www.cancer.net/cancer-types/ovarian-cancer/medical-illustrations>

Malgré la diminution de la mortalité du cancer de l'ovaire, le pronostic de cette pathologie reste assez sombre. Depuis les trois dernières décennies, la survie globale à 5 ans reste d'environ 45% malgré les progrès thérapeutiques (6). Le mauvais pronostic est principalement lié à un diagnostic à un stade tardif pour 80% des cas des cancers épithéliaux en l'absence de dépistage précoce, et compte tenu de l'anatomie des ovaires et de l'absence de signes cliniques évocateurs lors des phases initiales de la maladie.

L'âge de survenue du cancer de l'ovaire varie largement entre les types différents. L'âge



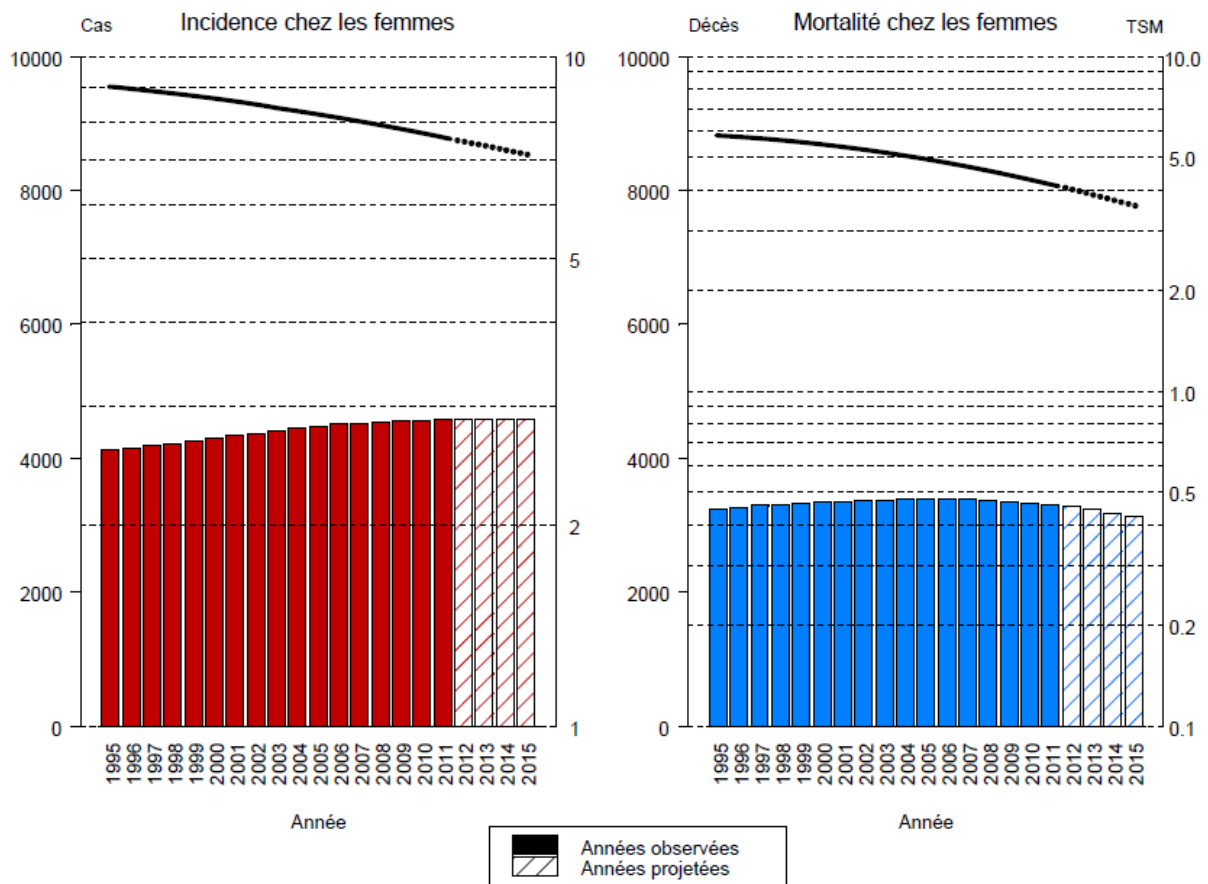
**Figure 2 : Schéma représentant la coupe transversale d'un ovaire.**

L'ovaire est entouré d'une couche mince : la capsule. Il est constitué de deux zones : la zone corticale (ou périphérique) contient le **stroma** et les **cellules germinales** qui vont libérer les ovules à maturation dans la trompe de Fallope ; la zone médullaire (ou centrale), contenant les vaisseaux sanguins, est quant à elle le siège de l'**activité hormonale** de l'ovaire (production d'œstrogènes et de progestérone). Illustration d'après : <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-l-ovaire/Les-ovaires>

médian est de 66 ans avec un pic d'incidence entre 50 et 75 ans pour le cancer épithélial et de 64 ans pour le cancer stromal et celui des cordons sexuels tandis que le cancer des cellules germinales touche souvent des femmes beaucoup plus jeunes, avec un âge médian à 25 ans (6).

Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés et comprennent des facteurs de risque épidémiologiques liés à la vie reproductive tel que la nulliparité, l'infertilité, une puberté précoce et/ou une ménopause tardive (9), et des facteurs de risque environnementaux tels que le traitement hormonal substitutif après la ménopause, le surpoids et l'endométriose (10). Cependant, tous ces facteurs de risque n'ont qu'un faible impact sur l'augmentation du risque individuel de survenue du cancer ou l'incidence au niveau de la population. La prédisposition génétique constitue un facteur de risque beaucoup plus significatif (11). Environ 17% des cancers de l'ovaire surviennent suite à la mutation d'un gène de susceptibilité entraînant un risque de cancer de l'ovaire supérieur à 5%. Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont concernées pour la plupart des cas. Les protéines codées par ces gènes jouent un rôle essentiel dans la réparation des ADN double-brin par le système de recombinaison homologue (12). Le risque de développer un cancer de l'ovaire au cours de la vie pour une femme porteuse d'une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* sont respectivement environ 40% et 20%, avec un âge moyen de survenue du cancer de 50 et 57 ans,

respectivement. (12,13). Les autres gènes tels que les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2) prédisposant à la survenue du cancer colorectal héréditaire sans polyposes (syndrome de Lynch) sont aussi impliqués dans le développement d'un cancer de l'ovaire (Tableau 1). Le carcinome ovarien constitue ainsi une pathologie très hétérogène. Il est catégorisé différemment par trois systèmes de classification: clinique, histologique et moléculaire. Ces critères ont pour but d'établir le diagnostic et aussi d'élaborer les stratégies thérapeutiques adaptées.



**Figure 3 : Evolution du nombre de cas et de décès (histogramme) et des taux standardisés monde correspondants (TSM) (courbe, échelle logarithmique) de cancers de l'ovaire de 1995 à 2015 en France.** Toutes les estimations sont issues d'une modélisation des données d'incidence observées sur la zone registre et des données de mortalité observées sur la France métropolitaine jusqu'en 2011. Les périodes d'observation et de projection sont distinguées dans ce graphique. D'après : Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015. **Institut de veille sanitaire; 2015.**

**Tableau 1: Les gènes de susceptibilité au cancer de l'ovaire.**

Gène	Prévalence chez les femmes de cancer de l'ovaire	Risque de développer un cancer de l'ovaire au cours de la vie	Age moyen de la survenue d'un cancer de l'ovaire
BRCA1	8.0%	40%	50
BRCA2	5.0%	20%	57
MSH2, MLH1, MSH6, PMS2	0.8%	8%	47
RAD51C	1.0%	9%	60
RAD51D	0.6%	10%	55
PPM1D	1.5%	25%	68

D'après: Sopika V, Rosenb B et al. Gynecol Oncol, 2015

### 3. Classifications des cancers de l'ovaire

Le carcinome ovarien constitue une pathologie très hétérogène. Il est catégorisé différemment par trois systèmes de classification: clinique, histologique et moléculaire. Ces critères ont pour but d'établir d'un diagnostic et aussi d'une stratégie thérapeutique.

#### 3.1 Classification clinique des tumeurs selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) 2014

Le stade de cancer correspond au degré d'extension de la maladie dans l'organisme. C'est un élément essentiel pour déterminer la prise en charge la plus appropriée pour les patients. Quand la tumeur est localisée dans l'organe d'origine, on parle de cancer précoce, tandis que quand la maladie s'étend à plusieurs organes, on parle de cancer avancé. Pour le cancer de l'ovaire, le stade prend en compte trois critères principaux : la localisation précise de la tumeur et son étendue ; l'atteinte ou non des organes voisins, du péritoine et des ganglions lymphatiques du bassin (métastase régionale) et la taille de ces métastases et la présence ou non de métastase dans d'autres parties du corps (métastase à distance). Selon ces critères, la Fédération Internationale de Gynécologie et de l'Obstétrique (FIGO) catégorise le cancer de l'ovaire en quatre stades numérotés de I à IV et décomposés en plusieurs sous-parties (A, B, C) qui apportent des précisions de l'étendue du cancer (14) (Tableau 2). Les stades I sont considérés comme des cancers précoces tandis que les stades II, III et IV comme avancés (15). Seulement 15% de patientes sont diagnostiquées quand le cancer est confiné aux ovaires (stade I) alors que 70% patientes ont une maladie hors de la cavité pelvienne au moment du diagnostic (stade III et IV) (16).

**Tableau 2 : Stadification des cancers de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO).**

Stades FIGO	Définition
Stade I	Tumeur limitée aux ovaires (un ou les 2)
I A	tumeur limitée à un seul ovaire ; capsule intacte, sans tumeur à la surface de l'ovaire ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
I B	tumeur limitée aux deux ovaires ; capsules intactes, sans tumeur à la surface de l'ovaire ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
I C*	tumeur limitée à 1 ou aux 2 ovaires, avec soit rupture capsulaire, soit tumeur à la surface des ovaires, soit cellules malignes présentes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal.
Stade II	Tumeur intéressant 1 ou les 2 ovaires avec extension pelvienne
II A	extension et/ou greffes utérines et/ou tubaires ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou le liquide de lavage péritonéal
II B	extension à d'autres organes pelviens ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou le liquide de lavage péritonéal
Stade III	Tumeur de l'ovaire avec extension péritonéale abdominale et/ou ganglionnaire rétropéritonéale
III A**	métastases rétropéritonéales ± péritoine
III B	métastases péritonéales extra-pelviennes ≤ 2 cm ± adénopathies
III C	métastases péritonéales extra-pelviennes >2 cm ± adénopathies
Stade IV	Métastases à distance (à l'exclusion des métastases péritonéales)
IV A	métastase à la plèvre (cytologie positive)
IV B	autres métastases y compris adénopathies inguinales

\* : stade IC –IC1 : rupture peropératoire

-IC2 : rupture préopératoire ou végétations en surface

-IC3 cellules malignes dans l'ascite ou le liquide de lavage péritonéal.

\*\* : stade IIIA -IIIA1 : adénopathie rétropéritonéal seul (prouvé par cytologie/histologie)

IIIA1(i) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie ≤ 10 mm

IIIA1(ii) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie >10 mm.

-IIIA2 : extension péritonéale ± adénopathies.

D'après : Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. Arch Gynecol Obstet, 2014

### 3.2 Classification histologique de l'OMS 2014

Parmi les trois types principaux de cancer de l'ovaire qui se développent à partir des trois types de cellules différentes (cellules épithéliales, cellules germinales et cellules stromales et des cordons sexuels), le cancer de l'ovaire épithélial (carcinome) est le type le plus largement répandu et figure parmi les plus létaux de toutes les tumeurs malignes. C'est le type de cancer qu'on appelle communément « cancer de l'ovaire » qui est en fait un groupe de tumeurs très hétérogène que ce soit au niveau de ses manifestations cliniques, de ses aspects architecturaux microscopiques ou encore des types cellulaires identifiables. En 2014, suite aux nouvelles connaissances de la pathogénèse de l'ovaire, une nouvelle classification des tumeurs ovariennes a été publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui reconnaît six sous-types histologiques principaux (17,18). Les fréquences relatives des différents sous-types varient quelque peu entre les différentes études, et le carcinome séreux est toujours le sous-type le plus fréquent (68-71%), suivi par le carcinome à cellules claires (12-13%), le carcinome endométriöide (9-11%), et le carcinome mucineux (3%). Les tumeurs de Brenner malignes et le carcinome indifférencié sont les deux sous-types les plus rares (3-8%) (19). Les trois premiers sous-types histologiques principaux surviennent à une fréquence quasiment identique pour les stades précoces tandis que pour les stades avancés, presque 90% sont de types séreux (19) (Tableau 3).

**Tableau 3 : Fréquences relatives des différents sous-types de carcinomes ovariens**

Types histologique	Stades I-II	Stades III-IV	Tous stades confondus
Carcinomes séreux	36%	88%	68-71%
Carcinomes à cellules claires	26%	5%	12-13%
Carcinomes endométriöide	27%	3%	9-11%
Carcinomes mucineux	8%	1%	3%
Autres types	13%	3%	7%

D'après : Köbel M, Int J Gynecol Pathol. 2010

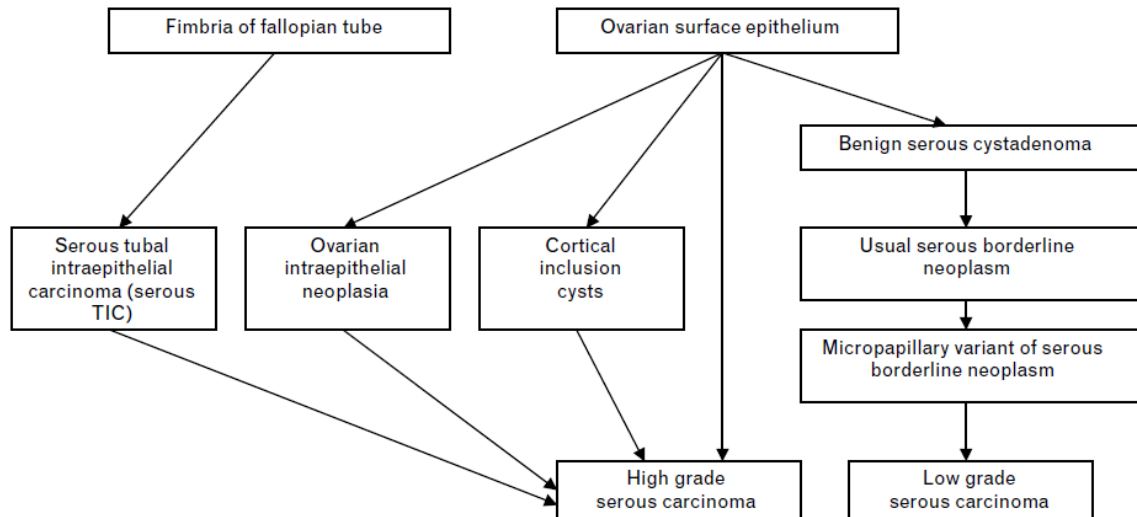


### 3.2.1 Les carcinomes séreux

Ils représentent les formes les plus fréquentes de carcinomes épithéliaux de l'ovaire et sont subdivisés en deux sous-types : les carcinomes séreux de bas-grade (CSBG) et les carcinomes séreux de haut-grade (CSHG). Ce sont deux types de tumeurs distincts en terme de pathogénèse et de caractéristiques clinico-pathologiques, mais pas deux grades différents d'un même néoplasme (20,21).

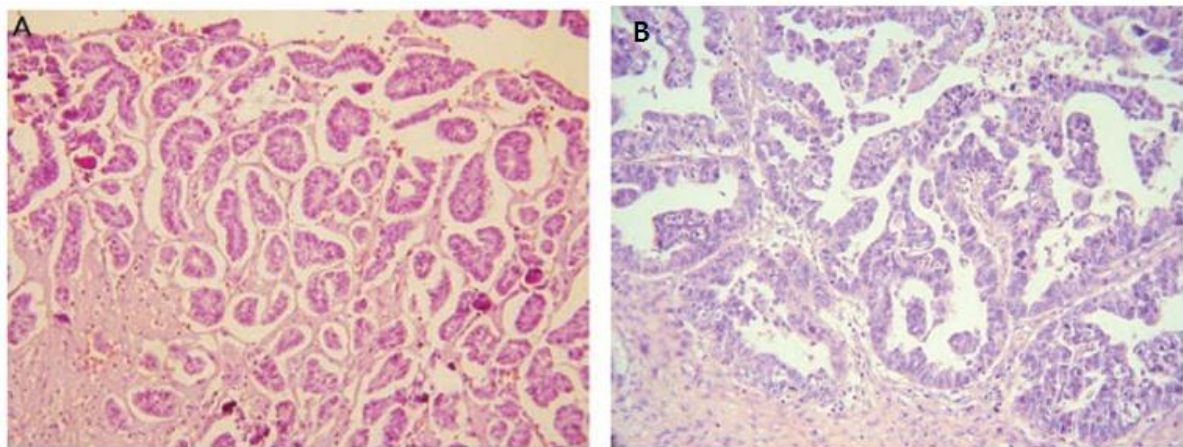
#### 3.2.1.1 Les carcinomes séreux de bas-grade (CSBG)

Ils représentent 6-10% de tous les carcinomes séreux (22) qui touchent les femmes plus jeunes que le carcinome séreux de haut-grade (CSHG) avec un âge médian au diagnostic de 55 ans (22). Progressant d'une manière indolente et moins rapide, environ un tiers des carcinomes sont diagnostiqués au stade I (22). Malgré une réponse moindre à la chimiothérapie à base de sels de platine, la survie globale est meilleure que dans les CSHG (22). On considère généralement que ce type de carcinome se développe à partir de lésions bénignes comme les adénomes séreux bénins qui se transforment en tumeur séreuse *borderline* puis en maladie maligne. Ces constatations sont basées sur des observations de ressemblances morphologiques (20,23,24) et cliniques lorsque 75 à 80% des récives de tumeurs séreuses *borderline* sont retrouvées avec le type CSBG (25) (Figure 4). Dans certains cas, les CSHG peuvent coexister avec les CSBG ou bien très rarement, les CSBG peuvent aussi se transformer en CSHG (26). La morphologie des CSBG est caractérisée par des noyaux uniformes avec une indice d'atypie nucléaire légère à modérée dans la zone tumorale, et moins de 12 mitoses sur 10 champs aux plus forts grossissements, la présence de nécrose ou de cellules multinucléées est rarement constatée (20,21) (Figure 5). Les motifs architecturaux trouvés dans les CSBG sont souvent papillaires mais peuvent aussi être glandulaires (27). Dans la plupart des cas, les CSBG ont un niveau d'expression des récepteurs aux estrogènes et/ou à la progestérone plus élevé que les CSHG mais légèrement plus bas que celui des tumeurs séreuses *borderline* (28). Au niveau moléculaire, les recherches biologiques ont montré que la voie de signalisation des « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK) joue probablement un rôle important dans la pathogénèse de cette malignité puisque 68% des CSBG sont porteuses d'une mutation des gènes *BRAF* ou *KRAS* (33% et 35%, respectivement), ce qui n'est pas retrouvé dans les CSHG (29). D'autres études trouvent que les mutations du gène *KRAS* sont beaucoup plus fréquentes que celles du gène *BRAF* et qu'une mutation courante de *BRAF* (*BRAF* V600E) est plus fréquemment retrouvée dans les tumeurs séreuses *borderline* ou les CSBG de stade précoce (30–32). Des mutations du gène *NRAS*, appartenant à la même famille que *KRAS*, n'est retrouvée que dans 15% des CSBG (31).



**Figure 4 : Hypothèse d'origine pathogénique des carcinomes ovariens.**

D'après : MCCLUGGAGE W. G., Pathology, 2011



**Figure 5 : Sections tumorales de carcinomes séreux de bas-grade (A) et de haut-grade (B) en coloration hématoxyline éosine.** Le carcinome séreux de bas-grade (A) présente une architecture papillaire avec des crevasses entourant les groupes de cellules tumorales ; le carcinome séreux de haut-grade (B) présente des espaces en forme de fentes ainsi qu'une activité mitotique intense. D'après : McCluggage W. G., Pathology, 2011

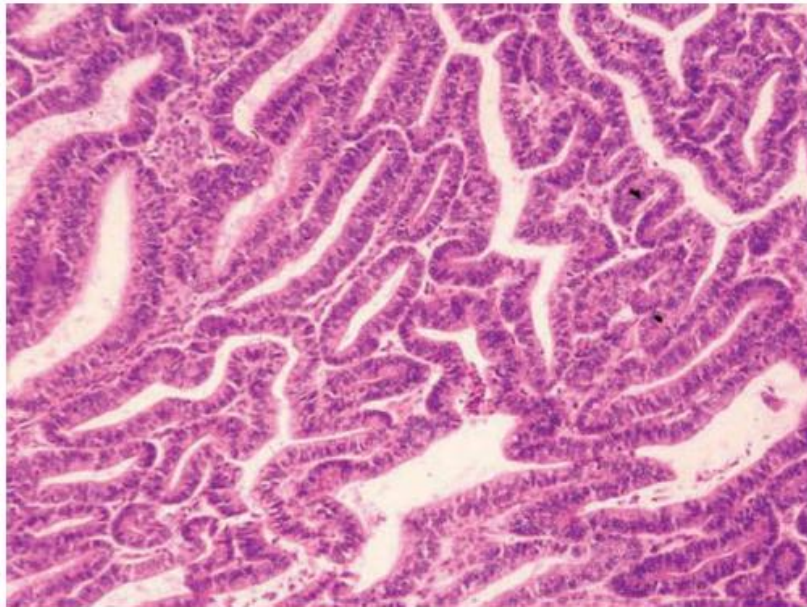
### 3.2.1.2 Les carcinomes séreux de haut-grade (CSHG)

Représentant presque 90% des carcinomes séreux, les CSHG touchent des femmes plus âgées avec un âge médian au diagnostic de 63 ans (22). Progressant d'une manière agressive et rapide, la plupart des CSHG sont diagnostiqués à un stade avancé tandis que, dans seulement 9% des cas, la maladie est confinée aux ovaires au moment du diagnostic (22). Dans la théorie classique, les CSHG se développent directement à partir de la surface de l'épithélium ou de kystes d'inclusion corticale, *de novo*, généralement sans lésions

précurseurs précises quoi-que, dans certains cas, une forme intermédiaire dite « néoplasie intra-épithéliale ovarienne » se présente (27). Très rarement, les CSHG surviennent directement à la suite de tumeurs séreuses borderline de prolifération atypique (26) (Figure 4). Cependant, de plus en plus d'études trouvent que la majorité des CSHG se développent en effet à partir de la surface épithéliale du fimbria des trompes de Fallope, généralement à partir des lésions dites « carcinome séreux tubaire intra-épithélial », et s'étend secondairement aux ovaires (33–38) (Figure 4). En tenant compte de l'hypothèse que les CSHG de l'ovaire sont une forme de manifestation d'une malignité de la même origine au niveau de la partie distale des trompes de Fallope, il est suggéré que l'appellation de « carcinome séreux de haut-grade pelvien » qui regroupe l'ensemble des CSHG de l'ovaire, des trompes de Fallope et du péritoine serait une dénomination plus appropriée (27). La morphologie des CSHG est caractérisée par une atypie nucléaire d'intensité forte, souvent associée à une nécrose et multinucléée (20,21) (Figure 5). Les caractéristiques moléculaires des CSHG sont marquées par la présence de mutations de TP53 ou une dysfonction de P53 apparaissant précocement dans la pathogénèse de la maladie et par conséquent retrouvés dans presque tous les CSHG (39,40). Par ailleurs, environ 50% des CSHG présentent une anomalie de la voie de réparation des cassures double-brin d'ADN par recombinaison homologue ( *Homologous Recombination, HR*), représentée principalement par des altérations génétiques ou épi-génétiques, germinales ou somatiques, des gènes *BRCA 1* et *2* (13,40,41). D'autres anomalies moléculaires comme celles impliquées dans le syndrome de Lynch ou encore touchant les voies de signalisation MAPK ou PI3K présentent d'une fréquence beaucoup moins forte mais ont une signification potentielle importante (11,40,42).

### 3.2.2 Les carcinomes endométrioides

Représentant à peu près 10% de tous les carcinomes ovariens, les carcinomes endométrioides sont souvent diagnostiqués à un stade I, et de bas-grade. Ils surviennent souvent, voire tout le temps, à la suite de lésions de type endométriose (surtout des kystes endométriosiques) ou d'adénofibrome *borderline*, souvent associés à des lésions précancéreuses ou cancéreuses de l'endomètre (19,43–45). Des travaux récents montrent que la majorité des diagnostics anciens de carcinomes endométrioides de haut-grade sont en fait de type séreux (19), expliquant ainsi leur baisse de fréquence relative (46). La morphologie des carcinomes endométrioides de bas grade est marquée par les architectures glandulaires accolées dos à dos sans interposition de stroma, dans la plupart des cas, associées avec des zones adénofibromateuses. La présence d'éléments squameux et d'endométriose aide à orienter le diagnostic vers les carcinomes endométrioides de bas grade (44) (Figure 6). Ce type de carcinomes exprime souvent les récepteurs aux estrogènes, rarement des anomalies de P53, et classiquement des anomalies moléculaires des voies de signalisation MAPK ou PI3K notamment des mutations des gènes *KRAS* et *PIK3CA*, ou encore des dysfonctions de PTEN, ou une instabilité des microsatellites dans le contexte de syndrome de Lynch (42).

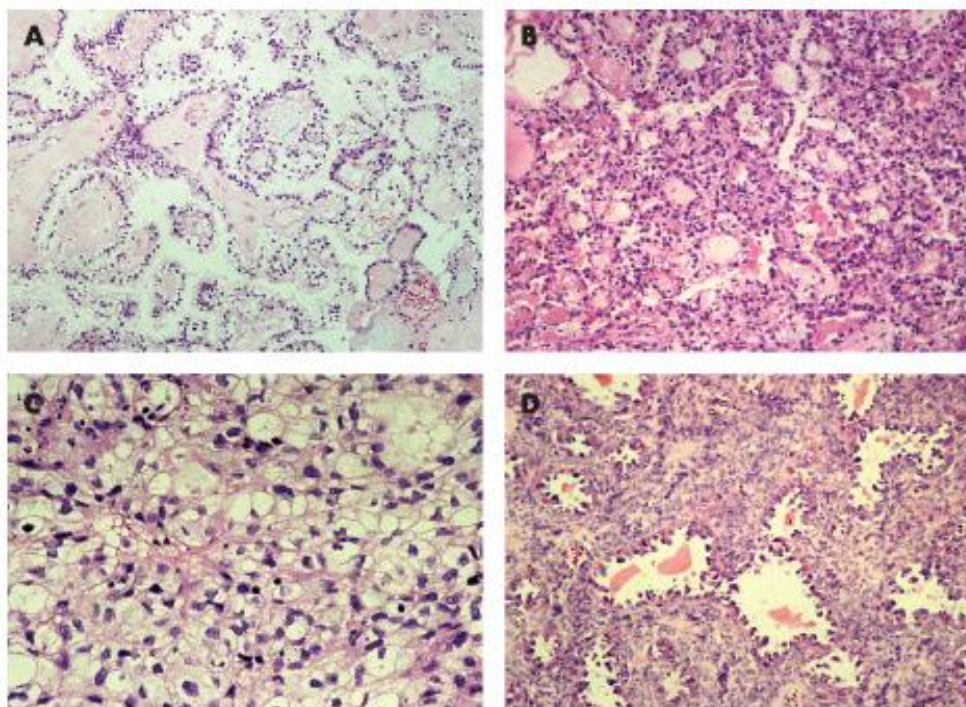


**Figure 6 : section tumorale des carcinomes endométrioides de bas-grade en présence des glandules accolées dos à dos en coloration hématoxyline éosine. D'après : McCluggage W.G., Pathology, 2011**

### 3.2.3 Carcinomes à cellules claires

Avec une fréquence relative similaire à celle des carcinomes endométrioides dans la population globale et une fréquence beaucoup plus importante chez les femmes asiatiques, les carcinomes à cellules claires touchent les femmes relativement plus jeunes, avec un âge médian à 55 ans au diagnostic, souvent à un stade précoce (stade I et II). Ils surviennent à la suite d'endométrioses dans la majorité des cas (19,47). Composé de cellules avec un cytoplasme abondant et clair et d'une membrane cellulaire proéminente, la morphologie typique ce type de carcinomes est marquée par un mélange d'architectures de forme tubulokystique, glandulaire, solide et papillaire, généralement bien différenciées avec une mitose rarement active, par fois associée à la présence des cellules clautées (48,49) (Figure 7). Le système de grade classique pour les autres types de carcinomes ovariens ne permettant pas de montrer une différence de pronostic entre les différents grades, les pathologistes recommandent de classer tous les carcinomes à cellules claires comme des carcinomes de haut-grade (50,51). Ils expriment rarement les récepteurs aux estrogènes, ni ne présentent d'anomalie de P53 (27). Par contre, ils présentent assez fréquemment des mutations du gène *ARID1A* et des anomalies de la voie PI3K tel que la mutation du gène *PIK3CA* ou la perte d'expression de PTEN (52–54).



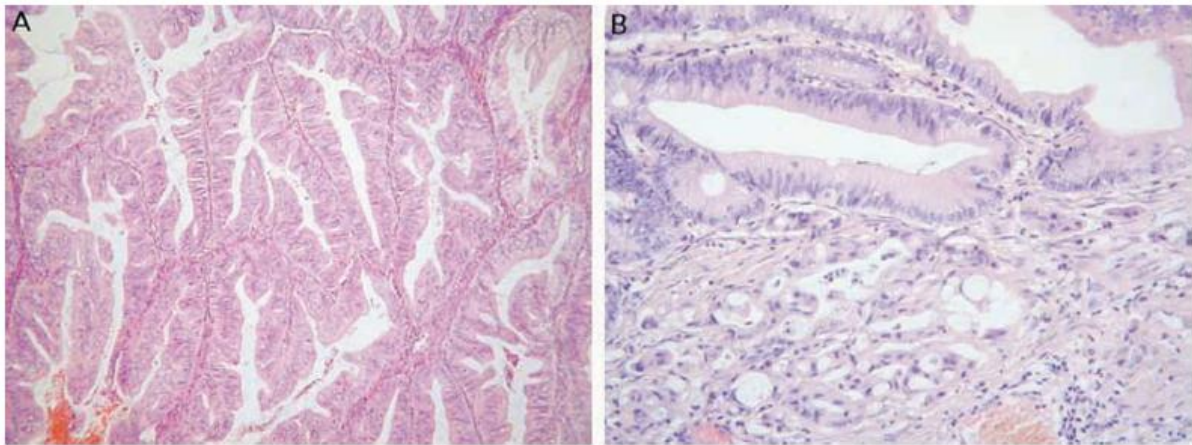


**Figure 7 : section tumorale des carcinomes à cellules claires avec les architectures papillaire (A), tubulokystique (B) et solide (C) et présence des cellules cloutées (D).**

D'après : McCluggage WG, J Clin Pathol, 2008

#### 3.2.4 Carcinomes mucineux

Les carcinomes mucineux représentent actuellement 3% des tous les carcinomes ovariens (19). Cette fréquence relative a bien baissée par rapport aux anciennes études épidémiologiques suite à l'amélioration de la distinction entre les tumeurs primaires et secondaires métastatiques. Par exemple, il a été trouvé que certains carcinomes mucineux de stade avancé étaient en fait des métastases ovariennes de tumeurs d'autres organes ou encore que certains carcinomes mucineux associés à un pseudomyxome péritonéal étaient en fait d'origine appendiculaire dans presque tous les cas (55). La présence des composants de tumeurs *borderline* et d'autres pathologies bénignes de l'ovaire orientent le diagnostic vers une tumeur primaire plutôt que vers une localisation métastatique secondaire (56). La majorité des carcinomes mucineux primaires sont diagnostiqués à un stade précoce et de bas grade chez des patientes relativement plus jeunes que les carcinomes séreux (55,57). La morphologie microscopique des carcinomes mucineux est marquée par leur ressemblance cellulaire aux cellules intestinales ou müllériennes, ce qui permet de les diviser en deux sous-types: intestinal et endocervical. Le premier sous-type est beaucoup plus fréquent que le second, et des invasions stromales expansibles ou infiltrantes coexistent souvent (58) (Figure 8).



**Figure 8 : section tumorale des carcinomes mucineux de type intestinal avec invasion stromale de façon expansive (A) et de façon expansive (en haut) et infiltrante (en bas) (B).** D'après : McCluggage WG, Pathology, 2011

Des études montrent que les carcinomes mucineux de type intestinal se développent probablement à la suite de tumeurs *borderline* transformées à partir d'un adénome bénin. Bien que les trois composants puissent être présents dans une même tumeur, une pathogénèse similaire à celle des carcinomes séreux de bas grade est observée, alors que les carcinomes mucineux de type endocervical sont très souvent associés à une endométriose (58). Les anomalies moléculaires des carcinomes mucineux sont marquées par les mutations du gène *KRAS* trouvée dans une moitié des cas, souvent de stade I, et dans tous les composants (bénin, *borderline* et malin) d'une même tumeur (59,60). Cette caractéristique est similaire aux carcinomes séreux de bas grade, cependant la mutation du gène *BRAF* est très rare (59).

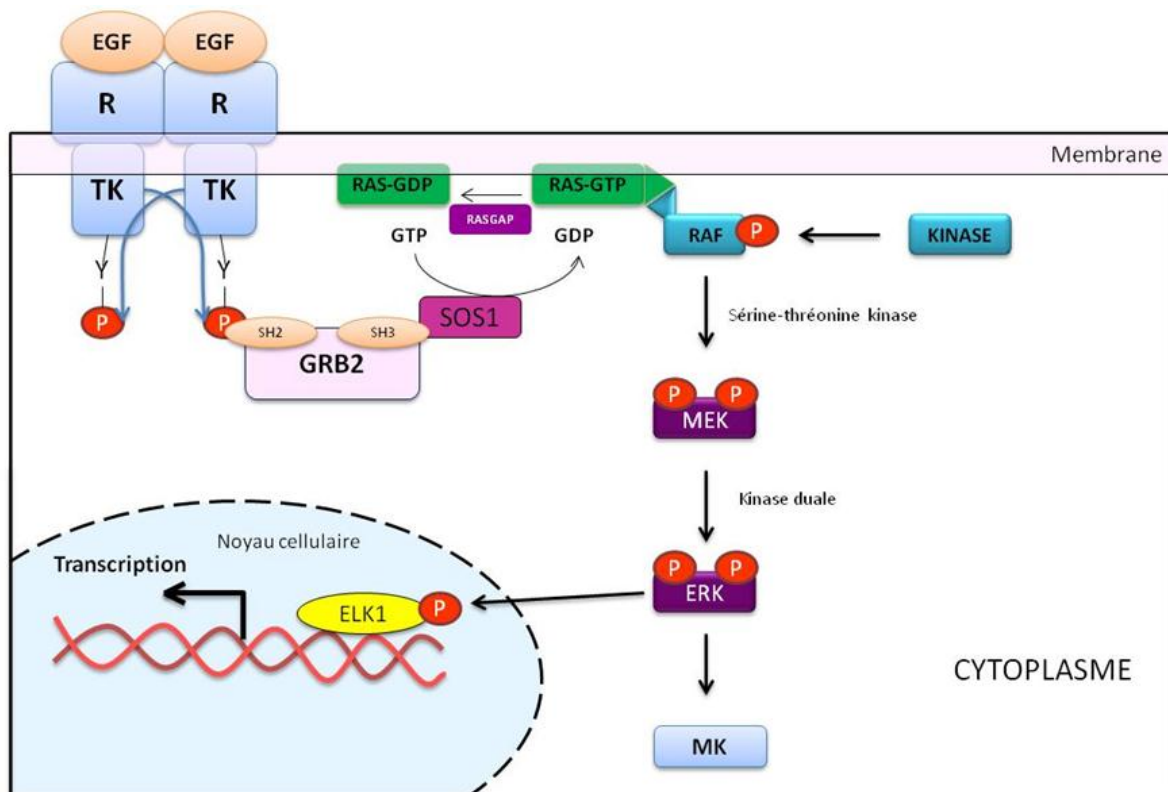
### 3.3 Classification basée sur la pathogénèse-moléculaire

Les connaissances concernant la pathogénèse des cancers notamment celles des carcinomes ovariens ont évoluées ces dernières années. Tous les cancers présentent des mutations somatiques. Certaines de ces mutations, nommées mutations « *driver* », confèrent un avantage sélectif à la croissance cellulaire et sont impliquées dans le développement du cancer (61). Parmi des gènes mutés codant des protéines impliquées dans des voies de signalisation intracellulaire, on distingue les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Pour les carcinomes ovariens, certaines anomalies moléculaires touchent des voies de signalisation telles que la voie de la PI3 kinase ou la voie des MAP kinases (62,63). D'autres anomalies moléculaires touchent plus souvent des processus de la réparation d'ADN ou de l'apoptose parmi lesquelles celle touchant TP53, jouent un rôle essentiel (64). L'étude de ces anomalies moléculaires permet la compréhension de la pathogénèse des carcinomes ovariens, et peut aider au développement de nouvelles thérapies ciblées.

#### 3.3.1 Les mutations activatrices des voies de signalisation

### 3.3.3.1 Les mutations des gènes *KRAS* et *NRAS*

La protéine RAS est l'un des éléments essentiels de la voie de signalisation des MAPK (65) (Figure 9). Les protéines RAS, codées par les gènes *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) situé sur le chromosome 12 et *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) situé sur le chromosome 1, sont impliquées dans l'oncogenèse du cancer de l'ovaire (66). La protéine RAS varie entre une forme active, fixée au GTP (RAS-GTP) et une forme inactive fixée au GDP (RAS-GDP). L'hydrolyse du GTP provoque donc la fin de la transmission du signal et la régulation de la voie de signalisation. Cette hydrolyse est réalisée grâce à l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine RAS, potentialisée par son interaction avec une protéine GAP (GTPase-activating proteins) (Figure 9). Les mutations faux-sens des exons 2, 3 et 4 des gènes *KRAS* et *NRAS*, modifiant la structure de la protéine RAS, perturbent par exemple l'interaction entre RAS et GAP, entraînent une accumulation de la protéine sous sa forme active RAS-GTP et confèrent un ordre de prolifération cellulaire continu par activation constitutive des molécules en aval de la voie de signalisation (66).



**Figure 9 : La voie de signalisation des MAP kinases.** Sous sa forme la plus classique, la voie des MAP kinases est activée par l'intermédiaire de la liaison du facteur de croissance épidermique (EGF) à un récepteur à activité Tyrosine Kinase (RTK). Le RTK activé recrute alors une protéine GRB2 dont le domaine SH2 va être reconnu par un facteur d'échange GDP-GTP (protéine SOS1) pour la protéine RAS. Cette dernière va alors être activée sous sa forme RAS-GTP et pourra recruter à la membrane la kinase RAF, activée elle-même par une ou plusieurs phosphorylations. RAF phosphoryle et active une protéine MEK, qui fait de même sur la protéine ERK, qui elle-même active un facteur de transcription tel que ELK1 ou une autre kinase. Cela aboutit à la prolifération de la cellule. Il est à noter que RAS-GTP est désactivé par son activité GTPasique propre, stimulée par la protéine RASGAP. D'après : ROBERT, J. Signalisation et cancer, Springer-Verlag Paris. 2010

### 3.3.3.2 Les mutations du gène *BRAF*

La protéine RAF, qui se présente sous trois isoformes (ARAF, BRAF et CRAF), est également présente au sein de la voie des MAPK, en aval de la protéine RAS (Figure 9). Les anomalies de la protéine BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), codée par le gène du même nom, ont été retrouvées fréquemment dans les carcinomes ovariens, notamment les carcinomes séreux de bas grade (29,67). Les mutations faux-sens ponctuelles de ce gène, situées principalement dans l'exon 15 du gène, particulièrement celle de c.1799 T>A (p.V600E), résultant en la substitution d'une valine par un acide glutamique au niveau de la protéine, touchent le domaine kinase, entraînent une activation constitutive de la voie de signalisation des MAPK et engendrent une dérégulation de la voie de prolifération cellulaire (67).

### 3.3.3.3 Les mutations du gène *PIK3CA*

La PI3 kinase (PI3K), composée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110) (Figure 10), est une enzyme catalysant la transformation du PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-diphosphate*) en PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*), entraînant alors l'activation de la voie de signalisation PI3/AKT/mTOR qui contrôle à la fois la croissance et la survie cellulaires (65). Les anomalies du gène *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), codant la sous-unité catalytique p110 de cette enzyme, sont impliquées dans l'oncogenèse de nombreux cancers, y compris des carcinomes ovarien, notamment les types endométrioïdes et à cellules claires de stade avancé (68,69,42,53). Une amplification de ce gène survient en effet dans 10 à 36% des cancers ovariens tandis que des mutations activatrices du gène sont présentes dans 2 à 12% des cas (69,70). Les principales mutations activatrices du gène *PIK3CA* sont situées sur les codons 542, 545 et 1047 (exons 10 et 21) du gène (69,71).

### 3.3.3.4 Les altérations du gène *MET*

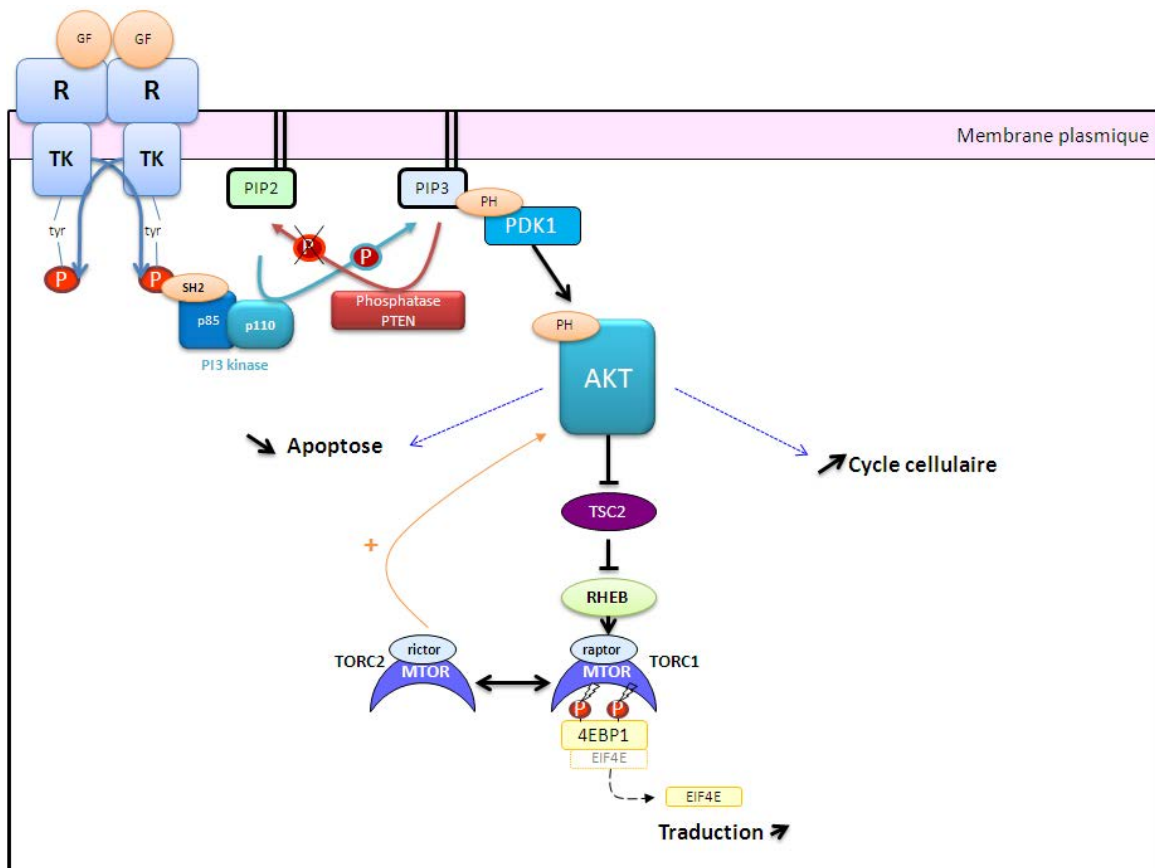
Le gène *MET* code la protéine MET, récepteur transmembranaire à tyrosine kinase (RTK) activé par le facteur de croissance HGF (*Hepatocyte Growth Factor*). La mutation ou l'amplification du gène *MET* se traduit par l'expression d'une protéine pathologiquement active qui entraîne la prolifération, la survie et l'invasion cellulaires, et stimule l'angiogenèse (72,73). L'effet pathogène déclenché par l'activation de ce récepteur se produit via le recrutement de molécule adaptatrice intégrée en aval dans plusieurs voies de signalisation telles que les voies MAPK et PI3K en aval qui favorisent la propagation des cellules tumorales (74). Les mutations de *MET* ont été décrites dans les carcinomes ovariens de stade avancé, notamment des carcinomes séreux de haut-grade (75).

## 3.3.2 Les mutations engendrant une perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs

### 3.3.2.1 Les altérations du gène *TP53*



Le gène *TP53* est situé sur le bras court du chromosome 17. La protéine P53, codée par le gène *TP53*, est un facteur de transcription activée dans des cellules endommagées, se fixant de manière spécifique sur les régions régulatrices de certains gènes dont elle contrôle l'expression, pour réguler la réparation cellulaire, ou induire l'apoptose des cellules en cas d'échec de la réparation cellulaire (76). Les mutations et perte d'hétérozygotie du gène *TP53*, se traduisent par la surexpression d'une forme mutée de la protéine P53 dans la majorité des cas, ou par la répression d'une forme tronquée de la protéine P53.



**Figure 10 : Schéma récapitulatif de la voie PI3 kinase après activation par un récepteur à activité tyrosine kinase.** Dans cette voie, l'activation d'un RTK par un facteur de croissance entraîne un recrutement de la PI3 kinase (PI3K) qui va se lier au récepteur via sa sous-unité régulatrice p85. La sous-unité catalytique de la PI3K, p110, réalise alors une phosphorylation du PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-diphosphate*) membranaire en PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*). La phosphatase PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) quant à elle est capable d'effectuer l'action inverse. Le phosphate en position 3 du PIP3 est alors reconnu par des sérines/thréonines kinases (PDK1 et AKT), la première phosphorylant la seconde. La protéine AKT active est alors capable de phosphoryler un grand nombre d'autres protéines, qui sont alors activées ou inhibées. En particulier, l'inhibition de TSC2 va entraîner un maintien de la protéine Rheb sous sa forme active, qui va stimuler la protéine mTOR. Cette dernière, au sein de différents complexes, va phosphoryler d'autres protéines mais aussi renforcer l'action d'AKT par un feed-back positif. Les cibles d'AKT et de mTOR ont toutes un effet positif sur la survie, la croissance et la prolifération cellulaire. D'après : ROBERT, J. Signalisation et cancer, Springer-Verlag Paris. 2010

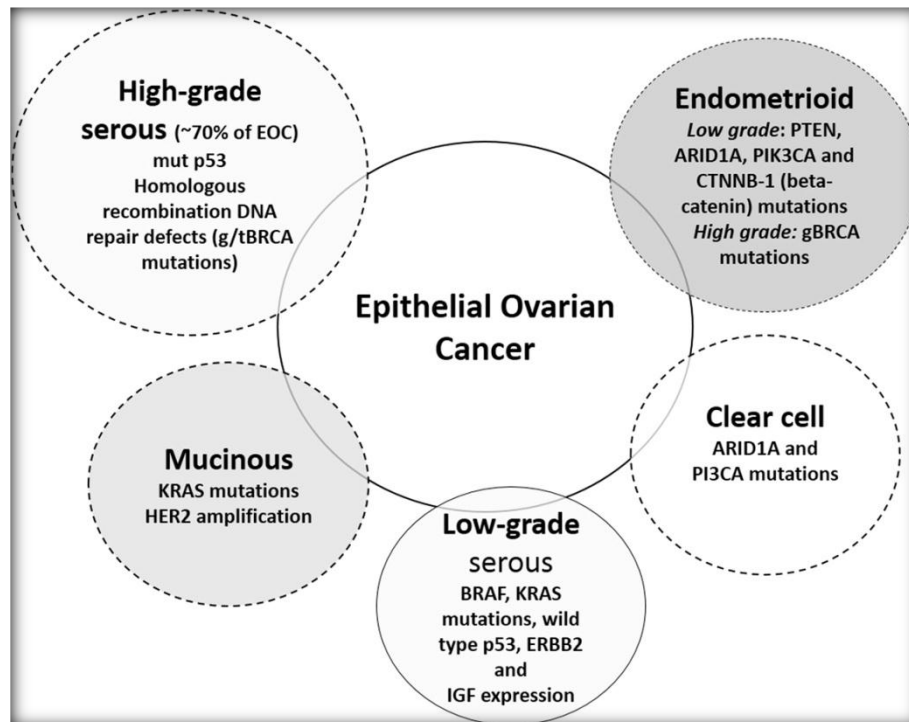
Ces anomalies aboutissent à la perte des fonctions importantes de la protéine P53 sauvage comme le contrôle de la survie, de la prolifération et du potentiel métastatique des cellules tumorales. Ces anomalies sont décrites dans la grande majorité des cancers, et sont fréquemment rencontrées dans les carcinomes ovariens notamment des stades avancés et de séreux de haut-grade (77,78,40).

### 3.3.3.2 Les altérations du gène *PTEN*

Jouant un rôle antagoniste de PI3K par catalyser la transformation du PIP3 en PIP2, la phosphatase PTEN est un élément régulateur majeur de la voie de signalisation de PI3K (65) (Figure 10). Produit du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (*Phosphatase and TENSin homolog*), la diminution ou la perte d'expression, provoquée notamment par des mutations invalidantes ou par la méthylation du promoteur, est un évènement commun et important dans la progression des carcinomes ovariens, y compris des carcinomes séreux de haut-grade (79,80).

Basés sur la classification anatomo-pathologique et complétée par les caractéristiques moléculaires, une nouvelle classification, dite « pathogénétique-moléculaire », a été proposée récemment. Elle catégorise les carcinomes ovariens en deux groupes principaux : les carcinomes de type I et de types II (81–84) (Figure 11). Les carcinomes de type I regroupent les carcinomes séreux de bas-grade, les carcinomes endométrioides de bas grade, les carcinomes à cellules claires, les carcinomes mucineux et les tumeurs de Brenner malignes. Ils sont considérés comme résultant d'un processus oncogénique continu, d'une croissance lente et indolente, à partir des lésions précurseurs bénignes telles que l'endométrieose ou l'adénome qui se transforment en tumeurs *borderline* puis en carcinomes invasifs. Ce type de carcinomes, qui compte à peu près un quart des tous les carcinomes ovariens, sont diagnostiqués principalement à un stade précoce et associés très souvent avec des évènements moléculaires de fréquences variées, notamment les mutations de *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* ou *PTEN* (82,1,85). Les carcinomes de type II représentent majoritairement les carcinomes séreux de haut-grade et rarement des carcinomes indifférenciés. Ils surviennent généralement *de novo* et sans lésions précurseurs précises, et évoluent très rapidement avec un diagnostic très tardif et constituent un groupe de malignité très agressive. Ils sont souvent associés aux mutations du gène TP53 (85). Les mutations de la voie de signalisation MAPK sont beaucoup moins fréquentes dans les carcinomes séreux de haut grade (type II) que dans ceux de bas grade (type I) (86) et sont peut-être un élément important dans la transformation des carcinomes séreux de bas-grade à haut grade (26).

Cette classification, distinguant les tumeurs des types I des types II, est une première étape à la compréhension de l'hétérogénéité des carcinomes ovariens. Ces nouvelles connaissances apportent également de nouvelles perspectives à l'utilisation de thérapies personnalisées, offrant potentiellement aux malades un meilleur pronostic dans les années à venir.



**Figure 11 : Sous-types histologiques et moléculaires des carcinomes ovariens.**

D'après : Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. Eur J Cancer. 2016

#### 4. Stratégies thérapeutiques

##### 4.1 Traitement standard

Malgré l'évolution des connaissances sur la pathogenèse des carcinomes ovariens au cours des dernières années, les principes de prise en charge des patientes atteintes de carcinomes primaires varient très peu entre les sous-types. L'association de la chirurgie couplée par la chimiothérapie à base de sels de platine est toujours le traitement standard (1). Elle est complétée éventuellement par une thérapie ciblée chez certaines patientes.

##### 4.1.1 La chirurgie

Une chirurgie de la tumeur a pour but d'établir un diagnostic histo-pathologique et le stade clinique d'une part, et d'aboutir à une résection tumorale la plus complète possible d'autre part. Quand la maladie est localisée et qu'une résection complète peut être obtenue d'emblée, une chirurgie est envisagée en première intention. L'intervention standard comprend une hystérectomie totale avec une annexectomie bilatérale, une omentectomie infra-gastrique, une appendicectomie, un curage ganglionnaire pelvien bilatéral et lombéo-aortique infra-rénal. Une cytologie péritonéale et des biopsies péritonéales sont aussi réalisées (1). Quand la maladie a évolué à un stade avancé et qu'il paraît impossible d'obtenir une résection complète, une chimiothérapie pré-opératoire (ou néo-adjuvante) doit être envisagée avant de tenter une chirurgie de cytoréduction d'intervalle. Le but est

alors d'aboutir à une réduction tumorale maximale afin de diminuer le risque de rechute locale, notamment abdomino-péritonéale qui est le mode de rechute le plus courant des carcinomes ovariens (1,87,88). Dans de très rares cas, une chirurgie conservatrice préservant l'utérus et un ovaire intact peut être envisagée dans l'objectif de préserver la fertilité (1).

#### 4.1.2 La chimiothérapie cytotoxique

Les indications de chimiothérapie cytotoxique dans les carcinomes ovariens primaires sont très larges. En effet tous les stades justifient d'une chimiothérapie adjuvante dans le but de diminuer le risque de rechute locale ou à distance, ou néo-adjuvante dans le but de diminuer le volume tumoral et d'augmenter la possibilité d'une résection chirurgicale complète, à l'exception des stades IA de grade I ou II qui ont un risque minime de rechute dans le contexte d'une résection chirurgicale complète (1).

La chimiothérapie la plus largement utilisée est une bichimiothérapie associant un sel de platine (carboplatine le plus souvent) et d'un taxane (paclitaxel généralement), à raison d'une cure toutes les trois semaines pour six cures en total en chimiothérapie adjuvante, ou de trois cures avant et trois cures après la chirurgie en chimiothérapie néoadjuvante. La dose administrée et l'intervalle de la chimiothérapie peut varier en s'adaptant à l'état général, la morbidité associée, la surface corporelle et la tolérance au traitement des patientes (1,15) (Tableau 4).

Pour les carcinomes ovariens récidivants, la chimiothérapie est le traitement principal. Les protocoles varient en fonction de l'intervalle entre la fin du traitement initial et le diagnostic de la récurrence, et sont définis selon une classification élaborée à l'issue de la conférence de consensus de Vancouver en 2010 (89). Le délai de rechute retenu pour définir la chimiorésistance est de 6 mois.

**Tableau 4 : Principaux protocoles de chimiothérapie adjuvante des carcinomes ovariens primaires**

Protocoles intraveineux	1) Paclitaxel ( $175 \text{ mg/m}^2$ en 3 h iv) suivi par carboplatin (AUC 5-7.5 iv en 1 h) à J1, toutes les 3 semaines pour 6 cures
	2) Docetaxel ( $60\text{-}75 \text{ mg/m}^2$ en 1 h iv) suivi par carboplatin (AUC 5-6 iv en 1 h) à J1, toutes les 3 semaines pour 6 cures
	3) Dose-dense paclitaxel ( $80 \text{ mg/m}^2$ iv en 1 h) à J1, 8, et 15 plus carboplatin (AUC 6 iv en 1 h) à J1, toutes les 3 semaines pour 6 cures
Protocoles intrapéritonéal	Paclitaxel ( $135 \text{ mg/m}^2$ iv infusion en 24 h) à J1, cisplatine ( $75\text{-}100 \text{ mg/m}^2$ ip) à J2, et paclitaxel ( $60 \text{ mg/m}^2$ ip) à J8, toutes les 3 semaines pour 6 cures

iv, indication intraveineuse; AUC, area under the curve; ip, intrapéritonéal.

D'après: Jelovac D, Armstrong DK. CA Cancer J Clin. 2011

#### 4.1.3 Nouvelles stratégie thérapeutiques

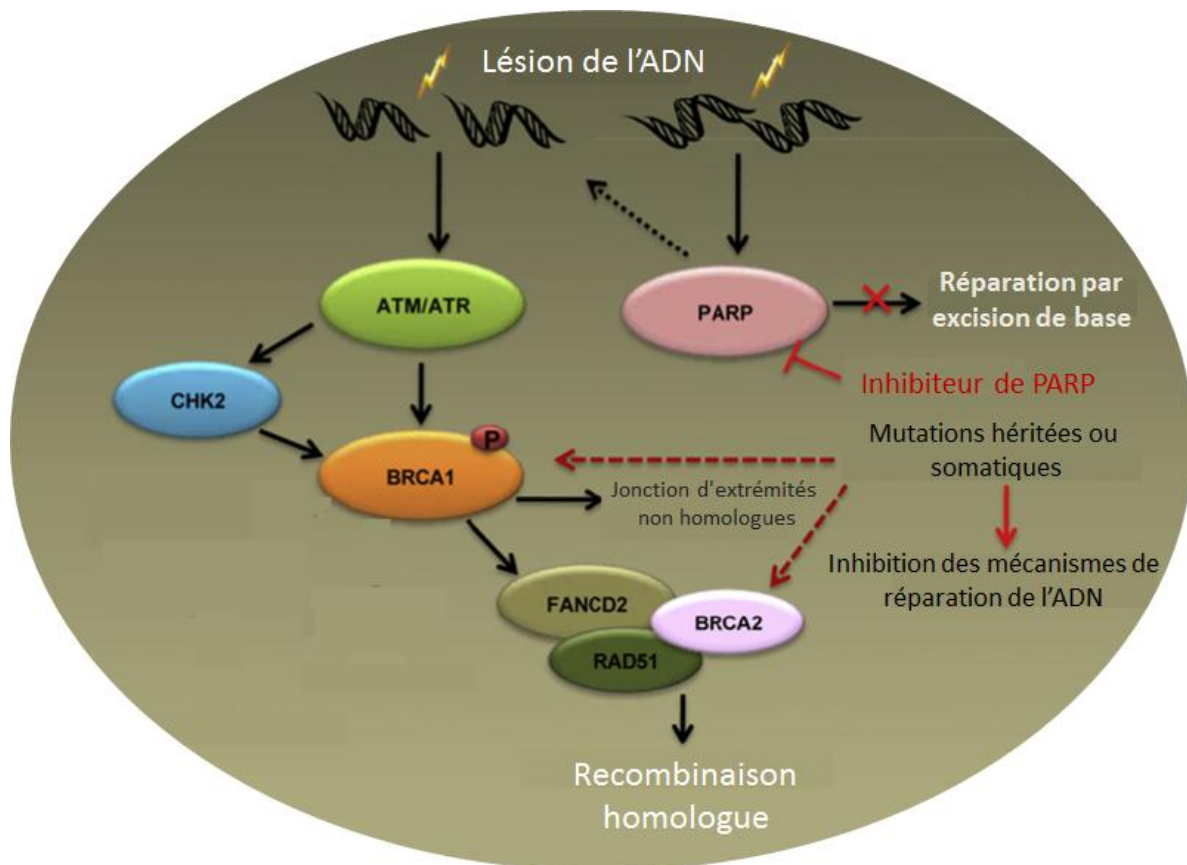
##### 4.1.3.1 Les traitements anti-angiogéniques

Le VEGF est l'un des principaux facteurs angiogéniques dont l'expression est un événement précoce et crucial de la cancérogénèse ovarienne, et associée au potentiel invasif de la tumeur ainsi qu'à sa tendance à la dissémination vers d'autres régions du corps. C'est un facteur de mauvais pronostic (90–92). Parmi les membres de la famille des VEGF, le VEGF-A est le facteur pro-angiogénique identifié comme étant le plus important qui présente l'affinité la plus élevée pour les principaux récepteurs extracellulaires endothéliaux impliqués dans l'angiogénèse: le VEGFR-1 et VEGFR-2 (93). L'inhibition de l'angiogénèse des carcinomes ovariens par le blocage de VEGF devient une stratégie thérapeutique très importante.

Le bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé ciblant les VEGF, est le premier agent de molécule-ciblée impliqué dans le traitement des carcinomes ovariens, notamment dans les stades avancés (94). En association à la chimiothérapie cytotoxique suivi d'un traitement d'entretien en monothérapie, l'efficacité du bevacizumab a été démontrée dans le traitement des carcinomes ovariens primaires (95,96) et de la maladie récidivante sensible ou résistante à la chimiothérapie initial à base des sels de platine (97,98), avec une amélioration de la survie sans progression (SSP) mais pas la survie globale (SG) probablement en raison de l'échange des patientes dans les groupes différents (*crossover*) au cours des essais cliniques (99–101).

##### 4.1.3.2 Les inhibiteurs de PARP

La voie de réparation d'ADN de cassure double-brin engendrée par les agents cytotoxiques par recombinaison homologue (HR) lors de la réplication de l'ADN est le mécanisme critique de la réparation du dommage d'ADN. Les protéines BRCA1/2 y jouent un rôle essentiel (102,103). Dans les cellules où ce mécanisme est endommagé par les altérations des molécules impliquées, l'intégrité génomique des cellules repose sur le mécanisme de réparation d'ADN de cassure simple-brin par excision de base réalisée principalement par une familles d'enzymes nucléaires : Poly [ADP-ribose] polymérase (PARP) (104). En présence de défaut des mécanismes de réparation encadrée par BRCA1/2, l'inhibition de la fonction PARP va introduire un blocage complet de la réparation d'ADN déclenchant l'arrêt des cycles cellulaires et puis l'apoptose cellulaire, dite « létalité synthétique » (105) (Figure 12). Parmi les 17 homologues des PARP, le PARP-1 joue un rôle essentiel dans le processus de réparation d'ADN (106).



**Figure 12 : Implications des protéines BRCA1/2 et PARP dans les processus de réparation de l'ADN.** Suite à une lésion de l'ADN double-brin engendrée par les agents génotoxiques, les kinases ATM/ATR sont activées. Elles vont alors phosphoryler et activer les protéines BRCA1 et 2. BRCA1 est une protéine clé dans la régulation de différents processus de réparation de l'ADN (comme la jonction d'extrémités non homologues ou la recombinaison homologue) et des points de contrôle du cycle cellulaire. BRCA2, engagée dans un complexe avec FANCD2 et RAD51, va jouer un rôle direct dans la recombinaison homologue. L'inhibition de PARP dans des cellules BRCA altéré provoque une inhibition de tout mécanisme de réparation de l'ADN, menant à la mort de la cellule. D'après : WEBERPALS et al, Cancer Genet, 2011

Les anomalies de la voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR) sont des événements assez fréquents dans les carcinomes ovariens, notamment dans presque la moitié du sous-type de séreux de haut-grade: dans la majorité des cas, on observe une perte de fonction de BRCA1/2 engendrée par des altérations génétiques ou épigénétiques pour lesquelles les tumeurs se comportent d'une manière similaire que celles porteuses de mutations germinales des gènes *BRCA1/2* notamment au niveau de leur sensibilité aux sels de platine, d'où le concept «carcinomes ovariens *BRCAness*» (40,107,108). L'ajout des inhibiteurs de PARP-1 dans le traitement des carcinomes ovariens porteurs de mutation des gènes *BRCA1/2* ou *BRCAness* paraît donc rationnel.

L'olaparib est le premier inhibiteur de PARP-1 étudié dans le traitement des carcinomes ovariens. Utilisé comme traitement d'entretien en monothérapie ou associé avec une

chimiothérapie cytotoxique suivi par un traitement d'entretien en monothérapie, l'efficacité de l'olaparib a été montrée dans le traitement de rechutes sensibles aux sels de platine, majoritairement des carcinomes séreux de haut-grade, avec une amélioration de la survie sans progression mais pas la survie globale (109). Fin 2014 l'olaparib a obtenu une AMM en Europe pour le traitement des carcinomes ovariens de haut-grade récidivants et sensibles aux sels de platine porteurs d'une mutation germinale ou somatique de *BRCA*. En 2016, il est disponible en France dans le cadre d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU).

## 5. Facteurs pronostiques

Un facteur pronostique est une variable corrélée à la survie globale. Il doit être fiable, reproductible et validé par plusieurs études concordantes. La mise en évidence des facteurs pronostiques qui permet de discerner des profils évolutifs distincts est essentielle pour mieux adapter la prise en charge thérapeutique.

### 5.1. Facteurs de risque liés à la tumeur

#### 5.1.1 Stade FIGO

L'extension anatomique de la maladie est un facteur pronostique reconnu. La classification de cette extension utilise le stade FIGO qui repose sur l'atteinte ovarienne uni ou bilatérale (stade I), l'extension pelvienne (stade II), péritonéale et/ou ganglionnaire (stade III) ou métastatique (stade IV) (14) (Tableau 2). La survie à 5 ans est très favorable et atteint 90% quand la tumeur est localisée aux ovaires. Elle est moins favorable (70%) quand la maladie s'étend aux organes de voisinage et devient très défavorable (moins de 30%) en cas de maladie disséminée et métastatique (16). Ces chiffres baissent à 70%, 45%, 21% et moins de 5% pour la survie à 10 ans (15). L'extension de la tumeur évaluée par un score préopératoire a toujours une influence à la survie même si une résection complète chirurgicale a été réalisée (110). Compte tenu que la majorité des tumeurs sont diagnostiquées à un stade avancé, la survie des carcinomes ovariens de tous stades confondus reste sombre (45%) (16).

#### 5.1.2 Type histologique

Le type histologique est un facteur pronostique indépendant. Dans les quatre sous-types principaux, les carcinomes endométrioides, à cellules claires et mucineux ont un pronostique beaucoup plus favorable que le type séreux avec une survie à 12 ans à 57%, 64%, 58% et 27% pour tous stades confondus de chaque sous-type (10). La nouvelle classification pathogénétique-moléculaire distingue les carcinomes séreux comme deux catégories histologiques avec une grande disparité au terme de survie à 5 à 10 ans (69% et 56% vs 28% et 15%) (111). L'influence pronostique des types histologiques est plus importante dans les stades avancés compte tenue de la survie identique des tumeurs de stade I (57).

#### 5.1.3 Grade histologique

Le grade histologique est un facteur pronostique indépendant dans les carcinomes ovariens (112). Il est particulièrement déterminant dans les carcinomes de stade I pour lesquels la réalisation de la chimiothérapie dépend du grade tumoral (113).

#### 5.1.4 Facteurs biologiques

La plupart des facteurs biologiques étudiés, par exemple la surexpression d'EGFR, HER2, ou P53, l'index de prolifération Ki67, le taux de CA 125 sérique, n'ont pas formellement validé leur valeur pronostique pour la prise en charge clinique des carcinomes ovariens (114,115). Le CA 125 est le premier biomarqueur identifié et utilisé dans les carcinomes ovariens dont le taux est élevé initialement chez plus que 80% de patientes. L'utilisation de CA 125 sérique est plutôt à but de surveillance de la rechute. Un court intervalle d'augmentation du taux de CA 125 (doublement du taux à moins de 40 jours) pendant la surveillance après le traitement initial est un facteur prédictif de la rechute précoce et un facteur indépendant de mauvais pronostic (114).

#### 5.1.5 Profils d'expression génique

L'analyse des profils d'expression géniques via les puces à ADN est d'utilisation assez récente dans les carcinomes ovariens et a essentiellement permis de distinguer deux principaux types de tumeurs évoqués ci-avant.

Ces évaluations moléculaires pronostiques ou prédictives ne permettent pas l'évaluation indépendante d'un facteur pronostique mais elles aboutiront peut-être au développement de nouvelles thérapies, ou de nouvelles signatures multigéniques diagnostiques, pronostiques ou prédictives de réponse (116).

#### 5.2 Facteurs pronostiques liés aux patientes

L'âge au moment du diagnostic est un facteur pronostique indépendant dans les stades précoces et avancés (112). La survie nette à 10 ans diminue de manière substantielle et constante avec l'âge, passant de 67% chez les patients les plus jeunes (< 45 ans) à 18% pour les patients les plus âgés (> 75 ans) (6). L'état général, évalué par l'indice de performance, est un facteur pronostique notamment dans les stades avancés (117).

#### 5.3 Facteurs pronostiques liés aux traitements

##### 5.3.1 Qualité de la chirurgie et résidu tumoral en fin de l'intervention.

Une stadification complète et appropriée de la maladie pour ne pas sous-stadifier la lésion tumorale est essentielle dans la décision de la prise en charge des carcinomes ovariens.

La chirurgie des cancers de l'ovaire doit par ailleurs répondre au concept de cytoréduction maximale sans résidu tumoral macroscopique postopératoire, dans les traitements des tumeurs primaires notamment des stades avancés ou de la rechute. Il est établi que la taille



du résidu tumoral est un facteur pronostique de survie indépendant essentiel (110,118,119).

### 5.3.2 Intervalle libre sans progression

L'intervalle libre entre la fin des traitements initiaux et la découverte de rechute de la maladie a été identifié comme un facteur prédictif de la survie indépendant. C'est également un facteur prédictif de la chimiosensibilité avec une chimiorésistance accrue en cas de rechute moins de 6 mois après la fin d'une première ligne de chimiothérapie (110,120).

## PARTIE II TRAVAIL EXPERIMENTAL

## B. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

### 1. Justification et hypothèses de travail

Ce travail, intitulé « Etude de mutation des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *MET* et de l'expression de protéines P53 et PTEN et leur implications cliniques dans le carcinome épithélial ovarien de haut grade », s'intègre dans les projets de recherche translationnelle de l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'ICL en lien avec le projet « Diagnostic Avancé et Recherche Translationnelle (DART) du département Santé Biologie Signal (SBS) de l'UMR7039 CRAN Université de Lorraine. Le concept de recherche translationnelle est apparu au cours des vingt dernières années et vise à accélérer le transfert des découvertes de la recherche fondamentale vers des applications diagnostiques et thérapeutiques innovantes pour ainsi assurer une meilleure prise en charge des patients.

En cancérologie, un des objectifs prioritaires en recherche translationnelle est d'identifier et de valider des marqueurs biologiques (biomarqueurs) pour le diagnostic et le traitement des cancers en utilisant les technologies les plus innovantes au bénéfice des patients. Les exemples les plus concrets sont l'avènement des thérapies dites ciblées en cancérologie et la découverte de biomarqueurs prédictifs de réponse ou de résistance à ces thérapies ciblées faisant office de diagnostic-compagnon pour assurer une meilleure personnalisation thérapeutique.

Les connaissances de la biologie tumorale des carcinomes ovariens ont connu des progrès substantiels au cours des dernières années se traduisant par la proposition d'une nouvelle classification pathogénie-moléculaire. Cependant l'analyse moléculaire ne fait pas encore partie des examens de routine clinique pour le diagnostic ou le traitement. Malgré la grande hétérogénéité des carcinomes ovariens, la stratégie thérapeutique demeure peu différente entre les différents sous-types. En fin, l'évolution du traitement des carcinomes ovariens, que ce soit la chirurgie ou les traitements médicaux, n'a pas permis d'augmenter de manière significative la survie au cours des dernières décennies. Tous ces éléments justifient un réel besoin en thérapies innovantes dans la prise en charge des carcinomes ovariens et les perspectives de l'évolution actuelle des stratégies thérapeutiques des tumeurs épithéliales de l'ovaire reposent en grande partie sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques parmi lesquelles les anomalies touchant les voies de signalisation oncogéniques ou des fonctions essentielles à la survie cellulaire.

Cette approche implique donc de différencier les carcinomes ovariens en fonctions de leurs anomalies génomiques ou moléculaires et ainsi d'adapter tout ou partie du traitement à ces anomalies.

### 2. Objectifs de travail

Ce travail a pour objectif l'étude des carcinomes ovariens de haut grade (ou de type II) qui sont les plus fréquemment rencontrés. Lors de ce travail, nous avons cherché à identifier des

anomalies moléculaires présentes au niveau des voies de signalisation cellulaire et d'en discuter l'intérêt thérapeutique. Les paramètres qui ont été étudiés sont les suivants :

- Mutations de *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* par les techniques de biologie moléculaire ;
- Niveau d'expression des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie ;
- Valeurs prédictives ou pronostiques de ces biomarqueurs.

Ce travail a donné lieu à une publication actuellement soumise dans une revue internationale à comité de lecture, à une présentation orale en congrès national et une présentation par affiche en congrès international (Annexe 8)

### C. PATIENTES, MATERIEL ET METHODES

#### 1. Sélection des patientes

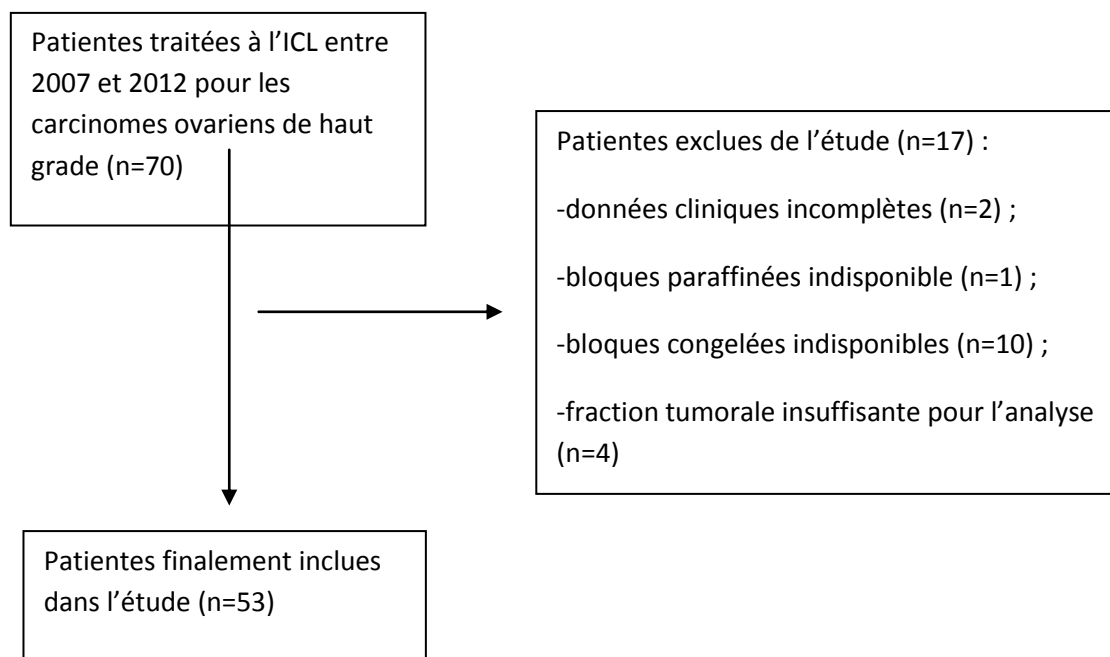
Soixante-dix patientes atteintes de carcinomes ovariens de haut-grade, toutes traitées à l'Institut de Cancérologie de Lorraine entre 2007 et 2012, ont été sélectionnées pour cette étude rétrospective. Parmi elles, 17 patientes ont été exclues pour les critères suivants : données cliniques incomplètes dans 2 cas, échantillon tumoral fixé et inclus en paraffine non disponible pour dans 1 cas, échantillon tumoral congelé non disponible dans 10 cas et contenu tumoral de l'échantillon insuffisant dans 4 cas (Figure 13).

#### 2. Traitement des prélèvements

Deux types de prélèvements tumoraux ont été utilisés : des prélèvements tumoraux fixés à l'AFA (Alcool, Formol, Acide acétique) et inclus en paraffine d'une part, et des fragments tumoraux congelés, d'autre part.

Le prélèvement est fixé dans l'AFA pendant 24 heures. Ceci permet la conservation de la morphologie cellulaire au sein du fragment ainsi que des sites antigéniques (121). Le prélèvement est ensuite découpé en plusieurs fragments et inclus dans la paraffine coulée à 56°C afin d'obtenir un échantillon solide homogène et une bonne conservation de la tumeur au cours du temps. Compte tenu de l'agressivité du mélange acide et alcool, cette méthode, peut cependant entraîner une fragmentation des acides nucléiques rédhibitoire à l'analyse de l'ADN par séquençage à haut débit. Le fragment congelé dans l'azote liquide et cryoconservé à -80°C, bien que plus délicat à manipuler, permet une meilleure conservation de l'ADN.

Pour cette raison, les premiers types de prélèvements sont utilisés pour les analyses d'expressions protéiques par l'immunohistochimie alors que les fragments congelés sont utilisés pour l'extraction et l'analyse des mutations somatiques d'ADN.



**Figure 13 : Illustration de la procédure de la sélection des patientes.**

### 3. Méthodes d'analyses

L'analyse des mutations somatiques des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* est réalisée à l'aide de techniques de biologie moléculaire telles que la PCR HRM et le séquençage haut-débit. L'analyse de l'expression des protéines P53 et PTEN est quant à elle réalisée par immunohistochimie.

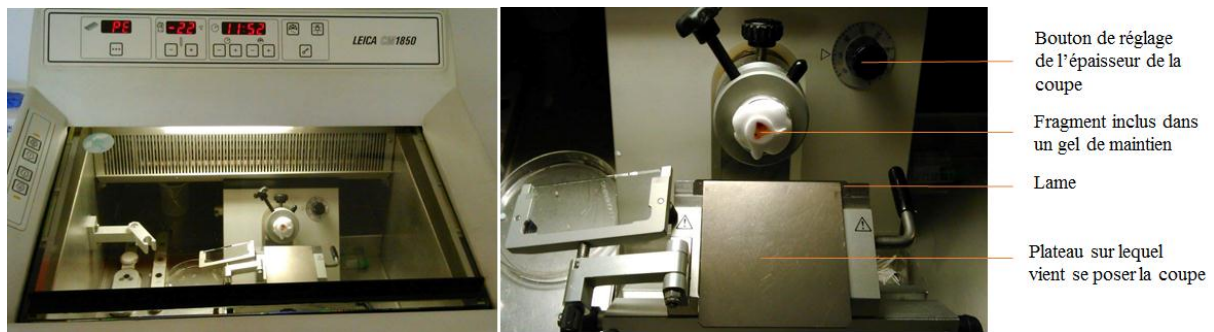
#### 3.1. Recherche de mutations somatiques par les techniques de biologie moléculaire

##### 3.1.1. Etape pré-analytique : préparation des coupes sur lames et coloration à l'hématoxyline-Eosine-Safran (HES), détermination du pourcentage de cellules tumorales

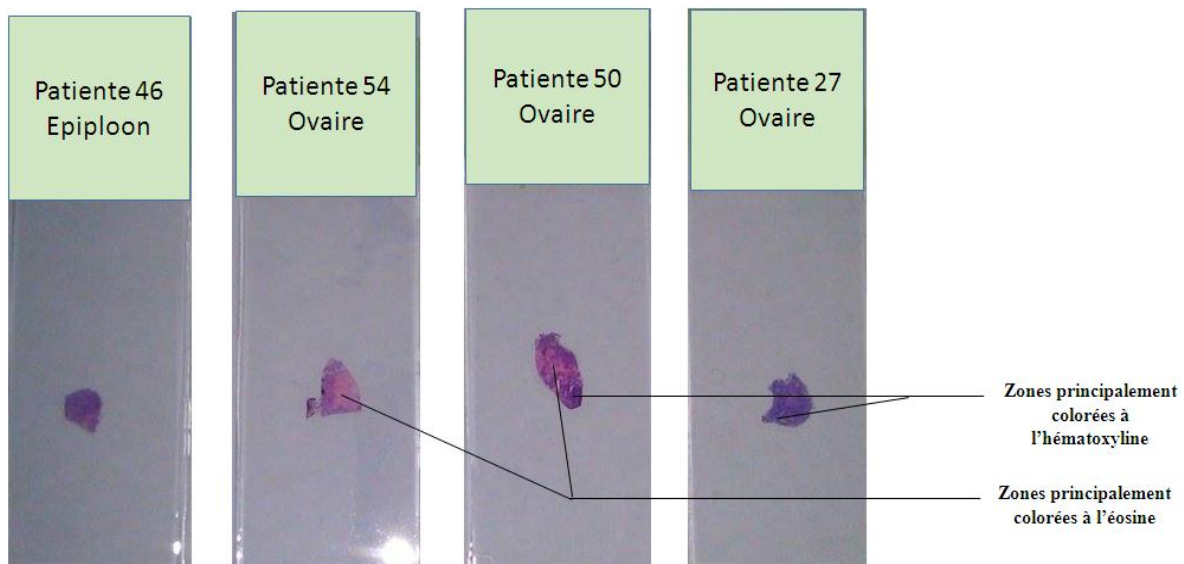
Afin de connaître le pourcentage des cellules tumorales contenu dans chaque fragment congelé, des coupes de 5µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un cryostat (CM 1880, Leica Biosystem, Nussloch, Germany) (Figure 14). Ces coupes sont ensuite disposées par capillarité sur des lames de verre, qui sont immédiatement plongées dans l'AFA. Le fragment correspondant à la coupe est alors directement replacé dans de la carboglace, pour éviter une dégradation des acides nucléiques.

Une fois les coupes fixées, elles sont colorées par HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) (Figure 15) (Annexe 1). La coloration HES associe trois colorants utilisés successivement et permettent la coloration violette des noyaux cellulaires par l'hématoxyline basique, la coloration rose du cytoplasme par l'éosine acide et la coloration jaune des fibres de collagène par le safran.

Lorsque la lame est colorée, un médecin anatomopathologiste détermine le pourcentage tumoral de la coupe par observation de la lame au microscope (grossissement x10). Les fragments contenant moins de 10% de cellules tumorales ne seront pas utilisés pour les analyses.



**Figure 14 : Photographies du Cryostat Leica 1850 lors de la coupe d'un fragment congelé.** Le fragment congelé est déposé dans le cryostat à une température de  $-22^{\circ}\text{C}$ . Il est alors déposé sur un plot puis inclus dans un gel de maintien qui se solidifie dans les températures négatives. Le fragment peut alors être découpé en sections de  $5\mu\text{m}$  d'épaisseur.



**Figure 15 : Photos de coupes tumorales établies au cryostat, posées sur lames et colorées par Hématoxyline, Eosine, Safran (HES).** La coloration HES est une coloration tri-chromique associant un colorant basique révélant les noyaux cellulaires (Hématoxyline), un colorant acide révélant le cytoplasme (Eosine) et un dernier colorant révélant les fibres de collagène (Safran). Macroscopiquement, des zones violettes qui indiquent une plus forte densité nucléaire sont distinguées des zones roses plus cytoplasmiques.

### 3.1.2. Extraction des ADN à partir des prélèvements congelés

L'ADN contenu dans les cellules des fragments tumoraux congelés est isolé à l'aide du kit d'extraction «QIAmp DNA mini kit» (Qiagen, Allemagne) en suivant le protocole de purification d'ADN depuis des tissus (Annexe 2). Le principe de cette extraction repose sur les propriétés de liaison sélective des composés sur une membrane à base de silice tapissant la colonne d'extraction. En effet, dans les conditions chimiques apportées par la composition des différents tampons, l'ADN se lie à la membrane de silice tandis que les contaminants passent à travers.

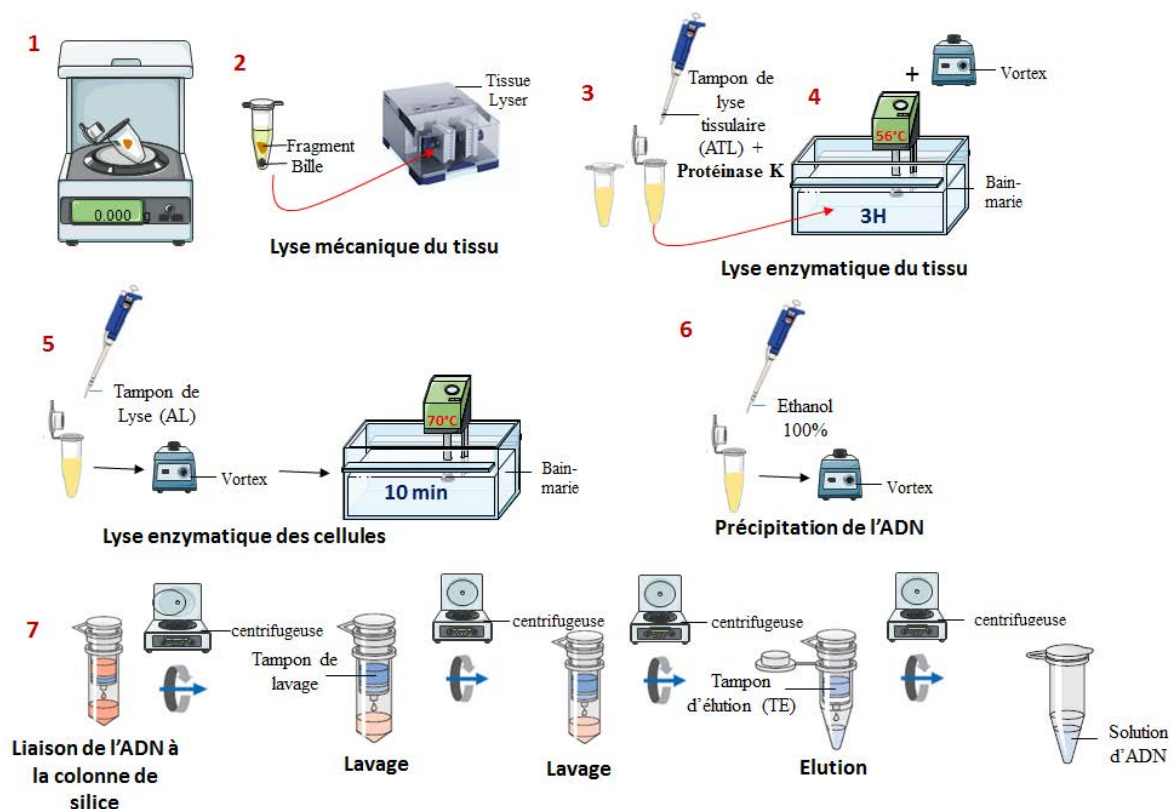
Pour réaliser cette extraction depuis un tissu congelé, plusieurs étapes sont nécessaires (Figure 16):

- La libération de l'ADN par la lyse des composants protéiques du tissu. Une lyse mécanique est d'abord effectuée grâce à un appareil à fragmentation, le «TissueLyserII» (Qiagen). Puis, une lyse enzymatique est réalisée grâce à l'ajout de la protéinase K : l'échantillon est alors incubé dans deux bains-maries successifs, soumis à des conditions différentes.
- La précipitation de l'ADN, provoquée par l'ajout d'éthanol.
- La liaison de l'ADN à la membrane de silice grâce au transfert du mélange dans la colonne d'extraction.
- Les deux lavages qui permettent successivement des protéines, puis des sels, d'être éliminés en passant à travers la membrane.
- L'élution de l'ADN, se décrochant de la membrane, par l'ajout d'un tampon aqueux.

### 3.1.3. Dosage de l'ADN extrait

Pour vérifier la qualité de l'extraction et calculer la quantité d'ADN extrait, un dosage de la solution obtenue précédemment est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoVue, GE Healthcare, Little Chalfont, Angleterre) (Figure 17). Cet appareil permet de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm, maximum d'absorption de la molécule d'ADN, dans un volume de 2  $\mu$ L d'échantillon seulement.

Grâce à la loi de Beer-Lambert, il calcule alors la concentration d'ADN de cet échantillon. La pureté de l'échantillon est quant à elle traduite par le rapport d'absorbance A260nm/A280nm. Une fois l'ADN extrait et dosé, il est conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure.



**Figure 16 : Schéma de principe de l'extraction d'ADN à l'aide du kit « QIAamp DNA mini kit » (Qiagen).** 1. Pesée du fragment tissulaire tumoral - 2. Ajout de PBS et d'une bille de métal dans le tube Eppendorf® contenant le fragment et lyse mécanique du tissu à l'aide du *TissueLyser* (Qiagen) secouant le tube très violemment - 3. Ajout de protéinase K et de tampon ATL pour -4 une première lyse enzymatique à 56°C pendant 3 heures - 5. Suite de la lyse enzymatique dans du tampon AL à 70°C pendant 10 minutes - 6. Ajout d'éthanol 100% pour la précipitation de l'ADN - 7. Isolement de l'ADN et purification des protéines et sels sur colonne de silice.



**Figure 17 : Photo du NanoVuePlusTM.** Cet appareil est un spectrophotomètre permettant de mesurer l'absorbance des 2µL d'échantillons déposés, et d'en mesurer la concentration grâce à la loi de Beer-Lambert.

### 3.1.4. Analyse des mutations par PCR-HRM (*Polymerase Chain Reaction High Resolution Melting*)



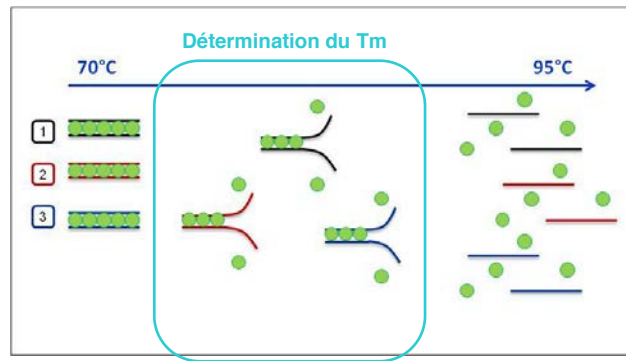
La méthode de la PCR HRM permet d'évaluer, de manière non spécifique, la présence ou l'absence de mutations sur l'ensemble d'un exon (122).

L'analyse par PCR HRM est effectuée sur plaque 96 puits. Les réactifs utilisés pour cette réaction sont issus du kit «LightCycler® 480 High Resolution Melting Master» (Roche Diagnostics, Meylan, France), prêt à l'emploi. Le logiciel utilisé pour le traitement des courbes est le «LightCycler® 480 SW 1.5» (Roche Diagnostics).

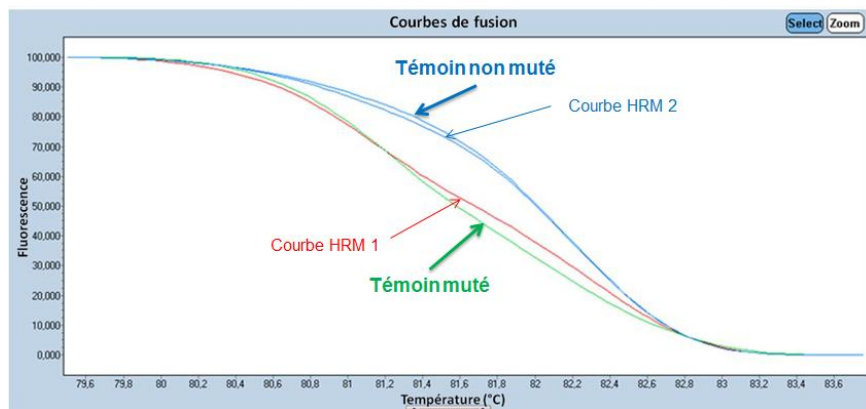
Dans chaque puits est disposé le mélange réactionnel composé des éléments nécessaires à la synthèse des amplicons : les amorces sens et anti-sens spécifiques de l'exon à étudier, de l'eau «DNase free», le « Master mix » contenant le Resolight® (fluorochrome), le mélange des quatre dNTPs et la Taq Polymerase (enzyme de polymérisation de l'ADN) et enfin du MgCl<sub>2</sub> catalysant la réaction enzymatique. Sur chacun de ces mix est ensuite ajouté chaque échantillon d'ADN à étudier. Chaque échantillon est testé en duplicat pour chaque exon analysé. Les témoins positifs et négatifs pour les mutations recherchées sont également déposés en duplicats (Annexe 3). La plaque 96 puits est alors disposée dans un thermocycleur pour les différentes réactions de PCR : le «LightCycler®480» (Roche Diagnostics).

La PCR HRM est réalisée en trois étapes. Tout d'abord, 45 cycles de PCR dite «classique» sont effectués en présence d'un intercalant fluorescent d'ADN, le Resolight®, afin d'amplifier la séquence d'intérêt (123). Pour augmenter la spécificité et l'efficacité de cette PCR, la température d'hybridation des amorces est progressivement augmentée au cours des cycles (PCR *touchdown*). Ensuite, une étape de dénaturation des brins d'ADN est suivie d'un refroidissement rapide à 40°C. Cela permet le réappariement des amplicons et la réincorporation du Resolight® au sein de ces amplicons. La fluorescence est alors à son maximum.

Finalement l'étape d'HRM : la cible amplifiée est progressivement dénaturée en augmentant la température du milieu réactionnel de 40°C à 95°C par petits incréments de 0.2°C/seconde. Lors de cette étape, l'intercalant fluorescent va graduellement se libérer des amplicons (Figure 18), générant ainsi une diminution de la fluorescence. Une courbe de fusion haute résolution représentant l'évolution de la fluorescence en fonction de la température est alors obtenue (Figure 19). Le profil de cette courbe sera spécifique à la température de fusion (T<sub>m</sub>) de chaque amplicon, dépendant elle-même essentiellement de la longueur du double-brin étudié et de sa proportion en Guanine et en Cytosine (coefficient de Chargaff) mais aussi de l'enchaînement des bases au sein de l'amplicon. Ainsi, le profil de fusion d'un ADN muté sera différent de celui d'un ADN non muté pour un exon donné. Le statut mutationnel de l'ADN tumoral étudié est défini en comparant son profil de fusion avec ceux d'un témoin muté et d'un témoin non muté pour la mutation recherchée (Figure 19).



**Figure 18 : Représentation schématique de la libération du Resolight® (en vert) de différents amplicons (1), (2) et (3) lors de l'augmentation de la Température.** En augmentant la température graduellement lors de la PCR-HRM, l'intercalant fluorescent (Resolight®) va se libérer progressivement des double-brins d'ADN, engendrant ainsi une baisse de la fluorescence. Cette diminution va donc dépendre de la température de fusion ( $T_m$  : température à laquelle 50% de l'ADN double-brin s'est dénaturé) de chaque amplicon : plus le  $T_m$  sera faible, plus la chute de fluorescence sera précoce

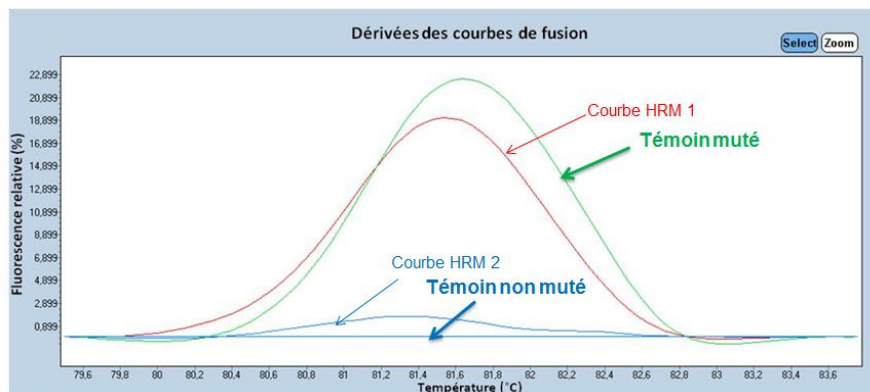


**Figure 19 : Comparaison des courbes de fusion haute résolution de deux échantillons analysés avec celles des témoins muté et non muté.**

Sur ces courbes représentant la diminution de la fluorescence en fonction de la température, deux profils sont distincts : le profil «muté» (témoin vert + courbe 1) montre une diminution rapide de la fluorescence tandis que sur le profil «non muté» (témoin bleu + courbe 2), cette diminution est observée plus tardivement ( $T_m$  plus élevé)

Pour faciliter la lecture des résultats, la dérivée de ces courbes de fusion par rapport à une courbe de base (le témoin non muté) est effectuée (Figure 20).

Cette technique a été utilisée pour étudier la présence ou l'absence de mutations sur les exons 2, 3 et 4 des gènes *KRAS* et *NRAS*, sur les exons 10 et 21 du gène *PIK3CA*, ainsi que sur l'exon 15 du gène *BRAF* chez les 53 patientes étudiées.



**Figure 20 : Dérivées des courbes de fusion par rapport à la courbe du témoin non muté.**  
Cette représentation des courbes de fusion permet une meilleure lecture des résultats

### 3.1.5. Analyse de mutations par séquençage haut-débit

L'analyse par séquençage haut-débit permet de rechercher et d'identifier précisément certaines anomalies telles que les mutations ponctuelles, les insertions, les délétions et les petits réarrangements chromosomiques (122). Pour chacune des patientes étudiées, 15 exons seront analysés : les exons 2, 3 et 4 des gènes *KRAS* et *NRAS*, l'exon 15 du gène *BRAF*, les exons 5, 10 et 21 du gène *PIK3CA*, et les exons 14, 16, 17, 18, 19 du gène *MET*.

Les échantillons seront analysés par la méthode de pyroséquençage massif (*Technologie 454, GS Junior, Roche Diagnostics*).

#### 3.1.5.1. Préparation de la librairie

La librairie, en séquençage haut-débit, correspond à l'ensemble des amplicons à séquencer lors d'une seule analyse, appelée «run de séquençage». L'établissement de cette librairie consiste donc en l'amplification des séquences nucléotidiques d'intérêt puis au conditionnement de ces amplicons pour la réaction de séquençage.

##### 3.1.5.1.1. Amplification des séquences d'intérêt

L'amplification des 15 exons d'intérêt est effectuée grâce à deux PCR successives de 35 cycles (Figure 21). Tout d'abord, une première PCR appelée «PCR TAG» va permettre une amplification des exons de l'ADN tumoral grâce à l'hybridation des amorces spécifiques de la séquence d'intérêt (Figure 22).

Ensuite, une seconde PCR, la «PCR MID», va permettre une identification nucléotidique de chaque patiente grâce à l'hybridation d'amorces contenant une séquence «étiquette» MID, propre à chaque patiente (Figure 22).

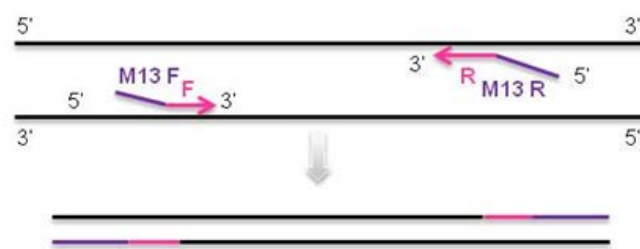
Ces deux PCR sont réalisées en plaque 96 puits (Annexe 4) grâce au kit «FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack» (*Roche Diagnostic*). Il est composé d'une enzyme «FastStart High Fidelity» permettant une amplification très fidèle de la séquence d'intérêt, d'un

tampon de réaction supplémenté en  $MgCl_2$ , de DMSO facilitant l'hybridation des amorces à leurs cibles et d'un mix nucléotidique. A ces réactifs sont ajoutés les amorces et les ADN/amplicons nécessaires à chaque réaction (Figure 22). Les réactions sont effectuées dans thermocycleur Mastercycler® nexus (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne).

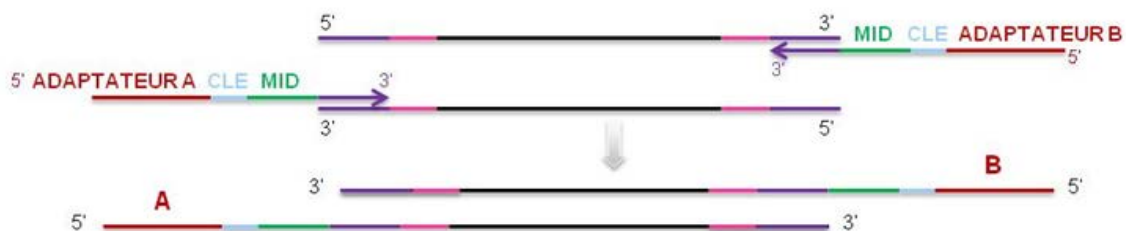
95°C	5 min	35 cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 minutes	

**Figure 21 : Programme du thermocycleur pour les PCR TAG et MID.** Pour les deux PCR successives, la température de dénaturation est de 95°C, celle d'hybridation de 60°C et celle d'élongation de 72°C.

#### A. PCR TAG



#### B. PCR MID



**Figure 22 : Schémas représentatifs des PCR TAG et MID.** Lors de la PCR TAG, des amorces forward (F) et reverse (R) spécifiques de l'exon à amplifier (en rose) viennent s'hybrider aux brins d'ADN tumoraux. A l'extrémité de ces amorces est accolée une séquence universelle : la queue M13 (en violet). Cette première PCR permet l'amplification de la séquence d'intérêt. Lors de la PCR MID, des amorces spécifiques des queues universelles M13 forward et reverse s'hybrident aux amplicons de la PCR TAG. A leurs extrémités est accolé une séquence MID propre à chaque patient, une séquence «clé» ainsi qu'une séquence adaptatrice A ou B utile lors de la PCR en émulsion. Cette PCR permet l'identification de chaque patient grâce à une étiquette nucléotidique.

#### 3.1.5.1.2. Contrôle des produits de PCR sur gel d'agarose

Afin de vérifier l'amplification des ADN tumoraux, un contrôle sur gel d'agarose est effectué à la fin de chaque PCR. Le gel d'agarose à 2% (p/V) est préparé à partir d'agarose, d'eau distillée, de TBE 10X et de «Red Nucleic Acid Gel Stain» (*Biotium, Hayward, Californie*), un intercalant de l'ADN fluorescent dans les UV. Les produits d'amplifications sont déposés sur ce gel avec un colorant bleu «BlueJuice™ Gel Loading Buffer» (*Life Technologies, Invitrogen, Saint-Aubin, France*). Le BlueJuice™ est composé bleu qui sert d'une part à alourdir les ADN et d'autre part à suivre leur migration. Le gel est mis sous tension (100V) pendant 20 minutes, puis les gels sont intensifiés sous UV dans le Gel Doc™ XR (*BioRad, Marnes-la-Coquette, France*).

#### 3.1.5.1.3. Purification des amplicons

Deux purifications sont nécessaires afin d'améliorer la qualité de lecture du «run de séquençage». Elles vont permettre l'élimination des amorces, des nucléotides en excès, des sels ou encore des enzymes restés dans le mélange réactionnel.

La première purification est une purification sur colonne effectuée à l'aide du kit « High Pure PCR Product Purification » (*Roche Diagnostic*) (Figure 23). Les amplicons sont d'abord mis en contact avec du « *binding buffer* », permettant la liaison des ADN aux fibres de verre lors du transfert dans la colonne de purification. Une élimination des contaminants est ensuite réalisée par lavages successifs. Enfin, les amplicons purifiés sont récoltés par ajout de tampon d'élution dans la colonne.

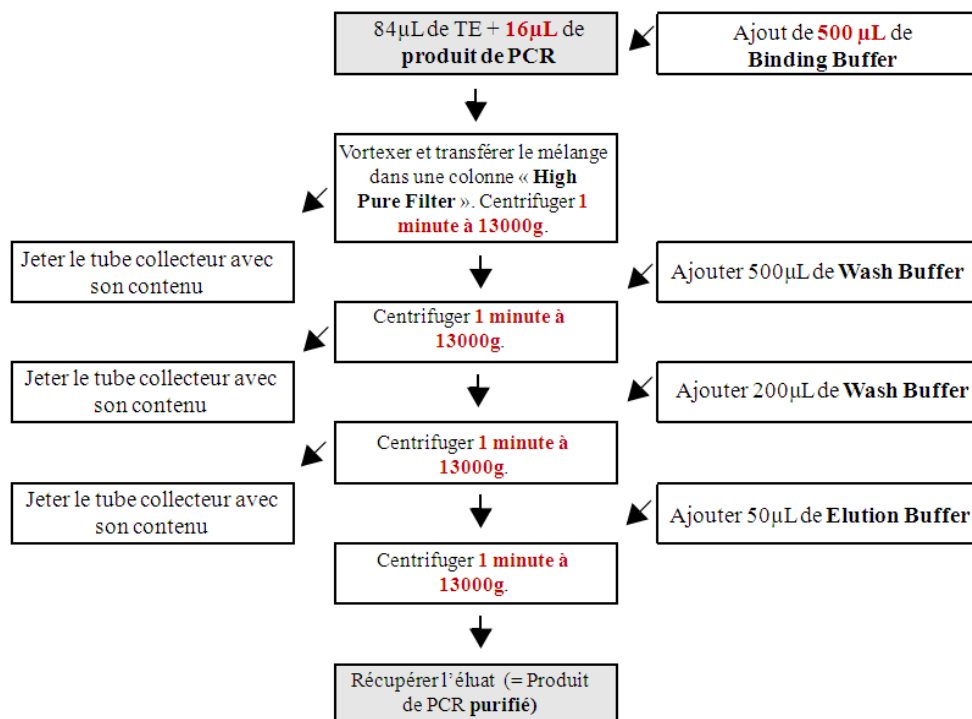
La deuxième purification est une purification sur billes effectuée à l'aide du kit «AMPure XP» (*Beckman Coulter, USA*). Elle repose sur le principe de l'Immobilisation Réversible en Phase Solide (IRPS). Chaque bille paramagnétique est en effet capable de se lier à l'ADN de façon réversible en présence de PEG (polyéthylène glycol) et de sels contenus dans la solution d'AMPure XP. La purification s'effectue à l'aide d'un portoir magnétique (Figure 24) qui permet, lors des lavages, de n'aspirer que la solution de lavage contenant les contaminants de PCR. L'élution des ADN purifiés est réalisée avec du tampon TE.

#### 3.1.5.1.4. Dosage des amplicons

À la fin des purifications, un dosage des amplicons est réalisé dans le but d'effectuer une dilution de ces échantillons à une même concentration finale de  $10^9$  molécules d'ADN/ $\mu\text{L}$ . Le dosage est effectué avec le kit «Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay kit» (*Life Technologies*). Le PicoGreen est un fluorochrome qui se lie sélectivement aux double-brins d'ADN en augmentant alors considérablement son émission de fluorescence (124). Le dosage des amplicons est réalisé en plaque 96 puits. La dilution d'un ADN standard est réalisée en duplicat afin de créer la gamme étalon du dosage (Annexe 5).

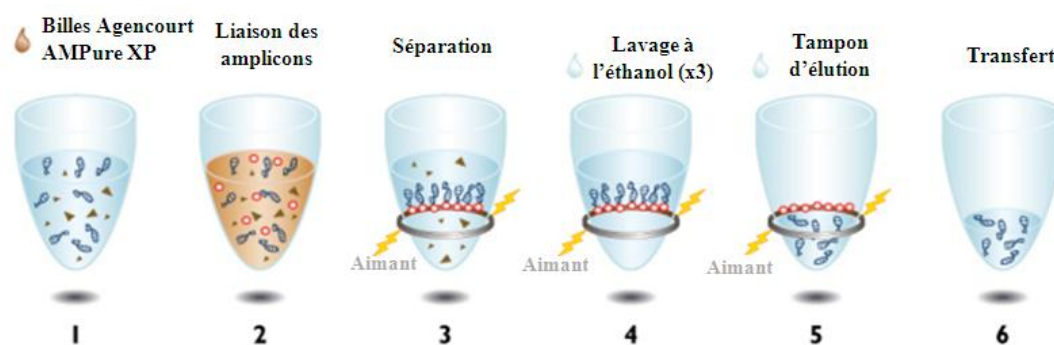
Les amplicons dilués au 1/100ème sont déposés en triplicat dans la plaque. Le Picogreen, dilué au 1/200ème, est alors déposé dans l'ensemble des puits. Après homogénéisation des puits, la plaque est placée dans le thermocycleur «LightCycler®480» (*Roche Diagnostics*) qui réalise l'acquisition de la fluorescence à 37°C.

Les concentrations des échantillons sont alors déterminées grâce à l'équation de la gamme étalon (Figure 25). Selon une formule établie par Roche (Annexe 6), les volumes permettant la dilution des échantillons à une concentration de  $10^9$  molécules d'ADN/ $\mu$ L sont alors calculés. Cette dilution est suivie d'une mise en commun de tous les échantillons dans un seul et unique tube (pool), qui lui-même sera dilué à une concentration finale de  $10^6$  molécules d'ADN/ $\mu$ L.



**Figure 23 : Diagramme du mode opératoire de la « High Pure PCR Product Purification » (Roche Diagnostic).** Cette première purification est une purification sur colonne. L'ADN amplifié est retenu dans des fibres de verre tapissant le fond de la colonne alors que les amorces et les nucléotides en excès sont éliminés lors des deux lavages successifs. Les produits de PCR sont alors récupérés dans un tampon d'éluion aqueux.

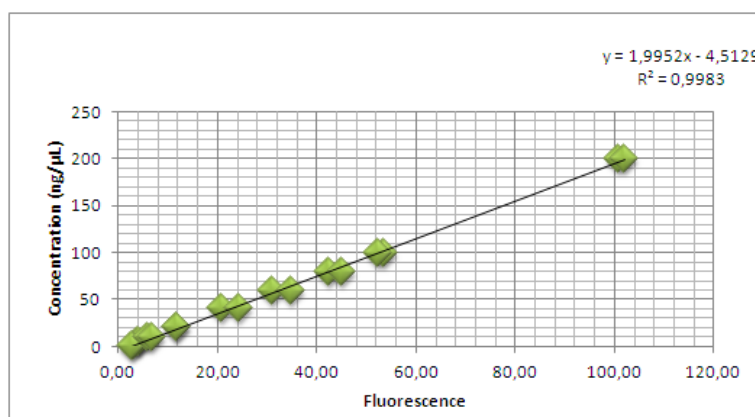
D'après : <https://lifescience.roche.com/shop/products/high-pure-pcr-product-purification-kit>



**Figure 24 : Schéma de principe de la purification « Agencourt AMPure XP » (Beckman Coulter, USA).** Cette deuxième purification est une purification sur billes paramagnétiques. Les acides nucléiques sont immobilisés sur des microparticules paramagnétiques dans des conditions de tampon bien spécifiques. 1. Ajout de 1.8µL d'AMPure XP pour 1µL de produit de PCR – 2. Liaison des fragments d'ADN aux billes paramagnétiques – 3. Séparation des billes (fixées à l'ADN) des contaminants – 4. Lavage des billes et des amplicons avec de l'éthanol 70% pour éliminer les autres contaminants – 5. Elution des fragments d'ADN purifiés – 6. Transfert de l'éluât dans un nouveau tube.

D'après :

<http://www.beckmancoulter.fr/Sciences+de+la+vie/Biologie+mol%C3%A9culaire/Purification+et+extension+de+l%E2%80%99ADN+ARN/Agencourt%C2%AE+AMPure%C2%AE+XP.html>



**Figure 25 : Droite d'étalonnage obtenue par dosage au Picogreen d'une gamme de dilutions d'ADN standard.** Cette courbe représente la concentration d'ADN en ng/µL (y) en fonction de la fluorescence émise par le Picogreen (x). L'équation de cette droite est donc utilisée pour déterminer les concentrations (y) inconnues des échantillons, connaissant la fluorescence émise par ces échantillons (x). (Longueur d'onde d'excitation du Picogreen : 480nm – Longueur d'onde d'émission : 520nm)

### 3.1.5.2. La PCR en émulsion

#### 3.1.5.2.1. Amplification sur billes de la librairie

La PCR en émulsion (emPCR) est une méthode permettant de réaliser plus de 1 million de réactions en parallèle dans un seul tube grâce au principe de l'émulsion. Elle permet une

amplification clonale des produits de PCR sur des billes, nécessaire à la réaction de séquençage à haut débit (GS Junior, *Technologie 454, Roche Diagnostics*).

La réaction est réalisée à l'aide du kit «GS Junior Titanium emPCR kit (Lib A)» (*Roche Diagnostics*) en suivant plusieurs étapes (Figure 26) :

-- Un petit volume du pool à  $10^6$  molécules/ $\mu\text{L}$  est mis en présence de microbilles («Capture Beads A» ou «Capture Beads B») contenues dans ce kit. Les amplicons se lient alors aux séquences nucléotidiques complémentaires à leurs adaptateurs A ou B, présentes sur les billes. La présence de ces deux types de billes permettra, lors du séquençage, une lecture en double-sens (*forward et reverse*) des amplicons.

-- Parallèlement, deux mélanges réactionnels («Live Amp Mix A» et «Live Amp Mix B») sont préparés. Ils contiennent les réactifs nécessaires à la réaction de PCR qui se déroulera, respectivement, à partir des ADN liés aux «Capture Beads A» ou aux «Capture Beads B».

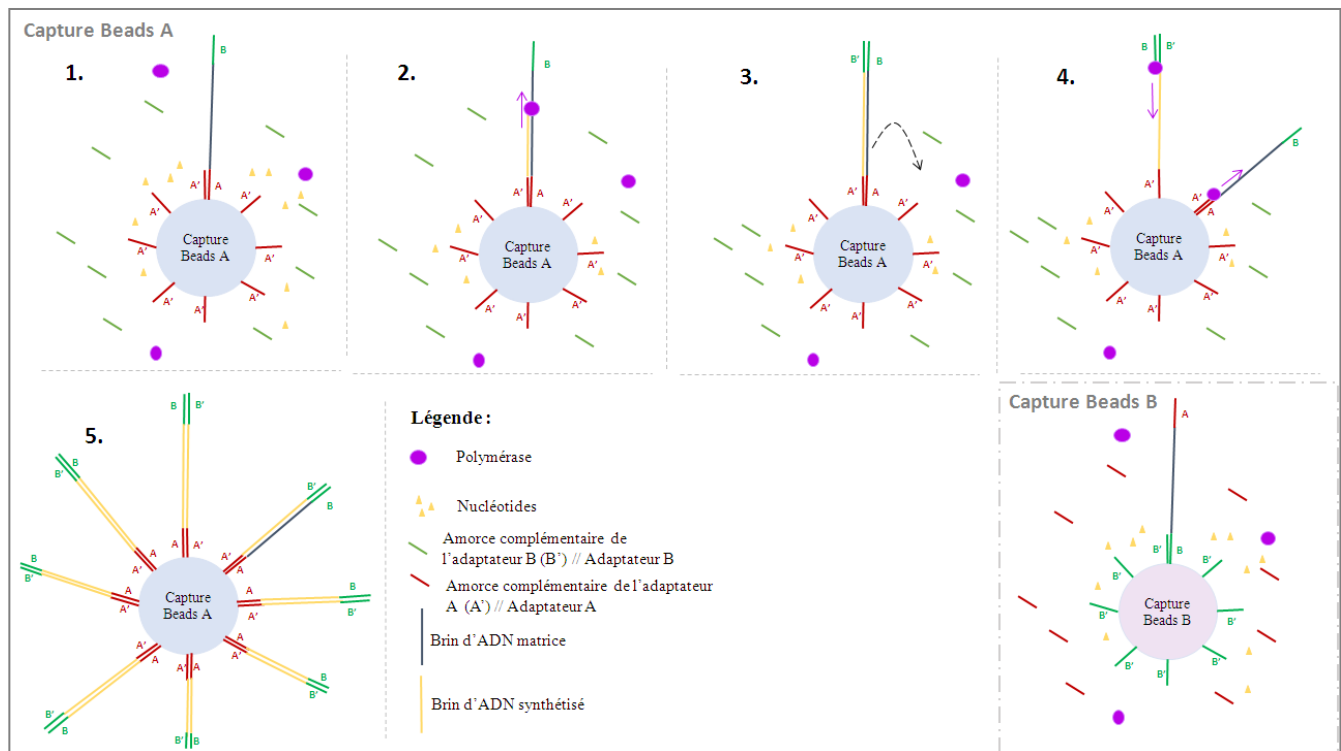
-- L'un après l'autre, chaque mix réactionnel est alors mélangé avec les billes qui lui correspondent (ex : Live Amp Mix B dans le tube des Capture Beads B)

-- Chacun des mélanges est enfin versé dans une huile à émulsion placée sous agitation dans le «Turrax Stiring Tube» (*Sigma-Aldrich, USA*). Chaque bille est alors capturée dans gouttelette d'émulsion avec les réactifs nécessaires à la «microréaction» de PCR. Une fois l'émulsion effectuée, le mélange est distribué dans une plaque 96 puits déposée dans un thermocycleur (*Mastercycler® nexus, Eppendorf AG*). Un programme de 50 cycles (Figure 27) est alors réalisé dans le thermocycleur pendant environ 6 heures, permettant l'amplification clonale sur billes des produits de PCR (Figure 26). Le volume de la solution de la librairie d'ADN diluée à  $10^6$  molécules/ $\mu\text{L}$  à déposer sur les « Capture Beads » est calculé par la formule suivante (125):

$$\text{Volume de librairie d'ADN}(\mu\text{L}) = \frac{\text{Molécules par billes souhaitées} \times 5 \text{ millions de billes}}{\text{Concentration de la librairie (millions de molécules}/\mu\text{L})}$$

La concentration de la librairie restant toujours la même, ce volume dépend du nombre de molécules par billes souhaitées. Ce nombre est estimé en fonction de la quantité d'exons à analyser. Pour le 1er run de séquençage pour lequel la librairie est composée de 390 amplicons différents, ce nombre est fixé à 0.5 molécules par billes. Un dépôt de  $2.5\mu\text{L}$  de la librairie a été effectué dans chaque tube de «Capture Beads». Pour le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> Run de séquençage pour lequel la librairie est composée de 236 et 334 amplicons, ce nombre est également fixé à 0.5 molécules par billes.





**Figure 26 : Schéma récapitulatif de la réaction de PCR en émulsion.** Lors de la réaction, deux types de « Capture Beads », recouvertes de séquences oligonucléotidiques complémentaires à l'un des adaptateurs (exemple : billes A recouvertes de séquences complémentaires A') sont mis en jeu. Prenons l'exemple des « Capture Beads A » : 1. Dans une gouttelette d'émulsion, un brin d'ADN vient s'accrocher par son extrémité A sur la bille, en présence d'amorces complémentaires à B (B'), de polymérase et de nucléotides – 2. La polymérase vient synthétiser un brin complémentaire depuis l'extrémité A jusqu'à la B – 3. Le brin d'ADN matrice se dénature et se détache du brin synthétisé pour aller s'hybrider à une autre amorce A' – 4. Alors que la réaction (2) se répète à partir d'une autre amorce A', une amorce B présente dans le mélange vient s'hybrider au 1<sup>er</sup> brin synthétisé (orange) et permet une amplification dans le sens B' → A' – 5. La réaction s'est ainsi amplifiée jusqu'à ce que la bille soit recouverte de copies du brin matrice.

94°C	4 min	x 50 cycles
94°C	30 sec	
58°C	4,5 min	
68°C	30 sec	
10°C	-	

**Figure 27 : Programme du thermocycleur pour la PCR en émulsion.** Pour l'emPCR, la température de dénaturation est de 94°C, celle d'hybridation de 58°C et celle d'élongation de 68°C. La PCR dure environ 6 heures.

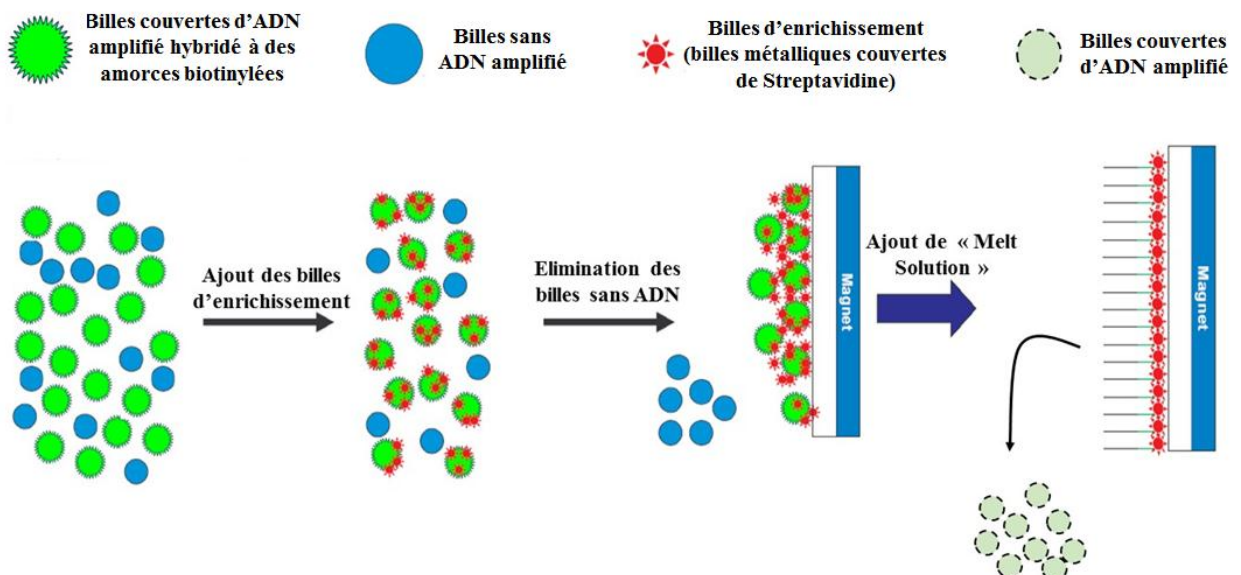
### 3.1.5.2.2. Enrichissement des ADN sur billes

Suite à cette amplification, le contenu de tous les puits est placé dans un seul tube, puis des lavages sont effectués afin d'éliminer l'huile et les réactifs en excès. Ensuite, les billes

couvertes d'ADN simple-brin amplifié sont sélectionnées et séparées de celles qui sur lesquelles l'ADN ne s'est pas hybridé : c'est l'étape d'enrichissement. Cette étape est nécessaire à la bonne qualité du run de séquençage.

Pour cela, les billes couvertes d'ADN amplifié sont d'abord hybridées à des amorces complémentaires biotinylées («Enrich Primer A/B»), puis mises en présence de billes d'enrichissement recouvertes de streptavidine (Figure 28) (*emPCR Bead Recovery Reagents, Roche Diagnostics*). Celles-ci vont se fixer aux amorces hybridées sur les billes d'emPCR « amplifiées » grâce à une interaction Streptavidine-biotine alors que les billes d'emPCR «non amplifiées» (sans ADN) seront séparées des autres et éliminées (Figure 28). L'ajout de «Melt solution» permettra enfin la dénaturation des amorces biotinylées et l'élution des billes enrichies (Figure 28).

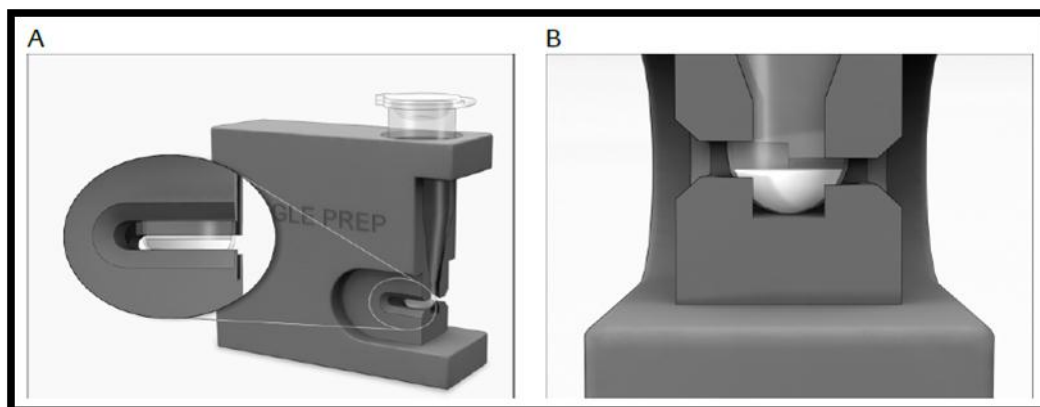
#### LEGENDE :



**Figure 28 : Schéma de principe de l'enrichissement des billes suivant l'étape de PCR en émulsion.** Les billes utilisées pendant la PCR en émulsion (« Capture Beads ») ont été lavées puis mises en contact avec des amorces biotinylées complémentaires aux adaptateurs A et B. Sur ce schéma sont représentées les billes sur lesquelles l'amplification a fonctionné - et donc sur lesquelles les amorces se sont hybridées (en vert) et celles pour lesquelles la réaction de PCR n'a pas eu lieu (en bleu). Tout d'abord, des billes d'enrichissement, recouvertes de streptavidine, sont ajoutées à cette solution. La streptavidine va alors former un complexe avec la biotine présente sur les amorces : les billes recouvertes d'ADN amplifié (en vert) vont être capturées par les billes d'enrichissement (en rouge). Grâce à un support magnétique, ces billes d'enrichissement métalliques vont retenir les « billes amplifiées » tandis que les billes sans ADN seront éliminées. Enfin, l'ajout de « Melt Solution », contenant de la soude (NaOH) va permettre la dénaturation des ADN simple-brins de leurs amorces biotinylées et l'élution des billes recouvertes d'ADN amplifié.

D'après : <http://cage.unl.edu/454%20Introduction.pdf>

Enfin, les amorces de séquençage A et B («Seq Primers A/B») sont ajoutés au milieu, et hybridées aux extrémités respectives des fragments. L'excès d'amorces est éliminé par une série de lavages. Le nombre de billes obtenues après l'enrichissement est alors estimé grâce au «GS Junior Bead Counter» (*Roche Diagnostics*) : il doit être compris entre 500 000 et 2 000 000 de billes pour obtenir un run de séquençage de bonne qualité (Figure 29).



**Figure 29 : Le «GS Junior emPCR Bead Counter» (Roche Diagnostics).** Le nombre de billes recommandé pour un Run de séquençage avec le GS Junior est d'environ 500 000 billes. Pour évaluer cette quantité de billes, le «GS Junior emPCR Bead Counter» possède une fenêtre représentant à son bord inférieur une quantité de 500 000 billes et à son bord extérieur une quantité de 2 000 000 de billes. Le nombre de billes après enrichissement doit se trouver au sein de cette fenêtre.

### 3.1.5.3. Préparation du run de séquençage

La réaction de séquençage est effectuée dans une plaque comportant des millions de puits, appelée la «PicoTiterPlate» (PTP) (*GS Junior PicoTiterPlate kit - Roche Diagnostics*) (Figure 30 A et B). Toutes les billes contenant un fragment d'ADN amplifié seront déposées dans les puits de cette plaque avec tous les réactifs nécessaires à la réaction de pyroséquençage.

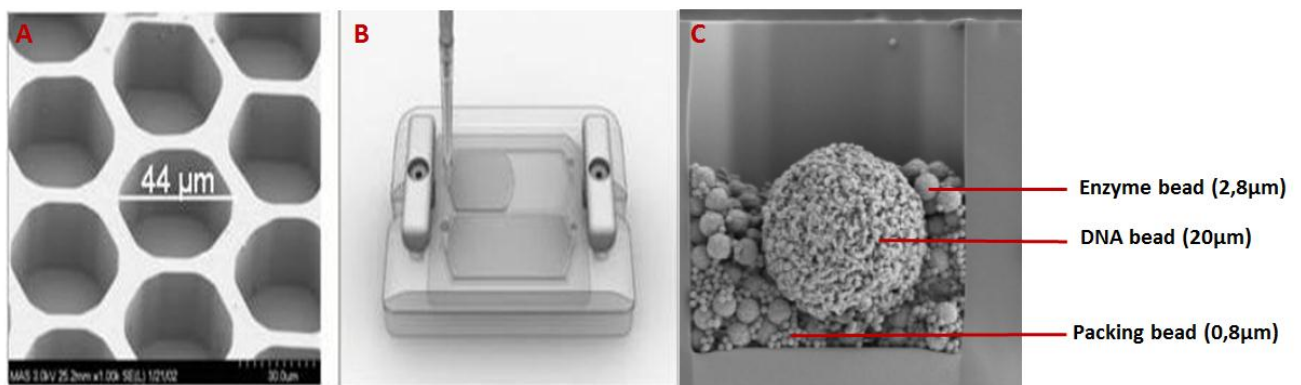
Pour cela, plusieurs éléments, contenus dans le «GS Junior Titanium Sequencing kit» (*Roche Diagnostics*), sont tout d'abord ajoutés au tube dans lequel se trouvent les billes d'ADN : les «Control Beads XLTF», recouvertes d'ADN de tailles et de séquences connues, vont servir de contrôle positif interne lors de la réaction. La polymérase permettra la synthèse des brins d'ADN. Enfin, les «Packing beads» serviront à combler le volume des puits de manière à ce qu'une seule bille aille dans un puits de la plaque.

Différentes couches de billes sont ensuite déposées dans la PTP dans l'ordre suivant (Figure 30 C):

-- Une 1ère couche d' «Enzyme beads», recouvertes des enzymes nécessaires à la réaction de pyroséquençage

- Les billes d'ADN préparées précédemment
- Une seconde couche d' «Enzyme Beads»
- Une couche de «PPIase Beads», permettant d'éviter les contaminations chimiques croisées entre les puits lors de la réaction de séquençage

Après retrait du surnageant, la PTP est alors chargée dans le GS Junior pour la réaction de séquençage.



**Figure 30 : Représentations macroscopique (B) et microscopiques (A et C) de la «PicoTiterPlate».** La *PicoTiterPlate* est une plaque contenant des milliers de puits microscopiques (A). Elle est fixée sur un support (*Bead Deposition Device*) lors du dépôt des couches successives des billes (B). La photographie au microscope électronique à balayage (MEB) montre en C un puits de la plaque contenant une «DNA Bead» couverte de séquences d'ADN, des «Enzyme Beads» contenant les enzymes nécessaires à la réaction de pyroséquençage et les «Packing beads», beaucoup plus petites, permettant le maintien de la «DNA Bead». Une couche supérieure de «PPIases beads», non représentée ici, sera ajoutée au-dessus de ces billes. D'après : <http://molbiol.ru/bio/001/001.html>

#### 3.1.5.4. Pyroséquençage

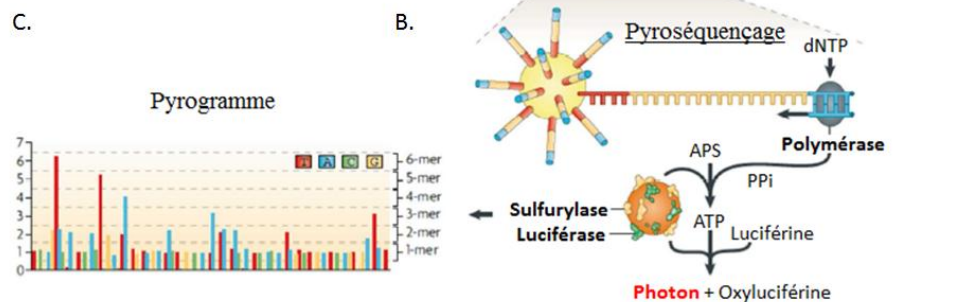
La réaction de pyroséquençage est réalisée dans le séquenceur à haut débit (*GS Junior, Technologie 454, Roche Diagnostics*) grâce au «GS Junior Titanium Sequencing kit» (*Roche Diagnostics*). Elle dure environ 6 heures et permet d'obtenir jusqu'à 900Mb de données bio-informatiques (126).

Lorsque l'un d'eux est incorporé au fragment d'ADN par la polymérase, un pyrophosphate inorganique (PPI) est libéré. Une première enzyme présente sur les «Enzyme beads», la sulfurylase, va alors transformer ce PPI en Adénosine triphosphate (ATP), en présence d'Adénosinephosphosulfate (APS). La seconde enzyme présente sur ces billes, la luciférine, va alors transformer en présence d'ATP de la luciférine en oxyluciférine et en photon (Figure 31). La quantité de photons émis dans un puits, proportionnelle à la quantité de dNTP incorporés, sera transcrite sur un diagramme appelé pyrogramme. La lecture informatique

de ce pyrogramme permettra de connaître toutes les séquences des fragments présents sur les «DNA beads».

Légende:

PTP : PicoTiterPlate  
 PPi : Pyrophosphate inorganique  
 APS : Adénosine Phosphosulfate  
 ATP : Adénosine triphosphate



**Figure 31 : Schéma de principe de la réaction de pyroséquençage.** Lors de la réaction, un flux de dNTP est déposé sur la PTP contenant les « DNA beads » obtenues lors de la PCR en émulsion. B. Lorsque le « bon » dNTP est déposé, il est incorporé au fragment d'ADN par la polymérase et provoque la libération d'un PPi. Les deux enzymes présentes sur l'« Enzyme bead » (orange) permettent alors la cascade enzymatique qui va transformer ce PPi en photon. C. L'émission de lumière, proportionnelle à la quantité de dNTP incorporés, sera alors mesurée et transcrite sur un pyrogramme. D'après : SENGENÈS, J. 2012. *Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN*. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

### 3.2. Détermination du statut de P53 et de PTEN par Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode qui permet la mise en évidence de constituants cellulaires protéiques pouvant être nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires. Le principe de la technique repose sur la formation d'un complexe anticorps-antigène spécifique, détecté par un anticorps secondaire couplé à un composé pouvant être intense. Les composés utilisés sont en général des enzymes ou des fluorophores. La technique est réalisée sur des coupes tissulaires de prélèvements inclus en paraffine.

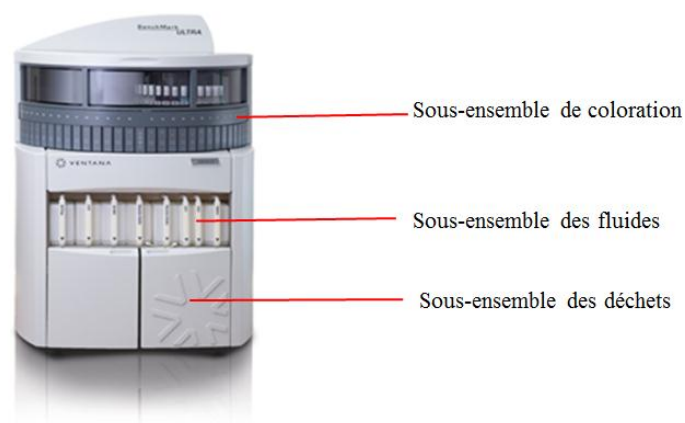
#### 3.2.1. Fabrication des lames d'Immunohistochimie

Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont effectuées au microtome (RM2235, Leica Biosystem, Nussloch, Allemagne) à partir des blocs tumoraux des patientes, fixées à l'AFA et incluses en paraffine. Déposées sur des lames, elles sont ensuite placées une nuit à l'étuve à 56 °C. Les lames peuvent être conservées ainsi pendant une semaine à 4°C.

### 3.2.2. Coloration immunohistochimique des lames

La révélation des protéines P53 et PTEN sur les coupes tissulaires tumorales est réalisée par immunohistochimie sur le BenchMark Ultra® (Ventana) (Figure 32). Le kit de révélation utilisé pour cette réaction dans l'automate est l'«UltraView Universal DAB Detection Kit»

(Ventana). Il est composé de tous les réactifs nécessaires à la réaction d'immunohistochimie en dehors de l'anticorps primaire. Dans ce kit, la révélation des protéines recherchées est de type enzymatique par l'action de la Peroxydase du Raifort (HRP- *Horse Radish Peroxydase*) (Figure 33). Les anticorps primaires utilisés pour la révélation des protéines P53 et PTEN sont respectivement les IgG de souris anti-humain *P53 DO-7* (Dako) et *PTEN D4.3* (Cell Signaling).



**Figure 32 : Photo de l'automate BenchMark Ultra®.** Cet automate, permettant la révélation de protéines par Immunohistochimie, est composé de trois zones principales : le sous-ensemble de coloration composé de 30 tiroirs à lames et du carrousel de réactifs contenant le kit de révélation (*UltraView*) ainsi que l'anticorps primaire utilisé sous forme de seringues – le sous ensemble des fluides composés des réactifs dits « consommables », utilisés pour toutes les réactions – et le sous-ensemble des déchets. D'après : <http://www.ventana.com/benchmarkultra>

La réaction d'immunohistochimie dans sa globalité se décompose en plusieurs étapes. Un conditionnement de la coupe en amont de la réaction est d'abord nécessaire. Il est composé de 2 étapes :

- Le déparaffinage et la réhydratation du tissu par ajout de solution «EZ Prep» (Ventana)
- Le démasquage antigénique - permettant aux antigènes de retrouver leur conformation protéique initiale et les rendant accessibles aux anticorps - par incubation de la lame dans un tampon à pH 8.4 contenant de l'EDTA, appelé «Cell Conditionner 1» (CC1). Pour la révélation des protéines P53 et PTEN, cette incubation dure 64 et 92 minutes, respectivement.

Vient alors la réaction révélation par le kit de détection «UltraView Universal DAB Detection Kit» (Ventana), réalisée par dépôts successifs de ces réactifs (Figure 33):

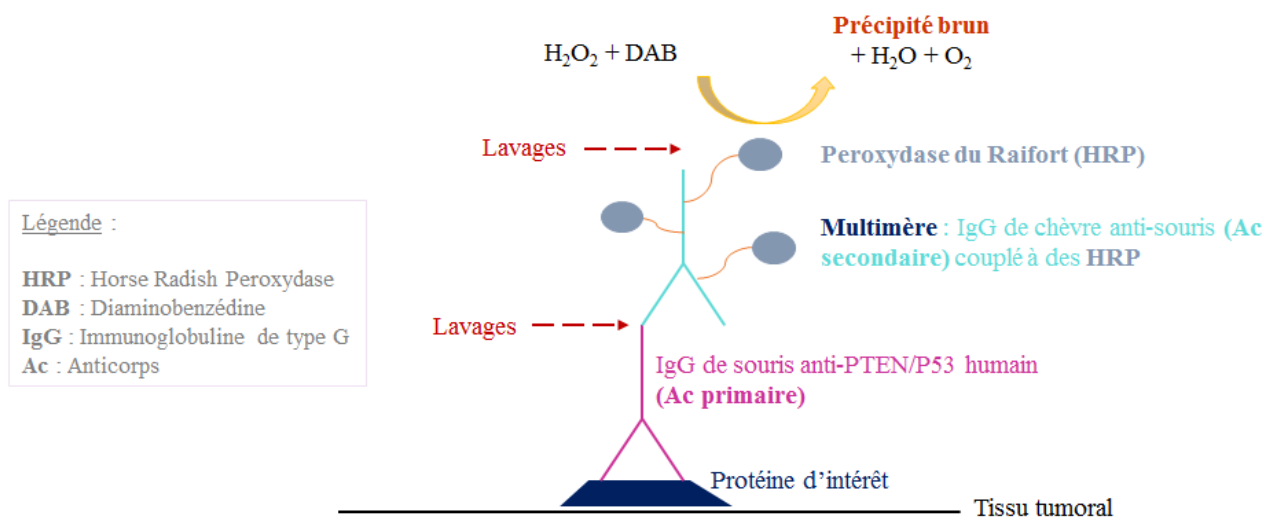


-- L'«Ultraview Inhibitor», solution contenant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), est déposée sur la coupe afin de bloquer les peroxydases endogènes qui pourraient parasiter le signal des peroxydases (exogènes) apportées lors de la réaction. Jouant le rôle de substrat de l'enzyme, l' $H_2O_2$  va être consommé par les enzymes endogènes qui seront alors inactives.

-- Les anticorps primaires anti-P53 ou anti-PTEN, préalablement dilués dans du «Antibody diluent» (*Ventana*) au  $1/50^{\text{ème}}$  et au  $1/125^{\text{ème}}$  respectivement, sont déposés sur les lames. Ils seront incubés 32 minutes à  $42^{\circ}C$  (P53) ou 1 heure à température ambiante (PTEN). Si les protéines respectives sont présentes sur la coupe, les anticorps vont alors s'y complexer.

-- La solution appelée «Ultraview Multimer Ig», contenant un anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-souris) couplé à la peroxydase du Raifort (HRP), ainsi que d'un bloqueur de protéines non spécifiques, est ensuite ajoutée. L'Anticorps secondaire couplé à la peroxydase va donc spécifiquement se fixer au fragment constant de l'anticorps primaire (IgG de souris).

-- Enfin, le substrat de l'enzyme, («Ultraview  $H_2O_2$ ») et le chromogène («Ultraview DAB Chromogen») vont être déposés sur la coupe, révélant par la formation d'un précipité rougeâtre la présence de la protéine recherchée.



**Figure 33 : Schéma de principe de la révélation immunohistochimique par l'« UltraView Universal DAB Detection Kit ».** La protéine d'intérêt est spécifiquement reconnue par l'anticorps primaire (une IgG de souris anti-P53 ou anti-PTEN humain). Des lavages sont effectués pour éliminer l'excès d'Ac primaire. Une protéine multimère, composée d'un Ac secondaire conjugué à plusieurs enzymes, des peroxydases du Raifort (HRP), va reconnaître cet Ac primaire et s'y fixer malgré les seconds lavages. Du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), substrat de la HRP, est alors déposé sur lame. Sa transformation par l'enzyme en eau ( $H_2O$ ) et en dioxygène ( $O_2$ ) va permettre l'oxydation du DAB en un précipité brun-rougeâtre. La présence de la protéine d'intérêt sur la coupe est alors détectée.

Enfin, une contre-coloration des lames à l'hématoxyline et au «bluing reagent» est effectuée afin de pouvoir observer en bleu pâle le tissu non intense. Les lames sont alors sorties de l'automate, lavées à l'eau savonneuse, déshydratées dans des bains d'alcool successifs (50%, 70%, 90% et 100%) puis placées dans du xylène. Sur les coupes seront alors protégées par des lamelles collées.

### 3.2.3. Lecture des lames

Les lames sont lues par un médecin anatomopathologiste de l'ICL, qui évalue le marquage des cellules tumorales au microscope optique à différents grossissements (x10, x20 et x40). Un témoin positif, correspondant à une coupe tumorale dont on sait qu'elle exprime la protéine recherchée, est ajouté à la série de lames patientes. Si ce témoin n'est pas coloré, la série ne peut être lue. La spécificité de la coloration doit également être vérifiée : la coloration de la protéine P53 sera nucléaire alors que celle de PTEN devra être cytoplasmique.

## 4. Méthodes statistiques

Les variables quantitatives sont décrites avec la moyenne, l'écart-type et de la gamme tandis que les variables qualitatives décrites par la fréquence et le pourcentage.

L'association entre surexpression de P53, perte d'expression de PTEN, mutations de *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* et *MET*, et l'âge des patientes, le stade FIGO, la chimiosensibilité aux sels de platine (définie par un intervalle supérieur à 6 mois d'absence de progression de la maladie) est analysée par le test de  $\chi^2$  ou le test exact de Fisher. La survie sans progression (SSP) est définie par l'intervalle entre la fin du traitement initial et la première rechute de la maladie, diagnostiquée soit par des données d'imagerie soit par l'augmentation du niveau CA 125 d'un facteur 2 en espacé d'un mois. Les patientes vivantes et sans rechute sont censurées au moment du dernier suivi. La survie globale (SG) est définie par l'intervalle entre la fin du traitement initial et le décès (toutes causes). Toutes les causes de décès sont considérées comme des échecs. Les courbes de SSP et SG en fonction de l'état de l'expression de P53 et PTEN et le statut mutationnel ont été établies en utilisant une régression logistique.

Le SSP et SG ont été décrits avec la méthode de Kaplan Meier. Les résultats sont décrits en fréquence cumulative et l'intervalle de confiance de 95%.

Pour chaque résultat, les facteurs pronostiques ont été testés avec le modèle des risques proportionnels de Cox en analyse univariée. Les paramètres avec une valeur p inférieure à 0,1 ont été introduits dans un modèle de Cox à risques proportionnels multivariée avec sélection progressive (avec un niveau d'effets à 0,1 entrant d'importance et pour éliminer les effets à 0,05).

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SAS version 9.3 (SAS, Cary, NC, USA).



Le niveau de signification a été fixé à 0,05.

## D. RESULTATS

### 1. Caractéristiques des patientes

Cinquante-trois patientes atteintes d'un carcinome ovarien de haut-grade ont finalement été incluses dans cette étude. Les caractéristiques clinico-pathologiques de la population générale et celle du sous-type séreux (45 patientes) sont résumées dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Caractéristiques clinico-pathologiques des patientes.**

	Population générale	Population du sous-type séreux
	Nombre (pourcentage)	Nombre (pourcentage)
Nombre des patientes	53	45
Âge Moyen		
Année (écart-type)	58.9 (11.5)	59.1 (12.1)
Intervalle	25-87	25-87
Antécédents familiaux		
Oui	21 (40%)	19 (42%)
Non	32 (60%)	26 (58%)
Antécédents personnels		
Oui	7 (13%)	7 (16%)
Non	46 (87%)	38 (84%)
Consultation oncogénétique		
Oui	19 (36%)	17 (38%)
Non	34 (64%)	28 (62%)
Mutation de <i>BRCA</i>	(n= 19)	(n= 17)
Pas de mutation	12 (63%)	10 (52%)
BRCA 1+	5 (26%)	5 (29%)
BRCA 2+	2 (11%)	2 (12%)
Stade		
I-II	11 (21%)	5 (11%)
III-IV	42 (79%)	40 (89%)
Histologie		
Séreux	45 (85%)	
Nonséreux <sup>1</sup>	8 (15%)	
Modalité chirurgicale		
Cytoréduction primaire	44 (83%)	36 (80%)
Chimiothérapie néoadjuvante	9 (17%)	9 (20%)
Résultat chirurgical		
Complète	28 (53%)	21 (47%)
Non complète	25 (47%)	24 (53%)
Régime de chimiothérapie adjuvante		
Carboplatine monothérapie	9 (17%)	8 (18%)
carboplatine/Paclitaxel	37(70%)	31 (69%)
carboplatine/Paclitaxel plus Bevacizumab	7 (13%)	6 (13%)
Chimiosensibilité aux sels de platine		
Sensible <sup>2</sup>	38 (72%)	31 (69%)
Résistante <sup>3</sup>	15 (28%)	14 (31%)

<sup>1</sup> quatre carcinomes endométrioides, 3 carcinomes à cellules claires et 1 non déterminé; <sup>2</sup> intervalle entre la dernière cure de chimiothérapie et progression de la maladie > 6 mois; <sup>3</sup> intervalle entre la dernière cure de chimiothérapie et progression de la maladie < 6 mois.

La majorité des patientes présentait une tumeur de stade avancé (stade III-IV : 79%) et un sous-type histologique séreux (85%). Sept mutations germinales de *BRCA* (5 avec mutations des gènes *BRCA 1* et 2 avec mutations du gène *BRCA2*) ont été trouvées chez 19 patientes ayant subi une consultation oncogénétique et un test oncogénétique sur la base d'antécédents familiaux et/ou personnels de cancer de l'ovaire / sein, toutes présentant un carcinome de sous-type séreux. Les traitements primaires ont été accomplis chez toutes les patientes combinant la chirurgie et la chimiothérapie par 5 à 8 cures à base de sels de platine.

## 2. Analyse des mutations somatiques

### 2.1 Dosage des ADN extraits

Les concentrations en ADN sont situées entre 32.8 ng/μL et 1172.5 ng/μL avec une moyenne de 290 ng/μL (Tableau 6). Les ratios des absorbances  $A_{260nm}/A_{280nm}$  sont tous compris entre 1.8 et 2. Ces résultats témoignent d'une extraction d'ADN de bonne qualité, non contaminée par des ARN ou des protéines.

### 2.2 Recherche de mutations par PCR-HRM

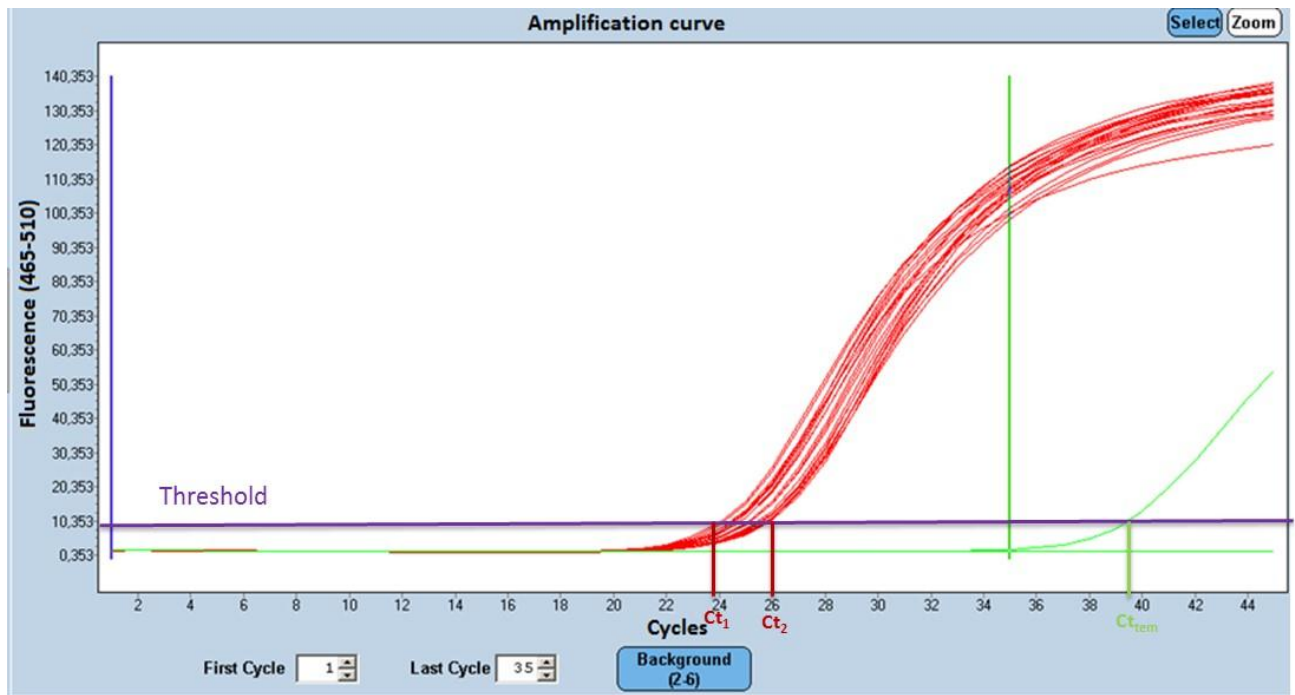
Les résultats des recherches de mutations par PCR HRM sont interprétés grâce à l'inclusion d'un témoin muté et d'un témoin non muté dans chaque manipulation. Avant chaque analyse de courbe HRM (High Resolution Melting), l'amplification des échantillons par PCR est évaluée grâce à la valeur du Cycle Threshold (Ct – Cycle seuil) renseigné sur la courbe de PCR en temps réel (Figure 34). Si le Ct est supérieur à 35 cycles, les résultats de l'étape d'HRM qui a suivi l'amplification ne peuvent être interprétés.

Lors de l'amplification par PCR en temps-réel des gènes à analyser, tous les Ct obtenus sont en-dessous de 35 cycles. Toutes les courbes HRM des témoins muté et non muté sont bien distinctes entre elles. Les résultats sont donc tous interprétables.

Sur les 53 tumeurs de l'ovaire analysées par cette technique, deux mutations du gène *NRAS* exon 3 et deux mutations du gène *PIK3CA* exon 21 ont été retrouvées (Figure 35) (Tableau 7 A). Aucune mutation des gènes *KRAS* et *BRAF* n'a été retrouvée. Tous les profils des courbes HRM pour les exons 2, 3 et 4 du gène *KRAS* et pour l'exon 15 du gène *BRAF* sont très similaires au profil du témoin «non muté» (Figure 36). Aucune mutation des exons 2 et 4 du gène *NRAS* et aucune mutation de l'exon 10 du gène *PIK3CA* n'a été retrouvée.

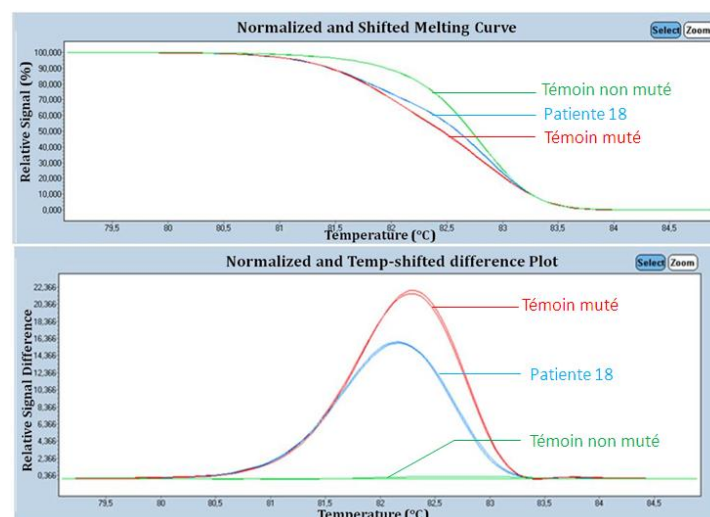
**Tableau 6 : Pourcentages de cellules tumorales estimés sur les coupes histologiques des prélèvements et concentrations d'ADN obtenues après extraction de ces tissus.**

Patientes	Sous-type histologique de la tumeur	Pourcentage de cellules tumorales estimé sur la coupe histologique	Concentration d'ADN (ng/ $\mu$ L) mesurée après extraction depuis le tissu
Patiente 1	Carcinome séreux	80%	222,5
Patiente 2	Carcinome séreux	60%	142,0
Patiente 3	Carcinome séreux	80%	181,0
Patiente 4	Carcinome séreux	80%	128,8
Patiente 5	Carcinome séreux	80%	332,0
Patiente 6	Carcinome séreux	90%	385,8
Patiente 7	Carcinome séreux	60%	221,8
Patiente 8	Carcinome séreux	80%	332,0
Patiente 9	Carcinome séreux	90%	53,3
Patiente 10	Carcinome séreux	90%	84,5
Patiente 11	Carcinome endométriode	40%	32,8
Patiente 12	Carcinome séreux	90%	34,5
Patiente 13	Carcinome séreux	30%	84,0
Patiente 14	Carcinome endométriode	70%	120,0
Patiente 15	Carcinome séreux	60%	365,8
Patiente 16	Carcinome séreux	50%	170,5
Patiente 17	Carcinome séreux	80%	466,8
Patiente 18	Carcinome séreux	20%	314,5
Patiente 19	Carcinome séreux	70%	338,3
Patiente 20	Carcinome séreux	60%	383,0
Patiente 21	Carcinome séreux	30%	94,3
Patiente 22	Carcinome séreux	60%	252,0
Patiente 23	Carcinome séreux	80%	542,5
Patiente 24	Carcinome séreux	90%	416,5
Patiente 25	Carcinome séreux	60%	293,0
Patiente 26	Carcinome séreux	90%	327,0
Patiente 27	Carcinome séreux	20%	135,5
Patiente 28	Carcinome séreux	80%	223,3
Patiente 29	Carcinome à cellules claires	50%	85,8
Patiente 30	Carcinome séreux	80%	225,5
Patiente 31	Carcinome séreux	60%	423,3
Patiente 32	Carcinome séreux	80%	543,0
Patiente 33	Carcinome séreux	50%	391,3
Patiente 34	Carcinome séreux	30%	168,3
Patiente 35	Carcinome séreux	50%	248,5
Patiente 36	Carcinome à cellules claires	40%	343,5
Patiente 37	Carcinome séreux	60%	192,3
Patiente 38	Carcinome séreux	80%	298,3
Patiente 39	Carcinome séreux	30%	199,5
Patiente 40	Carcinome séreux	80%	313,0
Patiente 41	Carcinome endométriode	80%	352,5
Patiente 42	Carcinome séreux	90%	275,5
Patiente 43	Carcinome séreux	30%	206,0
Patiente 44	Carcinome séreux	20%	193,3
Patiente 45	Carcinome séreux	30%	329,8
Patiente 46	Carcinome séreux	60%	333,0
Patiente 47	Carcinome séreux	70%	278,3
Patiente 48	Carcinome à cellules claires	10%	161,0
Patiente 49	Carcinome séreux	60%	620,3
Patiente 50	Carcinome indifférencié	40%	205,3
Patiente 51	Carcinome séreux	40%	1172,5
Patiente 52	Carcinome à cellules claires	50%	456,8
Patiente 53	Carcinome séreux	40%	698,8



**Figure 34 : Détermination du Cycle Threshold (Ct) sur les courbes de PCR en temps réel.**

Avant l'étape de la PCR-HRM est réalisée une étape de PCR en temps réel, afin d'amplifier l'exon voulu. Le logiciel «480 Light Cycler SW 1.5» permet une analyse de la courbe d'amplification : le seuil (*Threshold*) est une ligne de base définie par le logiciel à partir de laquelle la fluorescence n'est plus considérée comme du bruit de fond. Le Ct (*Cycle Threshold*) correspond au cycle de PCR pour lequel la courbe d'amplification coupe le seuil. En rouge sont représentées les courbes pour lesquelles le Ct est inférieur à 35 cycles (les échantillons amplifiés) et en vert la courbe pour laquelle le Ct est supérieur à 35 cycles (le blanc). Ici, les Ct des échantillons sont tous situés entre le Ct<sub>1</sub> (23.9) et le Ct<sub>2</sub> (26).

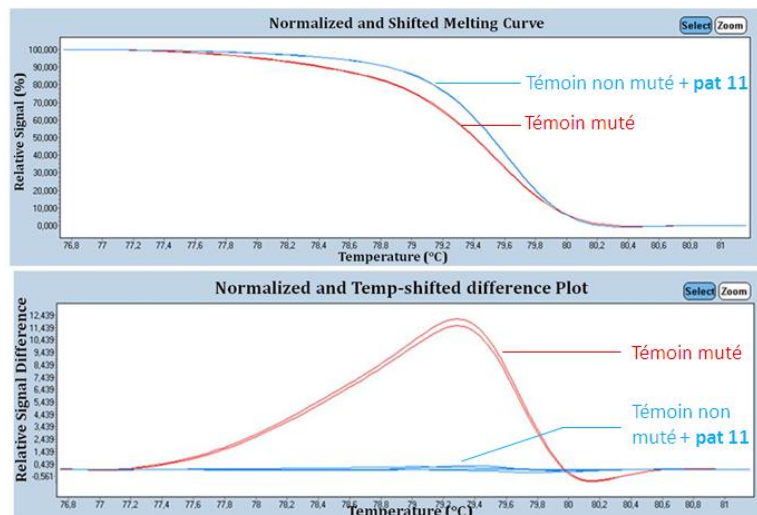


**Figure 35 : Exemple d'une analyse par PCR HRM chez une patiente mutée pour l'exon 3 du gène NRAS.** Les profils des courbes HRM du gène NRAS exon 3 pour la tumeur 16 sont similaires aux profils du témoin muté. Cette tumeur présente donc une mutation pour cet exon.

**Tableau 7 : Analyse de mutations somatiques par PCR-HRM et séquençage haut-débit.**

	(A) PCR-HRM		(B) séquençage haut-débit					Signification clinique <sup>4</sup>
	exon	Nombre de tumeurs	exon	c.	p.	Nombre de tumeurs	Fréquence d'allèles mutés (%)	
<i>KRAS</i> <sup>1</sup>			2	35 G>T	G12V	1	40.8	Pathogénique
<i>NRAS</i> <sup>1</sup>	3	2	3	181 C>A	Q61K	2	24.7/24.1	Pathogénique
<i>PIK3CA</i> <sup>2</sup>	21	2	21	3140 A>G	H1047R	1	41.7	Pathogénique
				3139 C>T	H1047Y	1	37.4	Pathogénique
			10	1571 G>A	R524K	3	15.7/17.1/5.0	Mutation missense, incertaine
			5	1037 T>A	L346Q	1	60.3	Nouvelle mutation identifiée
<i>MET</i> <sup>3</sup>			14	2962 C>T	R988C	1	65.3	Mutation missense, incertaine
				3029 C>T	T1010I	3	45.1/82.8/58.7	Mutation missense, incertaine
			18	3619 G>A	A1207T	1	32.9	Nouvelle mutation identifiée

1, basée sur des résultats 100% négatif obtenus par PCR, seulement 28 tumeurs des 53 tumeurs ont été analysées par séquençage haut-débit; 2, les mutations de *PIK3CA* exon 5 ont été uniquement analysées par séquençage haut-débit; 3, les mutations de *MET* ont été uniquement analysées par séquençage haut-débit; 4, bases de données "ensembl" (<http://www.ensembl.org/index.html>)



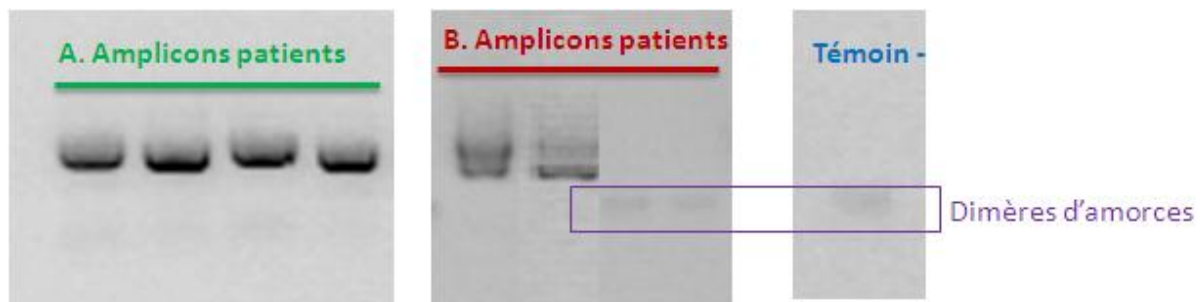
**Figure 36 : Exemple d’une analyse par PCR-HRM pour une tumeur non mutée pour le gène recherché.** Les profils des courbes HRM du gène *KRAS* exon 2 pour la patiente 10 sont identiques aux profils du témoin non muté. Cette tumeur ne présente donc pas de mutation pour cet exon.

## 2.3 Recherche de mutations par séquençage haut-débit

Trois « run de séquençage » sont effectués pour cette analyse : un premier run pour l’analyse des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* chez les 25 premières tumeurs et un second pour l’analyse des gènes *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* chez les autres 25 ainsi que du gène *NRAS* exon 3 chez la tumeur 28 retrouvée mutée pour cet exon par PCR HRM et un troisième pour l’analyse des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* chez les 3 dernières tumeurs.

**2.3.1 Préparation de la librairie : vérification de la qualité et de la quantité des amplicons**  
Après amplification des exons et identification des patientes par les PCR «TAG» et «MID», la qualité des amplicons obtenus est contrôlée par migration sur gel d’agarose. La révélation par les UV doit montrer, pour les échantillons extraits des tumeurs, une belle bande non fragmentée (Figure 37). Pour le témoin négatif (mix de PCR) ne doit apparaître qu’une légère bande correspondant aux dimères d’amorces. Si la qualité de l’amplicon est mauvaise, il est nécessaire de recommencer l’amplification de la séquence cible afin d’obtenir une meilleur qualité pour cet amplicon.

Après purification des amplicons, la quantité d’amplicons obtenue est renseignée par le dosage au picogreen. Si la concentration d’amplicons est trop basse voire nulle, cela signifie que l’ADN a été perdu lors des purifications. Lors du 1er run de séquençage, un amplicon a été perdu lors de cette étape. Une nouvelle amplification de cet exon est donc réalisée lors de la préparation de la librairie du 2<sup>ème</sup> run de séquençage. Lors du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> run, aucun amplicon n’a été perdu lors des purifications.



**Figure 37 : Exemples de contrôle d'amplicons par migration sur gel d'agarose.** A. Amplicons patients de bonne qualité : la révélation aux UV montre une belle bande nette ; B : Amplicons tumeur de mauvaise qualité : Bandes fragmentées ou bandes inexistantes. L'amplification de ces exons doit être recommencée. Le témoin négatif montre une légère bande avec des dimères d'amorce mais pas d'amplification d'ADN : la PCR est validée.

### 2.3.2 Résultat de l'enrichissement sur billes

Suite à la PCR en émulsion (emPCR), un enrichissement des billes recouvertes d'amplicons est réalisé. Le taux d'enrichissement est alors estimé à l'aide du « GS Bead Counter » (cf Figure 29). Lors du premier run de séquençage, le nombre de billes était proche de 2 000 000. Lors du second et troisième run, ce nombre était estimé à 500 000 billes. Les taux d'enrichissements étaient donc bien conformes aux recommandations pour les 3 runs de séquençage.

### 2.3.3 Qualité globale des Runs de séquençage

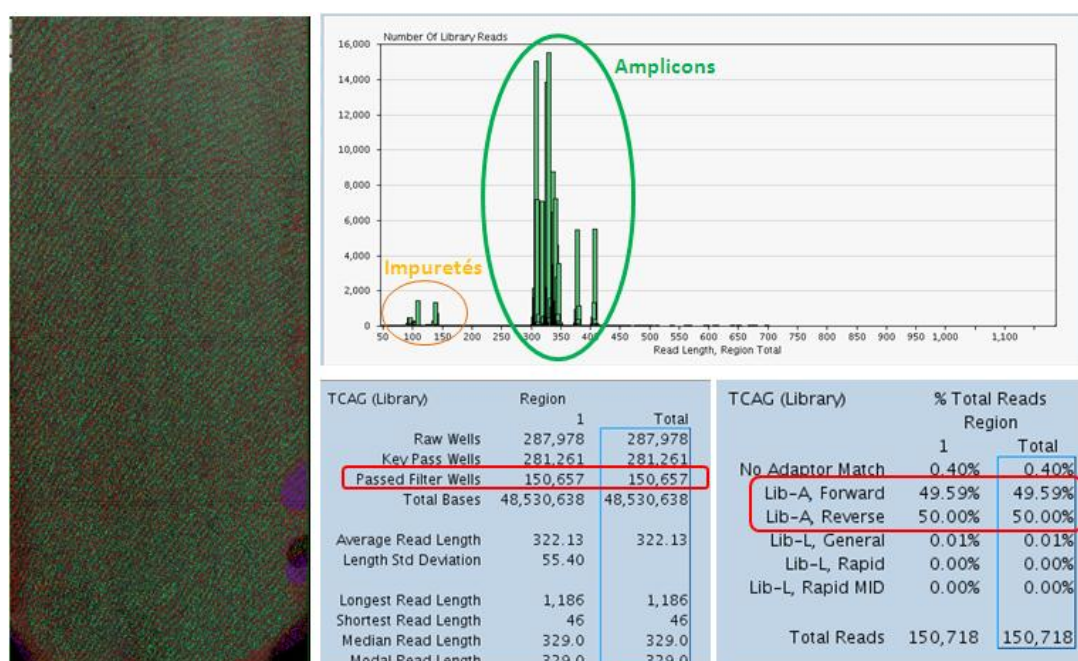
A la fin de l'analyse par le séquenceur, plusieurs paramètres sont observés afin de déterminer la qualité globale du run (Figure 38). Le nombre de puits dont la séquence a été lue entièrement par l'appareil est tout d'abord constaté : il est de 150 657 lors du 1er run et de 148 206 lors du second run. Ensuite, la répartition des séquences selon le nombre de paires de bases est considérée : les séquences à 100-150pb correspondent à des impuretés telles que des amplifications incomplètes ou des amorces non consommées. Leur nombre doit donc être limité. Enfin, le pourcentage de séquences lues en sens *forward* et celui des séquences lues en sens *reverse* doit être à peu près équivalent. Pour le 1er run, des pourcentages de 49.59% et 50% ont été respectivement obtenus. Pour le 2nd run, des résultats de 46% (F) et 54% (R) montrent que lors de l'étape d'emPCR, l'amplification dans le sens «*reverse*» a été plus efficace que celle dans le sens «*forward*».

### 2.3.4 Analyse des mutations par séquençage

L'analyse des données de séquençage est effectuée par le logiciel «GS Amplicon Variant Analyser». Les variants détectés par le logiciel sont alors triés selon deux critères principaux : leur couverture, c'est-à-dire le nombre de fois où la séquence nucléotidique en question (sous sa forme mutée et sauvage) a été lue, et la «Fréquence d'allèles mutés» (*Frequency of Mutated Alleles - FMA*), correspondant à la fréquence de la séquence mutée sur les



séquences totales (mutées et sauvages). Pour l'interprétation des résultats, seuls les variants affichant une FMA de plus de 5% ainsi qu'une couverture de minimum 300 « reads » seront considérés.

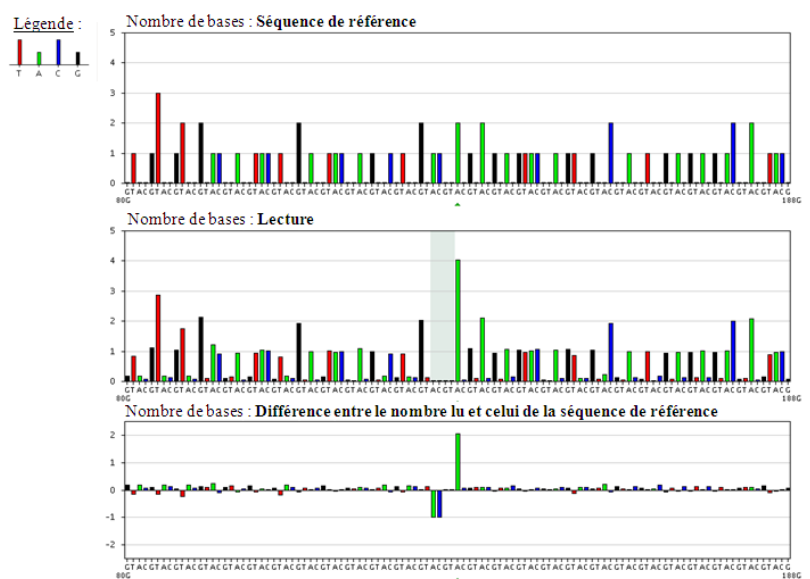


**Figure 38 : Paramètres qualitatifs du 1er run de séquençage.** La qualité globale de l'analyse est observée à l'aide du logiciel «GS Run Browser». A gauche la photo montre le nombre de puits de la PicoTiterPlate lus (en vert) contre le nombre de puits non lus (en rouge). Le diagramme en bâton (en haut) montre le nombre de séquences lues en fonction du nombre de paires de bases des séquences. Enfin, les données chiffrées indiquent notamment le nombre de puits pour lequel l'automate a réussi à lire la séquence (150 657 puits) ainsi que le pourcentage de séquences lues en sens *forward* et *reverse*.

Parmi les 53 tumeurs analysées, 14 (26%) présentent une mutation parmi les gènes recherchés (Tableau 7B). Aucune mutation du gène *BRAF* n'a été retrouvée par cette technique dans des échantillons de tumeurs. Neuf mutations différentes ont été retrouvées au sein des gènes *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* et *MET* (Tableau 7B) : une mutation des gènes *KRAS* et *NRAS*, 4 mutations du gène *PIK3CA* et 3 mutations du gène *MET*. Les 4 carcinomes de carcinome à cellules claires présentent une mutation : une mutation du gène *KRAS* et trois mutations du gène *PIK3CA*. Toutes les mutations des gènes *NRAS* et *MET* ont été trouvées dans les tumeurs séreuse (Annexe 7). Aucun carcinome endométrioïde ne présente de mutation.

La mutation du gène *NRAS* est une substitution faux-sens dans l'exon 3 du gène d'une cytosine par une adénine (c.181C>A) (Figure 39) et entraîne le changement d'une glutamine en lysine dans la séquence protéique (p.Q61K). Elle a été retrouvée chez 2 tumeurs (Tableau 7B).





**Figure 39 : Pyrogrammes de la séquence mutée c.181C>A du gène *NRAS* chez la tumeur 28.** Les pyrogrammes montrent l'intensité lumineuse détectée à chaque insertion de base nucléotidique. Trois pyrogrammes sont représentés : le 1<sup>er</sup> est un pyrogramme théorique représentant la séquence de référence - le 2<sup>nd</sup> montre la séquence réellement lue par l'automate chez la patiente 28 – le 3<sup>ème</sup> montre la différence entre les deux séquences. Ici, la succession d'une adénine et d'une guanine dans la séquence de référence a été remplacée par la succession de 2 adénines.

Toutes les autres mutations détectées sont également des substitutions faux-sens. Elles touchent l'exon 2 du gène *KRAS* (1 tumeur), les exons 5 (1 tumeur), 10 (3 tumeurs) et 21 (2 tumeurs) du gène *PIK3CA*, et les exons 14 (4 tumeurs) et 18 (1 tumeur) du gène *MET*. Le détail de ces mutations est spécifié dans le tableau 7B.

Aucune tumeur ne présente plusieurs mutations simultanées pour les gènes analysés.

### 3. Analyse de l'expression tissulaire des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie (IHC)

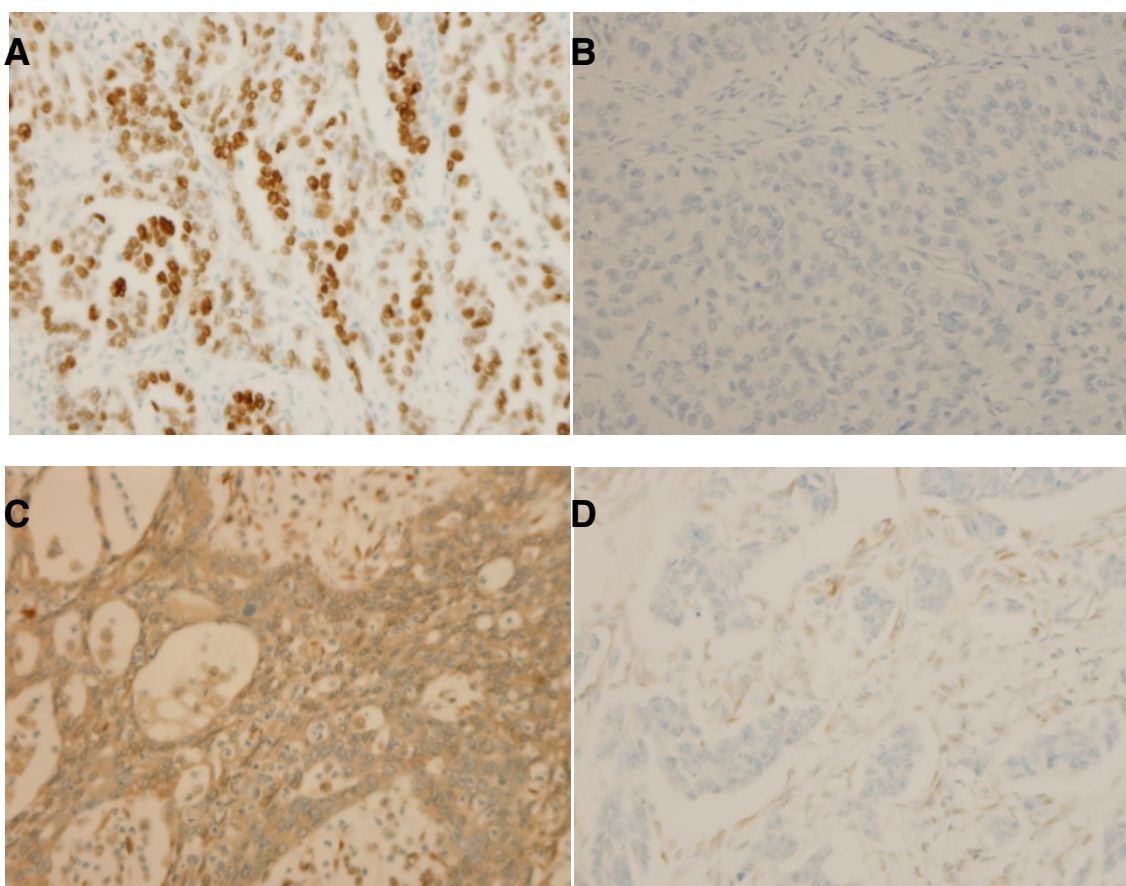
#### 3.1 Etude de l'expression de la protéine P53

Le marquage de la protéine P53, de couleur brune, est un marquage nucléaire retrouvé au niveau des cellules tumorales. L'épitope reconnu par l'anticorps anti-P53 (clone DO-7) est localisé entre les acides-aminés 1 et 45 (côté N-terminal) de la protéine, présent à la fois sur la protéine P53 sauvage et mutée (127).

Parmi les 53 lames d'immunohistochimie analysées, 32 (60%) présentent une surexpression nucléaire de la protéine P53 au niveau des cellules tumorales, d'une manière diffuse et intense (Figure 40 A). Vingt-et-une (40%) présentent une absence complète de la protéine P53 (Figure 40 B). Parmi les 32 tumeurs sur-exprimant la protéine, 30 sont de type histologique séreux soit 67% de toutes les tumeurs séreuses.

#### 3.2 Etude de l'expression de la protéine PTEN

Le marquage de la protéine PTEN, brun clair, est un marquage cytoplasmique retrouvé systématiquement au niveau des cellules stromales (témoin interne) ainsi que sur les cellules tumorales ne présentant pas de mutation du gène (Figure 40C). L'épitope reconnu par l'anticorps anti-PTEN (clone D4.3) correspond aux résidus d'acides aminés situés dans la séquence carboxy-terminale de la protéine. Lorsque le gène *PTEN* est muté, une perte d'expression de la protéine correspondante est alors observée au niveau des cellules tumorales (Figure 40D).



**Figure 40 : Analyse de l'expression tissulaire des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie (IHC) (X20).** (A) Expression positive de P53: marquage nucléaire diffuse et intensif; (B) Expression négative de P53: absence complète de marquage nucléaire. (C) Expression positive de PTEN: intensité de marquage cytoplasmique des cellules tumorales est comparable avec celle des cellules stromales jouant comme un témoin interne; (D) Perte d'expression de PTEN: absence complète de marquage cytoplasmique.

Parmi les 53 lames d'immunohistochimie analysées, sept lames avec un marquage négatif de PTEN du cytoplasme des cellules stromales sont considérées comme échec de réaction d'IHC et donc sont non interprétables dont 6 sont de type histologique séreux. Parmi les 46 lames interprétables, 19 (41%) présentent une perte d'expression de la protéine PTEN. Parmi ces 19 tumeurs, 15 sont de type histologique séreux faisant 38% des tumeurs séreuses interprétables.

En tout, 39 tumeurs (74%) présentent au moins l'une des deux altérations protéiques recherchées et 12 tumeurs (23%) présentent à la fois une surexpression de P53 et une perte d'expression de PTEN.

### 3.3 Analyse statistique d'association de l'expression des protéines P53, PTEN et les caractéristiques clinico-pathologiques

L'analyse statistique n'a été réalisée que chez le sous-groupe de carcinomes séreux en raison de l'objectif. La surexpression de P53 a été trouvée dans 30 des 45 tumeurs (67%) et la perte d'expression de PTEN dans 15 des 39 tumeurs (38%). Six tumeurs avec un marquage négatif de PTEN du cytoplasme des cellules stromales sont considérées comme échec de réaction d'IHC et donc sont non interprétables et sont exclues pour l'analyse statistique. La surexpression de P53 a été trouvée associée à la chimiosensibilité des sels de platine. Aucune autre caractéristique clinico-pathologique n'a été trouvée associée avec la surexpression de P53 et aucune caractéristique clinico-pathologique n'a été trouvée associée avec la perte d'expression de PTEN (Tableau 8).

**Tableau 8 : Association entre l'expression de P53 et PTEN\* et les caractéristiques clinico-pathologiques.**

	P53+	P53-	P	PTEN+	PTEN-	P
Expression, n (%)	30 (67%)	15 (33%)		24 (62%)	15 (38%)	
Age, n (%)						
< 59	17 (57%)	7 (47%)		14 (58%)	7 (47%)	
> 59	13 (43%)	8 (53%)	0.546	10 (42%)	8 (53%)	0.525
FIGO stage						
I-II	3 (10%)	2 (13%)		3 (13%)	1 (7%)	
III-IV	27 (90%)	13 (87%)	1.000	21 (87%)	14 (93%)	1.000
Response to platinum-based chemotherapy, n (%)						
sensitive	24 (80%)	7 (47%)		15 (63%)	10 (67%)	
resistant	6 (20%)	8 (53%)	0.0393	9 (37%)	5 (33%)	1.000

\* 39 tumors sont disponibles pour l'interprétation de l'expression de PTEN

#### 4. Analyse statistique des survies

Cette analyse a été réalisée chez le sous-groupe de 45 patientes atteintes d'un carcinome séreux à cause de l'objectif insuffisant des autres sous-types histologiques. La médiane de suivi était de 38 mois (intervalle 6-93). Au moment du dernier suivi, 35 patientes ont eu des rechutes de la maladie et 25 patientes sont décédées. La survie sans progression (SSP) à deux ans était 28% [16%; 42%] et la survie globale (SG) à 5 ans était 37% [21%; 53%].

##### 4.1 Analyse statistique de la survie sans progression (SSP)

Dans l'analyse univariée, le résidu tumoral post-opératoire a été identifié comme un facteur prédictif de SSP plus courte avec un «*Hazard Ratio*» (HR) et un intervalle de confiance à 95% (95% CI) de 2.134 [1.080 ; 4.214] et la surexpression de la protéine P53 a été identifiée comme un facteur prédictif de SSP plus longue (HR and 95% CI : 0.440 [0.216 ; 0.894]) (Tableau 9A). Il y avait une tendance à plus longue de SSP chez les patientes appartenant au sous-groupe avec antécédents personnels de cancer du sein (HR et 95% CI: 0.319 [0.097; 1.045]) ou avec une mutation germinale des gènes BRCA 1/2 (HR and 95% CI: 0.321 [0.098; 1.054]) (Tableau 9A). Dans l'analyse multivariée, la surexpression de la protéine P53 restait associée significativement avec une plus longue SSP (HR et 95% CI: 0.351[0.167; 0.739]) (Tableau 9A).

##### 4.2 Analyse statistique de la survie globale (SG)

Dans l'analyse univariée, aucun facteur prédictif de la SG n'a été identifié cependant une tendance à une SG plus longue a été constatée chez les patientes atteintes d'une tumeur surexprimant la protéine P53 (HR et 95% CI : 0.450 [0.195; 1.041]) (Tableau 9B). Dans l'analyse multivariée, la surexpression de la protéine P53 (HR et 95% CI: 0.269 [0.102; 0.708]) et les antécédents personnels de cancer du sein (HR et 95% CI: 0.168 [0.035; 0.809]) ont été identifiés comme facteurs prédictifs d'une SG plus longue (Tableau 9B).

**Tableau 9 : Facteurs pronostiques de la survie sans progression (SSP) (A) et la survie globale (SG) (B).**

<b>A</b>				
Variant	Analyse univariée		Analyse multivariée	
	HR et 95% CI	<i>P</i>	HR et 95% CI	<i>P</i>
Âge (ans)				
< 59	1			
> 59	1.564 [0.803 ; 3.045]	0.1888		
Antécédents familiaux <sup>1</sup>				
Non	1			
Oui	0.984 [0.499 ; 1.942]	0.9632		
Antécédents personnels <sup>2</sup>				
Non	1		1	
Oui	0.319 [0.097 ; 1.045]	<b>0.0592</b>	0.261[0.078;0.869]	0.0286
Mutation de BRCA <sup>3</sup>				
Non	1			
Oui	0.321 [0.098; 1.054]	<b>0.0610</b>		
Stade				
I+II	1			
III+IV	2.030 [0.616 ; 6.687]	0.2443		
Modalité de chirurgie				
Chirurgie première	1			
Chirurgie d'intervalle	1.962 [0.876 ; 4.395]	0.1014		
Résidu tumoral post-opératoire				
Complète	1		1	
Non complète	2.134 [1.080 ; 4.214]	<b>0.00291</b>	2.127[1.056;4.286]	0.0346
Chimiothérapie avec Bevacizumab				
Non	1			
Oui	1.105 [0.426 ; 2.870]	0.8372		
Surexpression de P53				
Non	1		1	
Oui	0.440 [0.216 ; 0.894]	<b>0.0233</b>	0.351[0.167;0.739]	0.0058
Perte d'expression de PTEN				
Non	1			
oui	0.886 [0.426 ; 1.841]	0.7452		
Statut mutationnel <sup>4</sup>				
Non	1			
oui	0.763 [0.331 ; 1.758]	0.5259		

<b>B</b>				
Variant	Analyse univariée		Analyse multivariée	
	HR et 95% CI	P	HR et 95% CI	P
Âge (ans)				
< 59	1			
> 59	1.524 [0.690; 3.369]	0.2974		
Antécédents familiaux <sup>1</sup>				
Non	1			
Oui	0.876 [0.393 ; 1.954]	0.7463		
Antécédents personnels <sup>2</sup>				
Non	1		1	
Oui	0.299 [0.069 ; 1.284]	0.1043	0.168[0.035;0.809]	0.0261
Mutation de BRCA <sup>3</sup>				
Non	1			
Oui	0.186 [0.025 ; 1.382]	0.1002		
Stade				
I+II	1			
III+IV	3.933 [0.530 ; 29.158]	0.1804		
Modalité de chirurgie				
Chirurgie première	1			
Chirurgie d'intervalle	1.440 [0.480 ; 4.318]	0.5155		
Résidu tumoral post-opératoire				
Complète	1		1	
Non complète	1.983 [0.885 ; 4.442]	0.0961	2.127[1.056;4.286]	0.0346
Chimiothérapie avec Bevacizumab				
Non	1			
Oui	0.739 [0.216 ; 2.533]	0.6308		
Surexpression de P53				
Non	1		1	
Oui	0.450 [0.195 ; 1.041]	<b>0.0619</b>	0.269[0.102;0.708]	0.0078
Perte d'expression de PTEN				
Non	1			
oui	1.027 [0.442 ; 2.388]	0.9501		
Statut mutationnel <sup>4</sup>				
Non	1			
oui	1.022 [0.381 ;2.741]	0.9655		

<sup>1</sup> cancer du sein et/ou ovaire

<sup>2</sup> cancer du sein

<sup>3</sup> BRCA 1/2

<sup>4</sup> n'importe quelle mutation des gènes de NRAS, PIK3CA ou MET

## E. DISCUSSION

Le cancer de l’ovaire est l’un des cancers gynécologiques le plus meurtrier. Le manque de stratégie de dépistage aboutissant à un diagnostic tardif dans la majorité des cas, la nécessité d’une chirurgie lourde et spécialisée et la grande proportion de rechute après les traitements initiaux menant finalement à la chimiorésistance expliquent la difficulté majeure de la prise en charge clinique chez les patientes atteintes de ce cancer.

Malgré la grande hétérogénéité des carcinomes de l’ovaire reflétée par une classification histologique ancienne et une classification moléculaire proposée plus récemment sur la base des progrès de connaissances de la biologie tumorale, les stratégies thérapeutiques cliniques demeurent peu différentes entre les différents sous-types. La prise en charge des carcinomes ovariens repose toujours majoritairement sur les traitements classiques bien que quelques thérapies ciblées émergent. En absence d’augmentation de manière significative de la survie au cours des dernières décennies, les traitements standards ayant atteints leur limite d’efficacité, il est nécessaire d’envisager des thérapies innovantes, notamment pour les carcinomes ovariens de haut-grade, qui constituent un groupe de tumeurs agressives et meurtrières. Ces nouvelles stratégies doivent reposer en grande partie sur l’identification de nouvelles cibles thérapeutiques parmi lesquelles les anomalies touchant les voies de signalisation oncogéniques ou des fonctions essentielles à la survie cellulaire et pour lesquelles des thérapies ciblées existent ou sont en développement pour d’autres types de cancers.

Au cours de ce travail, l’utilisation de techniques de biologie moléculaire comme la PCR-HRM ou le séquençage NGS a permis de rechercher la présence de mutations somatiques sur les gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* chez les 53 tumeurs ovariennes de haut grade, majoritairement de sous type séreux. En complément, l’étude par immunohistochimie des niveaux d’expression des protéines P53 et PTEN a été effectuée.

### 1. Détection des mutations *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* et *PIK3CA* par PCR-HRM

La PCR-HRM est une méthode post-PCR rapide à débit modéré, peu chère et facile à mettre en œuvre pour la recherche de modifications nucléotidiques somatiques sur des gènes cibles (128). La sensibilité de la technique peut varier selon les gènes analysés. La sensibilité de la technique à l’Unité de biologie des tumeurs permet de détecter jusqu’à 10% de cellules mutées hétérozygotes (129). Pour cette raison, les analyses n’ont pas été réalisées sur les tumeurs présentant moins de 10% de cellules tumorales.

Le pourcentage de mutations retrouvées n’est considéré que pour la population générale (50 tumeurs) ainsi que dans les tumeurs de sous-type histologique séreux (43 tumeurs). Le nombre de cas de carcinomes endométrioïdes et à cellules claires dans notre étude ne nous permet pas de conclure quant aux mutations retrouvées pour ces deux autres sous-types.

Aucune mutation du gène *KRAS* n'a été identifiée chez les tumeurs analysées par PCR-HRM. Les bases de données (COSMIC Sanger) indiquent une fréquence de mutation du gène *KRAS* de 6.2% dans la population de carcinomes ovariens et de 5.3% dans le sous-groupe histologique séreux (tous grades confondus). Ce chiffre descend à moins de 1% dans les carcinomes séreux de haut-grade (40).

Pareillement, aucune mutation du gène *BRAF* n'a été identifiée chez les tumeurs analysées par PCR-HRM. Les bases de données (COSMIC Sanger) indiquent une fréquence de mutation du gène *BRAF* de 1.6% dans la population de carcinomes ovariens et de 1.4% dans le sous-groupe histologique séreux. Ce chiffre descend à 0.5% dans les carcinomes séreux de haut-grade (40).

Considérant le fait que les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* sont plutôt caractéristiques des carcinomes ovariens de bas-grade (130) et l'effectif relativement faible de notre étude, les résultats que nous avons obtenus concordent globalement avec ceux de la littérature.

Une mutation au niveau de l'exon 3 du gène *NRAS* a été détectée dans deux tumeurs de sous-type, soit 4.0% dans toutes les tumeurs et 4.7% des tumeurs de sous-type séreux. Les bases de données (COSMIC Sanger) indiquent moins de 1% de mutation dans les carcinomes ovariens et 0.6% dans le sous-groupe séreux. La fréquence de mutations relativement élevée de notre étude est très probablement liée à son effectif relativement faible mais aussi au fait que nous n'avons analysé que des carcinomes de haut-grade. Compte tenu de résultats récents, l'hypothèse d'une fréquence plus élevée de ces mutations dans les carcinomes séreux de haut-grade ne peut pas être exclue. Nous n'avons également pas retrouvé de mutation de ces gènes dans les 4 tumeurs à cellules claires de notre étude, les bases de données (COSMIC Sanger) indiquant plus de 8% (3/37).

Deux tumeurs à cellules claires ont été trouvées une mutation du gène *PIK3CA* au niveau de l'exon 21, soit 4.0% dans toutes les tumeurs et 66.7% des tumeurs à cellules claires dans notre étude. Ces données concordent avec celles indiquées (presque 34%) dans les bases de données (COSMIC Sanger).

Dans le sous-groupe des tumeurs endométrioïdes la fréquence attendue (de l'ordre 20.6%) n'a pu être retrouvé sur notre effectif trop réduit.

## 2. Détection des mutations *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET* par séquençage haut-débit (NGS)

La technique de séquençage massif est une méthode onéreuse, mais très sensible, très spécifique et précise pour la détection de mutations ponctuelles, unique ou multiple (131). Elle permet de détecter des mutations à une fréquence allélique allant jusqu'à 1% à 5% (en fonction de la couverture). Les limites de la technique reposent sur la nécessité d'une préparation de la librairie, chronophage en fonction du nombre d'échantillons et du nombre



de gènes à analyser, mais aussi sur l'interprétation bio-informatique qui nécessite une bonne expérience dans le domaine.

Les deux mutations du gène *NRAS* exon 3 identifiées par PCR-HRM ont été confirmées par NGS présentant la même substitution nucléotidique (c.181C>A, p.Q61K). Cette mutation somatique, traduisant à une protéine constitutivement activée qui va ensuite activer la voie de signalisation MAPK, n'a été retrouvée que rarement dans les carcinomes ovariens de haut-grade (82) mais a été décrite comme une mutation oncogénique dans les carcinomes séreux de haut-grade (132). Elle a été également décrite dans le processus de la transformation d'un naevus mélanocytaire en mélanome (133). Des études précliniques ont montré une amélioration de sensibilité aux inhibiteurs de MEK des cellules tumorales porteuses de mutation du gène *NRAS* (134) et des études cliniques ont démontré l'activité antitumorale des inhibiteurs de MEK dans le traitement de cancers du poumon, du côlon, du mélanome et de la thyroïde porteurs de mutation du gène *NRAS* (135–137). D'autres études préliminaires ont montré que la protéine de choc thermique 90 (*Heat shock protein 90*, *HSP90*) est nécessaire pour la stabilisation des protéines mutées de *NRAS* et que l'épuisement de *HSP90* par les inhibiteurs engendrant la dégradation de la protéine mutée pouvait exercer une activité antitumorale (138,139). Cette activité a été confirmée au cours d'une étude clinique dans le traitement de mélanomes (140). L'ensemble de ces éléments permettrait d'envisager ces agents antitumoraux dans les thérapies ciblées dans le traitement des carcinomes séreux de haut-grade.

Une mutation du gène *KRAS* au niveau de l'exon 2 (c.35G>T, p.G12V) a été mise en évidence par séquençage NGS dans une tumeur à cellules claires. Ce résultat confirme le rôle potentiel de cette mutation dans les carcinomes à cellules claires notamment dans le processus de transformation d'une endométriose au carcinome, déjà évoqué par ailleurs (141). Il a été également démontré que cette mutation pouvait être prédictive de la sensibilité aux inhibiteurs de MEK dans les carcinomes ovariens (142).

Les deux mutations de l'exon 21 du gène *PIK3CA* retrouvées par PCR-HRM et confirmées par NGS présentent deux substitutions nucléotidiques différentes (c.3139C>T et c.3140A<G) mais qui résultent d'une altération protéique au niveau d'une même acide aminé (p. H1047Y et p.H1047R) touchant le domaine kinase de la protéine. Ces deux mutations somatiques ont déjà été décrites comme pathogéniques (143) et les deux altérations protéiques ont été décrites comme oncogéniques contribuant à l'activation excessive de la voie de signalisation PI3K/AKT (144,145). Par contre une mutation de l'exon 10 (c.1571G>A, p.R524K) a été retrouvée dans 3 tumeurs, deux de sous-type séreux et une à cellules claires. Cette mutation faux-sens code une altération protéique touchant le domaine hélicoïdal dont la conséquence clinique demeure incertaine (database dbSNP, COSMIC Sanger). Par ailleurs, la mutation au niveau de l'exon 5 (c.1037T>A) que nous avons identifiée sur une tumeur séreuse n'a jamais été décrite dans la littérature. Cette mutation code une altération protéique (p.L346Q) dont l'impacte fonctionnel et la signification clinique restent à élucider. A noter qu'une

substitution nucléotidique en position identique (c.1037T>G) codant une altération du même acide aminé (p.L346R) a déjà été décrite comme une mutation faux-sens mais de signification clinique incertaine (COSMIC Sanger).

*In fine*, la fréquence de mutation du gène *PIK3CA* retrouvée dans notre étude (6.7%) apparaît plus importante que celle précédemment rapportée sur une étude à plus grande échelle (<1%) (40). Par ailleurs, sur les tumeurs à cellules claires, l'effectif de notre étude et la fréquence de mutation observés, 3 tumeurs à cellules claires sur 4 soit 75% ne permet pas de comparaison directe avec les données de la littérature (20-33%) (53,69).

Ces résultats ouvrent potentiellement de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, il a été montré que les carcinomes ovariens présentant des mutations du gène *PIK3CA* s'avéraient plus sensibles aux inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K tels que les inhibiteurs de PI3K, AKT, mTOR ou double inhibiteurs de PI3K/mTOR que les carcinomes sans mutation de ce gène (146). Parmi eux, les inhibiteurs de PI3K, tels que BYL719, buparlisib (BKM120), taselisib (GDC0032), et GSK2636771, ont été les plus évalués dans les tumeurs présentant de mutations de *PIK3CA*, y compris les carcinomes ovariens. Les résultats des essais cliniques d'un pan-inhibiteur de PI3K, buparlisib (BKM120) sont équivoques en terme de l'activité antitumorale (147–149). Un autre inhibiteur sélectif de PI3K $\alpha$  (l'unité codé par *PIK3CA*), NVP-BYL719, a montré une activité antitumorale supérieure dans les tumeurs présentant une mutation de *PIK3CA* (150). D'autres essais d'inhibiteurs de PI3K sont en cours et sont résumés dans tableau 10.

Trois variations nucléotidiques du gène *MET* ont été retrouvées dans 5 tumeurs, toutes de sous-type séreux. Cette fréquence (11%) semble plus importante que celles rapportées (40,75). La variation la plus fréquente (c.3029C>T) se situe au niveau de l'exon 14 et a été retrouvée dans 3 cas. Cette variation engendre une altération protéique (p.T1010I) au niveau de la région juxtramembranaire de la portion intracellulaire. L'impact clinique de cette variation reste incertain en tenant compte du fait qu'elle peut-être considérée comme une mutation somatique faux-sens ou un polymorphisme nucléotidique simple (database dbSNP). Certaines études montrent que cette variation nucléotidique serait plutôt un polymorphisme sans conséquence fonctionnelle et donc sans capacité oncogénique (151,152). D'autres études ont montré que cette variation nucléotidique pouvait altérer la physiopathologie de la tumeur et donc être un biomarqueur potentiel pour l'étude des thérapies ciblant la protéine MET (153–155). Dans notre étude, cette variation nucléotidique a été retrouvée dans deux tumeurs à une fréquence allélique (FMA) proche de 50% (Tableau 7, Annexe 7), laissant penser à un polymorphisme. Dans la troisième tumeur cette fréquence étant de 82%, est plutôt en faveur d'une mutation somatique. Le fait que les tumeurs ovariennes présentant cette mutation n'ont pas montré une réponse objective aux inhibiteurs de c-MET indique que la possibilité d'un polymorphisme nucléotidique simple dans les carcinomes ovariens ne peut pas être exclue (75). Seul un séquençage d'ADN constitutionnel chez les trois patientes porteuses de ces tumeurs permettrait de trancher.

La deuxième variation (c.2962C>T) de l'exon 14 engendre une altération protéique (p.R988C) touchant la même région que la précédente. C'est une mutation faux-sens (base dbSNP) dont la signification clinique n'a pas été établie (base ClinVar). Comme pour la variation précédente, certaines études montrent le potentiel de cette mutation dans la cancérogenèse pulmonaire en terme de la formation, la motilité et la migration des cellules tumorales (153,156), tandis qu'une autre étude montre qu'elle ne renforce pas la capacité de transformation de la protéine (152), mais augmente la sensibilité des cellules tumorales aux inhibiteurs de MET (157). Ceci sous-entend que cette mutation pourrait être oncogénique (*onco-driver*) dans certaines tumeurs ou constituer un évènement secondaire exacerbant des propriétés malignes des cellules déjà transformées dans d'autres (158).

La troisième variation (c.3619G>A) au niveau de l'exon 18 identifiée par NGS menant à une altération protéique (p.A1207T) n'est pas décrite dans la littérature et son impacte clinique reste à étudier. A noter que des mutations menant à l'altération de l'acide aminé en position voisine (p.V1206L) ont été décrites comme pathogéniques (159).

Toutes ces variations nucléotidiques évoquent l'intégration de thérapies ciblées notamment des inhibiteurs de MET (158,160) dans les carcinomes ovariens de haut grade, comme précédemment proposé dans d'autres cancers notamment des cancers du poumon (161–163). Bien que les inhibiteurs de MET multi-kinase aient montré un effet antitumoral modérée dans les tumeurs ovarienne (75), des inhibiteurs spécifiques ont montré leur efficacité (164).

L'intérêt des inhibiteurs de MET dans les carcinomes ovariens apparaît également lorsque l'on considère ses inter-relations avec l'environnement hypoxique et l'inhibition de l'angiogenèse. En effet, il a été montré que l'environnement hypoxique induit par les agents anti-angiogéniques favorisait la prolifération des cellules tumorales via l'activation de la signalisation MET (74). Cette sur-régulation compensatoire pourrait probablement explique l'absence de prolongation de la survie globale de bevacizumab dans le traitement des carcinomes ovariens (165,166). Sur la base de ce concept, la double inhibition MET/VEGFR2 a été évaluée et a montré des bénéfices cliniques dans les carcinomes papillaires du rein porteurs de mutation de *MET* (167). Un effet du même ordre a été décrit dans un modèle des carcinomes ovariens (168).

En ce qui concerne les voies de signalisation PI3K et MAPK, des résultats précliniques ont montré l'interaction existant entre ces deux voies de signalisation intracellulaire et que l'inhibition d'une voie pouvait engendrer l'activation de l'autre (169). Ce phénomène explique probablement l'insuffisante d'activité antitumorale des thérapies ciblées par des agents uniques et l'efficacité plus favorable de la thérapie combinée constatée dans les études précliniques (169–171). Différentes approches, y compris le ciblage de la même voie à différents niveaux (combinaisons verticales) ou l'inhibition concertée des voies de PI3K et MAPK (les combinaisons horizontales) ont été entreprises. Les essais cliniques sur des tumeurs comprenant les carcinomes ovariens sont résumés dans Tableau 11.

Aucune mutation concomitante touchant les deux voies n'a été retrouvée dans notre étude, contrairement à d'autres (146).

### 3. Comparaison de la technique de PCR-HRM avec celle de séquençage NGS

Les gènes analysés par les deux techniques sont les gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* et *PIK3CA*. Toutes les mutations détectées en PCR HRM ont été retrouvées en séquençage à une fréquence allélique supérieure à 20% (Tableau 7, Annexe 7). Ces données nous confirment la bonne spécificité de la PCR-HRM. Pour les gènes *BRAF* et *NRAS* exons 3 et 4, aucune mutation n'a été retrouvée, ni par PCR-HRM ni par séquençage (Tableau 7). La PCR-HRM montre donc une bonne sensibilité pour l'analyse de ces gènes. En revanche, trois mutations de l'exon 10 du gène *PIK3CA* détectées par séquençage haut-débit à des fréquences alléliques (FMA) de 15%, 17% et 5% n'avaient pas été détectées par la technique de PCR-HRM. Il semblerait donc que la sensibilité de la PCR-HRM pour l'analyse de l'exon 10 du gène *PIK3CA* ne permette la détection de mutations qu'à partir de 20% de cellules mutées.

### 4. Analyse de l'expression des protéines P53 et PTEN par immunohistochimie

L'étude immunohistochimique permet de mettre en évidence le taux d'expression de la protéine, souvent des formes mutées. Cette méthode est utilisée pour l'analyse de protéines codées par de très longs gènes ne présentant pas de zone mutationnelle bien précise (« *hotspot* »). Considérée comme une technique facile à réaliser, la lecture des lames d'immunohistochimie nécessite cependant l'œil d'une personne formée et qualifiée dans le domaine.

#### 4.1 P53

L'anticorps utilisé dans notre étude permet de reconnaître à la fois le type sauvage et muté non-nul de la protéine P53 (127). Quand la protéine P53 sauvage est analysée par immunohistochimie, elle se traduit par un marquage d'intensité modeste d'une petite proportion de cellules tumorales à cause de la demi-vie très courte de la protéine. Dans le cas du phénotype muté non-nul, le marquage se présente de manière très intense. Dans le cas d'un phénotype muté nul, la forme tronquée de la protéine, est indétectable par l'immunohistochimie et donc ne génère aucun marquage (170).

Le niveau d'expression de la protéine P53 a pu être interprété dans les 53 tumeurs analysées dans notre étude. Toutes les tumeurs surexprimant P53 présentaient une coloration nucléaire diffuse et intense révélant un phénotype P53 muté non-nul. Les tumeurs présentant une absence complète de coloration nucléaire révélaient quant à elle un phénotype P53 muté nul (173).

La surexpression de P53 a été constatée dans 32 sur 53 (60%) de toutes les tumeurs et 30 sur 45 (67%) des tumeurs séreuses, une fréquence similaire aux données de la littérature (78,174). Globalement, ces constatations sont en accord avec les données publiées montrant

une altération fréquente de P53 dans les carcinomes ovariens de haut-grade, surtout le sous-type séreux (40).

L'association entre la surexpression de P53 et le pronostic demeure controversée, probablement à cause d'une mauvaise considération des différents sous-types histologiques analysés, de méthodologies et de critères d'interprétation différentes (78). Dans notre étude du sous-groupe des carcinomes séreux de haut-grade, nous avons retrouvée une association entre la surexpression de P53 et une prolongation de la survie sans progression et de la survie globale. Ces données sont concordantes avec celles rapportées à l'issue d'une étude sur un effectif supérieur au nôtre (174). Bien que cela puisse être expliqué par le fait que les protéines P53 muté nul sont souvent tronquées et dépourvues de fonction de type sauvage, tandis que les protéines P53 de phénotype muté non-nul conserve en partie des fonctions sauvage (173), le mécanisme précis menant à cette différence en terme du pronostic n'est pas certain et a besoin d'investigation plus approfondie.

La division en deux groupes des altérations de P53 dans les tumeurs trouve des implications différentes en matière de thérapie ciblée. Pour le groupe de tumeurs présentant une surexpression de P53 de phénotype muté non nul, le maintien de la stabilité de P53 est critique pour la chimiorésistance et la survie des cellules tumorales. Cette stabilisation exige la formation d'un complexe avec les HSP90 qui empêchent la dégradation de P53 non-nul (175). La bonne fonction de l'histone déacétylase 6 (HDAC6) est nécessaire pour la formation de ce complexe (176). L'inhibition de la fonction de HDAC6 est donc critique pour la déstabilisation et la dégradation de P53. Le vorinostat est un inhibiteur spécifique de HDAC6 approuvé par la FDA dont l'activité cytotoxique préférentielle a été montrée sur des cellules tumorales présentant un phénotype P53 muté non-nul (177).

L'angiogenèse des tumeurs est souvent contrôlée par une hypoxie secondaire à une croissance tumorale ou par l'augmentation de la signalisation oncogénique. Les deux mécanismes entraînent une activation de la signalisation HIF-1 alpha et une augmentation de sa cible transcriptionnelle: le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). La modification post traductionnelle de HIF-1alpha, y compris l'acétylation médiée par les histone acétyltransférases (HATs) et la désacétylation par les histone désacétylases (HDAC), est un phénomène critique. L'inhibition de cette signalisation par les inhibiteurs de HDAC devient une nouvelle piste anti-angiogénique (178). L'association de l'inhibitions de la voie du VEGF par le pazopanib et d'inhibition des HDAC par le vorinostat a montré une activité antitumorale synergique se traduisant par une prolongation de la survie sans progression et de la survie globale chez les patients porteurs de tumeurs de phénotype P53 muté, y compris des tumeurs ovariennes, par rapport aux patients porteurs de tumeurs de phénotype P53 sauvage (179). Il a ainsi été proposé de stratifier les carcinomes ovariens en fonction du phénotype P53 comme une justification moléculaire pour l'addition de vorinostat à la thérapie d'entretien par anti-VEGF dans le but de maximiser les avantages cliniques et de limiter les toxicités importantes liées à la chimiothérapie cytotoxique (180).

Quant aux tumeurs de phénotype P53 muté nul, la restauration d'un phénotype P53 sauvage par la thérapie génique a été envisagée et l'essai clinique s'y référant a montré une prolongation de la survie des patientes atteintes des carcinomes ovariens (181).

## 4.2 PTEN

PTEN est un régulateur négatif majeur de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR dont la perte de fonction active la signalisation oncogénique. Probablement en raison de l'importante multiplicité des sites de mutations pouvant toucher le gène *PTEN*, il a été montré que l'analyse de l'expression de PTEN par immunohistochimie pouvait être préférée au séquençage afin de stratifier les tumeurs au regard de leur statut PTEN (182).

Dans notre étude, l'interprétation de l'expression de PTEN a été possible dans 46/ 53 cas et 39/45 pour les tumeurs de type séreux.

Pour les tumeurs interprétable, la perte d'expression de PTEN a été constatée dans 19 cas (41%) et 15 cas de type séreux (38%), une fréquence similaire à celle révélée dans d'autres études (80,183).

Bien que la perte d'expression de PTEN ait été rapportée comme un événement commun et un marqueur pronostique dans les carcinomes séreux de haut-grade (80), l'association avec la survie des patientes demeure controversée (80,183). Une étude récente qui a évalué l'expression de PTEN dans les carcinomes séreux de haut-grade a rapporté une association entre la perte d'expression PTEN et une survie sans progression plus élevée. Aucune corrélation n'a été relevée avec la survie globale, probablement en raison de l'hétérogénéité des régimes de traitement après la rechute (183). Comme suggéré par ailleurs, l'association de la perte d'expression de PTEN avec un pronostic plus favorable peut être partiellement expliquée par une relation entre la déficience de PTEN et un défaut de la réparation d'ADN par la recombinaison homologue et effet protecteur de la surexpression de PIK3CA constatée dans les carcinomes ovariens à cellules claires (184,185). Ce défaut de recombinaison homologue pourrait sensibiliser les cellules tumorales aux médicaments anticancéreux comme les sels de platine ou les inhibiteurs de PARP (186), un phénomène similaire à celui observé dans les tumeurs avec une déficience de BRCA. Cette association entre la perte d'expression de PTEN et la survie sans progression ou la survie globale n'a pas été retrouvée dans notre étude, probablement à cause de son effectif relativement faible.

D'ailleurs, des études précliniques montrent que l'association d'une mutation de *PIK3CA* avec la perte d'expression de PTEN est suffisante pour initier la cancérogenèse des carcinomes ovariens (187). Ce phénomène a été constaté dans 3 tumeurs de notre étude, une tumeur de type séreux et deux tumeurs à cellules claires. Comme une large proportion des tumeurs présentant une perte d'expression de PTEN ont montré une régression après avoir exposé aux inhibiteurs ciblant la voie de signalisation PI3K (188), la perte d'expression de PTEN peut être un marqueur prédictif de l'activation et la réponse aux inhibiteurs de la signalisation PI3K (146) tels que buparlisib (BKM120) et NVP-BYL719 (150,189). Des essais

cliniques d'inhibiteurs de PI3K chez des patientes porteuses d'une tumeur présentant une mutation de *PIK3CA* et/ou une perte d'expression de *PTEN*, y compris les carcinomes ovariens, sont en cours (NCT00877773, NCT 01219699, NCT01449058, NCT 01501604, NCT 01708161, NCT 01928459, NCT02439489, NCT02449538, NCT02449564).

#### 5. Patientes porteuses de mutations germinales de *BRCA* dans notre étude

Sept patientes sur les 19 ayant eu un test oncogénétique dans notre étude sont porteuses d'une mutation germinale des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. Toutes sont atteintes des carcinomes séreux. A part de l'olaparib qui a obtenu l'AMM pour le traitement des carcinomes séreux de haut grade sensibles aux sels de platine, d'autres inhibiteurs de PARP tels que rucaparib, niraparib et veliparib sont en cours d'évaluation dans les essais cliniques pour le traitement des carcinomes ovariens (190). Les essais multi-centriques destinés à étendre l'AMM des inhibiteurs de PARP sont résumés dans Tableau 12. Parmi ces agents le rucaparib a connu un grand progrès depuis ces dernières années (191).

D'ailleurs, des études pré-cliniques ont mis en évidence que l'hypoxie induite par l'inhibition de l'angiogenèse conduit à la régulation négative des protéines de réparation d'ADN par recombinaison homologue et améliore la sensibilité aux inhibiteurs de PARP (192,193). Cet effet a été confirmé au cours d'essais cliniques de phase I et II (194,195), menant finalement à la réalisation d'essais de phase III sur des carcinomes ovariens de haut-grade. Ces essais sont résumés dans Tableau 13.

#### F. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de cette étude ont souligné le fait que, dans les carcinomes ovariens de haut-grade, la voie PI3K pouvait être fréquemment dérégulée, la dérégulation étant engendrée soit directement par les mutations des gènes *PIK3CA* et *PTEN* ou indirectement par les altérations du récepteur MET situé en amont, entre autre, de cette voie de signalisation. De nombreuses stratégies thérapeutiques, dirigées contre les protéines de cette voie de signalisation sont activement étudiées et constitueraient par conséquent une opportunité thérapeutique pour ces patientes.

La perspective de nouvelles analyses peut également être considérée. En effet, si le séquençage a permis de détecter les mutations ponctuelles ainsi que les petits réarrangements, certaines altérations génétiques ou épigénétiques, telles que la méthylation de certains promoteurs de gènes n'ont pas pu être étudiées.

D'autre part, si certaines protéines des voies de signalisation étudiées ont été analysées, d'autres, au sein de ces mêmes voies et pouvant également être ciblées par des thérapies, pourraient faire l'objet de nouvelles analyses. Les anomalies des protéines AKT ou mTOR, par exemple, pourraient être présentes dans les tumeurs ovariennes.

Enfin, l'analyse des altérations situées dans d'autres voies de signalisation, telles que les différentes voies de réparation de l'ADN, présenterait un grand intérêt. L'étude des gènes BRCA par séquençage haut-débit, qui n'a pu être mise au point lors de ma thèse, serait par exemple pertinente. En effet, des altérations de ces gènes et également d'autres gènes s'intégrant dans la même voie de signalisation semblent être très fréquentes dans les carcinomes ovariens de haut-grade, notamment le sous-type séreux, et pourraient faire l'objet d'une thérapie par les inhibiteurs de PARP.

En cancérologie, suite à l'identification des anomalies moléculaires tumorales et au développement d'agents thérapeutiques ciblant ces anomalies, de plus en plus de patients bénéficient d'une thérapie personnalisée. Dans les cancers de l'ovaire, la détermination du profil moléculaire des tumeurs pourrait donc permettre, à court ou moyen terme, l'utilisation de thérapies ciblées efficaces et appropriées.



**Tableau 10 : Essais cliniques en cours évaluant des inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR.**

Protocole	Phase	Titre
NCT 02208375	Phase I, phase II	Olaparib et inhibiteur de mTOR (AZD2014) ou inhibiteur d'AKT (AZD5363) dans le traitement des récurrences de cancers de l'endomètre, de cancers du sein triple négatifs, et de cancers de l'ovaire.
NCT02142803	Phase I	Inhibiteurs de TORC1/2 (MLN0128) et Bévacicumab dans le traitement des glioblastomes et des tumeurs solides avancées
NCT01827384	phase II	Thérapies ciblées à base des profils moléculaires des tumeurs solides avancées
NCT01623349	Phase I	Buparlisib ou Alpelisib plus Olaparib dans le traitement des récurrences de cancers du sein triple négatifs ou de carcinomes ovariens sévères de haut-grade

**Tableau 11 : Essais cliniques des thérapies ciblées combinées sur des carcinomes ovariens.**

Phase et/ou caractères d'essai	Régime	Nombre de patients	Efficacité	Référence
Phase 1b, patients porteurs de tumeurs solides avancées avec mutation de <i>RAS</i> ou <i>BRAF</i>	BYL719 (inhibiteur de PI3K $\alpha$ )  + binimetinib (MEK162) (inhibiteur de MEK)	4 (avec mutation de <i>KRAS</i> )	3 PR <sup>a</sup>	(196)
Tumeurs avec mutation de <i>RAS</i>	inhibiteur de PI3K + inhibiteur de MEK (NOS)	14	5 PR, 1 SD,	(197)
Phase 1b, tumeurs avec mutation de <i>KRAS</i>	Buparlisib (pan inhibiteur de PI3K) + trametinib (inhibiteur de MEK)	21 (19 mutation de <i>KRAS</i> , 1 mutation de <i>BRAF</i> )	1 CR, 5 PR	(198)
Phase 1, tumeurs solides de stade avancé	Tivantinib (inhibiteur de MET) + temsirolimus (inhibiteur de mTOR)	4	1 PR, 1 SD	(199)

<sup>a</sup> CR = réponse complète, PR = réponse partielle, SD = maladie stable

**Tableau 12 : Essais multi-centriques destinés à étendre l'AMM des inhibiteurs de PARP dans le carcinome ovarien.**

Inhibiteurs PARP	Cibles	Récapitulation
Olaparib (AZD2281)	PARP1/2/3	Essais de phase III :
		-- Chez les patientes avec mutations (germinales ou somatiques) de BRCA en première ligne (SOLO-1; NCT01844986)
		-- Chez les patientes atteintes d'un carcinome séreux ou endométriöide de haut-grade chimiosensible aux sels de platine avec mutations (germinales ou somatiques) de BRCA (SOLO-2; NCT01874353)
Rucaparib (AG-014699; CO-338)	PARP1/2	Essai de phase II chez les patientes atteintes d'un carcinome chimiosensible aux sels de platine, accompagné d'un test de diagnostic de défaut de la recombinaison homologue (ARIEL2; NCT01891344)
		Essai randomisé de traitement d'entretien chez les patientes atteintes d'un carcinome de haut-grade récidivant chimiosensible aux sels de platine avec ou sans mutations de BRCA (ARIEL3; NCT01968213)
Veliparib (ABT-888)	PARP1/2	Essai de phase III (3 bras) en première ligne associé à carboplatine et paclitaxel suivi d'un traitement d'entretien par veliparib (GOG 3005; NCT02470585)
Niraparib (MK4827)	PARP1/2	Essai de phase III de traitement d'entretien chez les patientes avec ou sans mutations de BRCA, accompagné d'un test de diagnostic de défaut de la recombinaison homologue pour les patientes sans mutation de BRCA (NOVA; NCT01847274)

D'après: Ledermann JA, Ann Oncol. 2016

**Tableau 13 : Essais cliniques de phase III d'association des inhibiteurs de PARP et des agents anti-angiogéniques .**

Inhibiteur de PARP	Numéro d'essai de NCT	Agent anti-angiogénique	Régime d'association	Chimiosensibilité aux sels de platine	Critères d'inclusion
Olaparib	PAOLA-1(ENGOT ov25) NCT02477644	Bevacizumab	platine-taxane-bevacizumab + Olaparib vs. placebo suivi par bevacizumab + olaparib vs. placebo en entretien	Première ligne	COHG de stade IIIB-IV
Olaparib	(NRG-GY004 NCI-2015-00606) NCT02446600	Cediranib	Olaparib vs. Olaparib-cediranib vs. Chimiothérapie à base de platine	Chimiosensible aux sels de platine	COHG ou d'autres histologies avec mutations germinales de BRCA
Olaparib	(NRG-GY005 NCI-2015-00651) NCT02502266	Cediranib	Olaparib vs. Cediranib vs. Olaparib-cediranib vs. Monochimiothérapie sans platine	Chimiorésistant aux sels de platines	COHG ou autre histologie avec mutations germinales de BRCA
Olaparib	ICON 9	Cediranib	Chimiothérapie à base de platine-cediranib suivi par cediranib vs. Cediranib-olaparib en entretien	Chimiosensible aux sels de platine	COHG
Niraparib	AVANOVA (ENGOT ov24) NCT02354131	Bevacizumab	Niraparib vs. Bevacizumab vs. Niraparib-bevacizumab	Chimiosensible aux sels de platine	COHG

COHG : carcinome ovarien de haut-grade

D'après: Ledermann JA, Ann Oncol. 2016

## REFERENCES

1. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*. 2014 Oct 11;384(9951):1376–88.
2. Shaaban AM, Rezvani M, Elsayes KM, Baskin H, Mourad A, Foster BR, et al. Ovarian malignant germ cell tumors: cellular classification and clinical and imaging features. *Radiographics*. 2014 Jun;34(3):777–801.
3. Ray-Coquard I, Brown J, Harter P, Provencher DM, Fong PC, Maenpaa J, et al. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus review for ovarian sex cord stromal tumors. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 Nov;24(9 Suppl 3):S42-47.
4. globocan 2015. [cited 2016 Apr 6]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/burden\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx)
5. Leone N, Voirin N, Roche L, Binder-Foucard F. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015 rapport technique. [cited 2016 Apr 6]. Available from: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2015/Projection-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-en-2015>
6. Trétarre B, Molinié F, Woronoff A-S, Bossard N, Bessaoud F, Marrer E, et al. Ovarian cancer in France: trends in incidence, mortality and survival, 1980-2012. *Gynecol Oncol*. 2015 Nov;139(2):324–9.
7. Rice MS, Murphy MA, Tworoger SS. Tubal ligation, hysterectomy and ovarian cancer: A meta-analysis. *J Ovarian Res*. 2012;5(1):13.
8. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*. 2008 Jan 26;371(9609):303–14.
9. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer*. 2016 Jan 1;
10. Sopik V, Iqbal J, Rosen B, Narod SA. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence. *Gynecol Oncol*. 2015 Sep;138(3):741–9.
11. Sopik V, Rosen B, Giannakeas V, Narod SA. Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part III. Prospects for the future. *Gynecol Oncol*. 2015 Sep;138(3):757–61.
12. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):171–82.
13. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003 May;72(5):1117–30.
14. Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Nov;290(5):839–42.

15. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jun;61(3):183–203.
16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015 Feb;65(1):5–29.
17. Kurman R, Carcangiu M, Herrington H. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs.* Fourth Edition. Lyon: WHO Press.
18. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Apr;293(4):695–700.
19. Köbel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, et al. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2010 May;29(3):203–11.
20. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol.* 2004 Apr;28(4):496–504.
21. Malpica A, Deavers MT, Tornos C, Kurman RJ, Soslow R, Seidman JD, et al. Interobserver and intraobserver variability of a two-tier system for grading ovarian serous carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007 Aug;31(8):1168–74.
22. Plaxe SC. Epidemiology of low-grade serous ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Apr;198(4):459.e1-8; discussion 459.e8-9.
23. Bell DA, Longacre TA, Prat J, Kohn EC, Soslow RA, Ellenson LH, et al. Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives. *Hum Pathol.* 2004 Aug;35(8):934–48.
24. McKenney JK, Balzer BL, Longacre TA. Patterns of stromal invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): a reevaluation of the concept of stromal microinvasion. *Am J Surg Pathol.* 2006 Oct;30(10):1209–21.
25. Silva EG, Gershenson DM, Malpica A, Deavers M. The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous borderline neoplasms with noninvasive implants is time dependent. *Am J Surg Pathol.* 2006 Nov;30(11):1367–71.
26. Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih I-M. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol.* 2007 Jul;31(7):1007–12.
27. McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology.* 2011 Aug;43(5):420–32.
28. Escobar J, Klimowicz AC, Dean M, Chu P, Nation JG, Nelson GS, et al. Quantification of ER/PR expression in ovarian low-grade serous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2013 Feb;128(2):371–6.

29. Singer G, Oldt R, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Mar 19;95(6):484–6.
30. Wong K-K, Tsang YTM, Deavers MT, Mok SC, Zu Z, Sun C, et al. BRAF mutation is rare in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinomas. *Am J Pathol.* 2010 Oct;177(4):1611–7.
31. Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V, Lankes HA, Coleman R, Morgan MA, et al. Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013 Feb;14(2):134–40.
32. Grisham RN, Iyer G, Garg K, DeLair D, Hyman DM, Zhou Q, et al. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer.* 2013 Feb 1;119(3):548–54.
33. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007 Feb;31(2):161–9.
34. Lee Y, Medeiros F, Kindelberger D, Callahan MJ, Muto MG, Crum CP. Advances in the recognition of tubal intraepithelial carcinoma: applications to cancer screening and the pathogenesis of ovarian cancer. *Adv Anat Pathol.* 2006 Jan;13(1):1–7.
35. Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, et al. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2006 Feb;30(2):230–6.
36. Przybycin CG, Kurman RJ, Ronnett BM, Shih I-M, Vang R. Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol.* 2010 Oct;34(10):1407–16.
37. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol.* 2007 Jan;211(1):26–35.
38. Herrington CS, McCluggage WG. The emerging role of the distal Fallopian tube and p53 in pelvic serous carcinogenesis. *J Pathol.* 2010 Jan;220(1):5–6.
39. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol.* 2010 May;221(1):49–56.
40. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011 Jun 30;474(7353):609–15.
41. Hennessy BTJ, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Aug 1;28(22):3570–6.

42. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch*. 2012 Mar;460(3):237–49.
43. Stern RC, Dash R, Bentley RC, Snyder MJ, Haney AF, Robboy SJ. Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types. *Int J Gynecol Pathol*. 2001 Apr;20(2):133–9.
44. Bell KA, Kurman RJ. A clinicopathologic analysis of atypical proliferative (borderline) tumors and well-differentiated endometrioid adenocarcinomas of the ovary. *Am J Surg Pathol*. 2000 Nov;24(11):1465–79.
45. Mingels MJJM, Masadah R, Geels YP, Otte-Höller I, de Kievit IM, van der Laak JAWM, et al. High prevalence of atypical hyperplasia in the endometrium of patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Clin Pathol*. 2014 Aug;142(2):213–21.
46. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol*. 2004 Jan;23(1):41–4.
47. Chan JK, Teoh D, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS. Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2008 Jun;109(3):370–6.
48. McCluggage WG. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *J Clin Pathol*. 2008 Feb;61(2):152–63.
49. DeLair D, Oliva E, Köbel M, Macias A, Gilks CB, Soslow RA. Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jan;35(1):36–44.
50. Tan DSP, Kaye S. Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. *J Clin Pathol*. 2007 Apr;60(4):355–60.
51. wilkinson N, McCluggage W. Datasets for the Histopathological Reporting of Neoplasms of the Ovaries and Fallopian Tubes and Primary Carcinomas of the Peritoneum. In London: Royal College of Pathologists; 2012.
52. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*. 2010 Oct 14;363(16):1532–43.
53. Kuo K-T, Mao T-L, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang T-L, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2009 May;174(5):1597–601.
54. Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, Berkowitz RS, Mok SC. PTEN expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol*. 2006 Apr;101(1):71–5.
55. Hoerl HD, Hart WR. Primary ovarian mucinous cystadenocarcinomas: a clinicopathologic study of 49 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*. 1998 Dec;22(12):1449–62.



56. Lee KR, Young RH. The distinction between primary and metastatic mucinous carcinomas of the ovary: gross and histologic findings in 50 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003 Mar;27(3):281–92.
57. Schiavone MB, Herzog TJ, Lewin SN, Deutsch I, Sun X, Burke WM, et al. Natural history and outcome of mucinous carcinoma of the ovary. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Nov;205(5):480.e1-8.
58. Hart WR. Mucinous tumors of the ovary: a review. *Int J Gynecol Pathol*. 2005 Jan;24(1):4–25.
59. Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolnii F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, et al. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2003 Aug;90(2):378–81.
60. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer*. 1997 Apr 15;79(8):1581–6.
61. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 2010 Jan 14;463(7278):191–6.
62. Dobbin ZC, Landen CN. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):8213–27.
63. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 2014 Nov 15;120(22):3446–56.
64. Suh DH, Kim M-K, Kim HS, Chung HH, Song YS. Epigenetic therapies as a promising strategy for overcoming chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *J Cancer Prev*. 2013 Sep;18(3):227–34.
65. Robert J. Signalisation cellulaire et cancer. Springer-Verlag paris. 2010 [cited 2016 Apr 14]. Available from: <http://www.springer.com/us/book/9782817800271>
66. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Jan;16(1):103–19.
67. Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK-Y. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*. 2013 Jun;45(4):346–56.
68. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 2006 Feb 27;94(4):455–9.
69. Campbell IG, Russell SE, Choong DYH, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CSF, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7678–81.
70. Levine DA, Bogomolnii F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 15;11(8):2875–8.

71. Harlé A, Lion M, Lozano N, Husson M, Harter V, Genin P, et al. Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria. *Oncol Rep*. 2013 Mar;29(3):1043–52.
72. Blumenschein GR, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 10;30(26):3287–96.
73. Skead G, Govender D. Gene of the month: MET. *J Clin Pathol*. 2015 Jun;68(6):405–9.
74. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 2012 Feb;12(2):89–103.
75. Tang C, Jardim DLF, Falchook GS, Hess K, Fu S, Wheler JJ, et al. MET nucleotide variations and amplification in advanced ovarian cancer: characteristics and outcomes with c-Met inhibitors. *Oncoscience*. 2014;1(1):5–13.
76. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413–31.
77. Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*. 2013 Jan;15(1):2–8.
78. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*. 2003 Jan 15;97(2):389–404.
79. Kolasa IK, Rembiszewska A, Janiec-Jankowska A, Dansonka-Mieszkowska A, Lewandowska AM, Konopka B, et al. PTEN mutation, expression and LOH at its locus in ovarian carcinomas. Relation to TP53, K-RAS and BRCA1 mutations. *Gynecol Oncol*. 2006 Nov;103(2):692–7.
80. Martins FC, Santiago I de, Trinh A, Xian J, Guo A, Sayal K, et al. Combined image and genomic analysis of high-grade serous ovarian cancer reveals PTEN loss as a common driver event and prognostic classifier. *Genome Biol*. 2014;15(12):526.
81. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004 May;164(5):1511–8.
82. Kurman RJ, Shih I-M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*. 2008 Apr;27(2):151–60.
83. Kurman RJ, Shih I-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):433–43.
84. Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. Homologous recombination deficiency and ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2016 Apr 8;60:49–58.
85. Romero I, Bast RC. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology*. 2012 Apr;153(4):1593–602.

86. Sieben NLG, Macropoulos P, Roemen GMJM, Kolkman-Uljee SM, Jan Fleuren G, Houmadi R, et al. In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol.* 2004 Mar;202(3):336–40.
87. Amate P, Huchon C, Dessapt AL, Bensaid C, Medioni J, Le Frère Belda M-A, et al. Ovarian cancer: sites of recurrence. *Int J Gynecol Cancer.* 2013 Nov;23(9):1590–6.
88. Perri T, Ben-Baruch G, Kalfon S, Beiner ME, Helpman L, Hogen LB-D, et al. Abdominopelvic cytoreduction rates and recurrence sites in stage IV ovarian cancer: is there a case for thoracic cytoreduction? *Gynecol Oncol.* 2013 Oct;131(1):27–31.
89. Stuart GCE, Kitchener H, Bacon M, duBois A, Friedlander M, Ledermann J, et al. 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 May;21(4):750–5.
90. Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Jun;31(1–2):143–62.
91. Li L, Wang L, Zhang W, Tang B, Zhang J, Song H, et al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2004 Jun;24(3b):1973–9.
92. Siddiqui GK, Maclean AB, Elmasry K, Wong te Fong A, Morris RW, Rashid M, et al. Immunohistochemical expression of VEGF predicts response to platinum based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Angiogenesis.* 2011 May;14(2):155–61.
93. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005 Dec;9(4):777–94.
94. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 29;333(2):328–35.
95. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2473–83.
96. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2484–96.
97. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol.* 2012 Jun 10;30(17):2039–45.
98. AURELIA: A randomized phase III trial evaluating bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) for platinum (PT)-resistant recurrent ovarian cancer (OC). *J Clin*

Oncol. [cited 2016 Apr 18]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/94636-114>

99. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2015 Aug;16(8):928–36.
100. Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015 Oct;139(1):10–6.
101. Shaw D, Clamp A, Jayson GC. Angiogenesis as a target for the treatment of ovarian cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013 Sep;25(5):558–65.
102. Arnaudeau C, Lundin C, Helleday T. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol*. 2001 Apr 13;307(5):1235–45.
103. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006 Sep 25;25(43):5864–74.
104. Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):517–28.
105. Weberpals JI, Koti M, Squire JA. Targeting genetic and epigenetic alterations in the treatment of serous ovarian cancer. *Cancer Genet*. 2011 Oct;204(10):525–35.
106. Langelier M-F, Pascal JM. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 2013 Feb;23(1):134–43.
107. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):814–9.
108. Rigakos G, Razis E. BRCAness: finding the Achilles heel in ovarian cancer. *The Oncologist*. 2012;17(7):956–62.
109. Wiggins AJ, Cass GKS, Bryant A, Lawrie TA, Morrison J. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;5:CD007929.
110. Horowitz NS, Miller A, Rungruang B, Richard SD, Rodriguez N, Bookman MA, et al. Does aggressive surgery improve outcomes? Interaction between preoperative disease burden and complex surgery in patients with advanced-stage ovarian cancer: an analysis of GOG 182. *J Clin Oncol*. 2015 Mar 10;33(8):937–43.
111. Hannibal CG, Vang R, Junge J, Kjaerbye-Thygesen A, Kurman RJ, Kjaer SK. A binary histologic grading system for ovarian serous carcinoma is an independent prognostic factor: a population-based study of 4317 women diagnosed in Denmark 1978-2006. *Gynecol Oncol*. 2012 Jun;125(3):655–60.

112. Kosary CL. FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. *Semin Surg Oncol*. 1994 Feb;10(1):31–46.
113. Young RC, Walton LA, Ellenberg SS, Homesley HD, Wilbanks GD, Decker DG, et al. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med*. 1990 Apr 12;322(15):1021–7.
114. Huang J, Hu W, Sood AK. Prognostic biomarkers in ovarian cancer. *Cancer Biomark*. 2010 2011;8(4–5):231–51.
115. Matias-Guiu X, Davidson B. Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch*. 2014 Mar;464(3):315–31.
116. Sabatier R, Finetti P, Cervera N, Birnbaum D, Bertucci F. DNA microarrays and prediction of clinical outcome in ovarian carcinoma patients. *Bull Cancer*. 2010 Aug;97(8):979–89.
117. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2000 Aug;19(1):3–10.
118. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*. 2009 Mar 15;115(6):1234–44.
119. Petrillo M, Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, Costantini B, Vizzielli G, et al. Ovarian cancer patients with localized relapse: clinical outcome and prognostic factors. *Gynecol Oncol*. 2013 Oct;131(1):36–41.
120. Chi DS, McCaughty K, Diaz JP, Huh J, Schwabenbauer S, Hummer AJ, et al. Guidelines and selection criteria for secondary cytoreductive surgery in patients with recurrent, platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*. 2006 May 1;106(9):1933–9.
121. Nietner T, Jarutat T, Mertens A. Systematic comparison of tissue fixation with alternative fixatives to conventional tissue fixation with buffered formalin in a xenograft-based model. *Virchows Arch*. 2012 Sep;461(3):259–69.
122. Borràs E, Jurado I, Hernan I, Gamundi MJ, Dias M, Martí I, et al. Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer*. 2011;11:406.
123. ROCHE-DIAGNOSTICS 2008. LightCycler® 480 Real-Time PCR System. High Resolution Melting: Optimization Strategies. Germany: Roche Diagnostics GmbH.
124. Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res*. 1996 Jul 1;24(13):2623–5.

125. 454-LIFESCIENCECORP. 2011. emPCR Amplification Method Manual - Lib-A GS Junior Titanium Series 454 Life Sciences Corp
126. SENGÈNE, J. 2012. Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI
127. Bonsing BA, Corver WE, Gorsira MC, van Vliet M, Oud PS, Cornelisse CJ, et al. Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry. *Cytometry*. 1997 May 1;28(1):11–24.
128. Gonzalez-Bosquet J, Calcei J, Wei JS, Garcia-Closas M, Sherman ME, Hewitt S, et al. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. *PloS One*. 2011;6(1):e14522.
129. HARLE A. Optimisation et validation d'une PCR-High Resolution Melting (HRM) pour la détection des mutations des exons 2, 3 et 4 des gènes KRAS et NRAS chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Université de Lorraine 2014.
130. Vargas AN. Natural history of ovarian cancer. *Ecancermedicalscience*. 2014;8:465.
131. Zopf A, Raim R, Danzer M, Niklas N, Spilka R, Pröll J, et al. Introduction of the hybcell-based compact sequencing technology and comparison to state-of-the-art methodologies for KRAS mutation detection. *BioTechniques*. 2015 Mar;58(3):126–34.
132. Emmanuel C, Chiew Y-E, George J, Etemadmoghadam D, Anglesio MS, Sharma R, et al. Genomic classification of serous ovarian cancer with adjacent borderline differentiates RAS pathway and TP53-mutant tumors and identifies NRAS as an oncogenic driver. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 15;20(24):6618–30.
133. Kinsler VA, Thomas AC, Ishida M, Bulstrode NW, Loughlin S, Hing S, et al. Multiple congenital melanocytic nevi and neurocutaneous melanosis are caused by postzygotic mutations in codon 61 of NRAS. *J Invest Dermatol*. 2013 Sep;133(9):2229–36.
134. Atefi M, von Euw E, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, et al. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. *PloS One*. 2011;6(12):e28973.
135. Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013 Mar;14(3):249–56.
136. Zimmer L, Barlesi F, Martinez-Garcia M, Dieras V, Schellens JHM, Spano J-P, et al. Phase I expansion and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor RO4987655 (CH4987655) in selected patients with advanced cancer with RAS-RAF mutations. *Clin Cancer Res*. 2014 Aug 15;20(16):4251–61.
137. Hayes DN, Lucas AS, Tanvetyanon T, Krzyzanowska MK, Chung CH, Murphy BA, et al. Phase II efficacy and pharmacogenomic study of Selumetinib (AZD6244; ARRY-

- 142886) in iodine-131 refractory papillary thyroid carcinoma with or without follicular elements. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1;18(7):2056–65.
138. Grbovic OM, Basso AD, Sawai A, Ye Q, Friedlander P, Solit D, et al. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 3;103(1):57–62.
139. da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R. Activated B-Raf is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):10686–91.
140. Banerji U, Affolter A, Judson I, Marais R, Workman P. BRAF and NRAS mutations in melanoma: potential relationships to clinical response to HSP90 inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2008 Apr;7(4):737–9.
141. Otsuka J, Okuda T, Sekizawa A, Amemiya S, Saito H, Okai T, et al. K-ras mutation may promote carcinogenesis of endometriosis leading to ovarian clear cell carcinoma. *Med Electron Microsc*. 2004 Sep;37(3):188–92.
142. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, et al. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2008 Dec 16;99(12):2020–8.
143. Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, Alfares A, Kelly MA, Pugh TJ, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clin Genet*. 2013 Nov;84(5):453–63.
144. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18;102(3):802–7.
145. Thirumal Kumar D, George Priya Doss C. Investigating the Inhibitory Effect of Wortmannin in the Hotspot Mutation at Codon 1047 of PIK3CA Kinase Domain: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Approach. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2016;102:267–97.
146. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):777–82.
147. Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birl D, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2012 Jan 20;30(3):282–90.
148. Mayer IA, Abramson VG, Isakoff SJ, Forero A, Balko JM, Kuba MG, et al. Stand up to cancer phase Ib study of pan-phosphoinositide-3-kinase inhibitor buparlisib with letrozole in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 20;32(12):1202–9.
149. Vansteenkiste JF, Canon J-L, Braud FD, Grossi F, De Pas T, Gray JE, et al. Safety and Efficacy of Buparlisib (BKM120) in Patients with PI3K Pathway-Activated Non-Small Cell Lung Cancer: Results from the Phase II BASALT-1 Study. *J Thorac Oncol*. 2015 Sep;10(9):1319–27.

150. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the novel and specific PI3K $\alpha$  inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther*. 2014 May;13(5):1117–29.
151. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, et al. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*. 1999 Apr 8;18(14):2343–50.
152. Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C, et al. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res*. 2010 Aug 1;70(15):6233–7.
153. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res*. 2003 Oct 1;63(19):6272–81.
154. Siddiqui SS, Loganathan S, Krishnaswamy S, Faoro L, Jagadeeswaran R, Salgia R. C. elegans as a model organism for in vivo screening in cancer: effects of human c-Met in lung cancer affect C. elegans vulva phenotypes. *Cancer Biol Ther*. 2008 Jun;7(6):856–63.
155. Liu S, Meric-Bernstam F, Parinyanitikul N, Wang B, Eterovic AK, Zheng X, et al. Functional consequence of the MET-T1010I polymorphism in breast cancer. *Oncotarget*. 2015 Feb 20;6(5):2604–14.
156. Zaffaroni D, Spinola M, Galvan A, Falvella FS, Pazzaglia S, Saran A, et al. Met proto-oncogene juxtamembrane rare variations in mouse and humans: differential effects of Arg and Cys alleles on mouse lung tumorigenesis. *Oncogene*. 2005 Feb 3;24(6):1084–90.
157. Arriola E, Cañadas I, Arumí-Uría M, Dómine M, Lopez-Vilariño JA, Arpi O, et al. MET phosphorylation predicts poor outcome in small cell lung carcinoma and its inhibition blocks HGF-induced effects in MET mutant cell lines. *Br J Cancer*. 2011 Sep 6;105(6):814–23.
158. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Jun;7(6):504–16.
159. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*. 1997 May;16(1):68–73.
160. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2207–14.
161. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov*. 2015 Aug;5(8):850–9.
162. Phase I study of receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor, MGCD265, in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. [cited 2016 May 18]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/146788-156>



163. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P, et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol*. 2016 Mar 1;34(7):721–30.
164. Medová M, Pochon B, Streit B, Blank-Liss W, Francica P, Stroka D, et al. The novel ATP-competitive inhibitor of the MET hepatocyte growth factor receptor EMD1214063 displays inhibitory activity against selected MET-mutated variants. *Mol Cancer Ther*. 2013 Nov;12(11):2415–24.
165. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2015 Aug;16(8):928–36.
166. Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015 Oct;139(1):10–6.
167. Choueiri TK, Vaishampayan U, Rosenberg JE, Logan TF, Harzstark AL, Bukowski RM, et al. Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):181–6.
168. Zillhardt M, Park S-M, Romero IL, Sawada K, Montag A, Krausz T, et al. Foretinib (GSK1363089), an orally available multikinase inhibitor of c-Met and VEGFR-2, blocks proliferation, induces anoikis, and impairs ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):4042–51.
169. heppard KE, Cullinane C, Hannan KM, Wall M, Chan J, Barber F, et al. Synergistic inhibition of ovarian cancer cell growth by combining selective PI3K/mTOR and RAS/ERK pathway inhibitors. *Eur J Cancer*. 2013 Dec;49(18):3936–44.
170. Santiskulvong C, Konecny GE, Fekete M, Chen K-YM, Karam A, Mulholland D, et al. Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17(8):2373–84.
171. Kinross KM, Brown DV, Kleinschmidt M, Jackson S, Christensen J, Cullinane C, et al. In vivo activity of combined PI3K/mTOR and MEK inhibition in a Kras(G12D);Pten deletion mouse model of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*. 2011 Aug;10(8):1440–9.
172. Psyrri A, Kountourakis P, Yu Z, Papadimitriou C, Markakis S, Camp RL, et al. Analysis of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. *Ann Oncol*. 2007 Apr;18(4):709–15.
173. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, et al. p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*. 1999 Nov 1;59(21):5572–7.


174. Köbel M, Reuss A, du Bois A, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, et al. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol*. 2010 Oct;222(2):191–8.
175. Li D, Marchenko ND, Schulz R, Fischer V, Velasco-Hernandez T, Talos F, et al. Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2011 May;9(5):577–88.
176. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):38–51.
177. Li D, Marchenko ND, Moll UM. SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ*. 2011 Dec;18(12):1904–13.
178. Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett*. 2009 Aug 8;280(2):145–53.
179. Fu S, Hou MM, Naing A, Janku F, Hess K, Zinner R, et al. Phase I study of pazopanib and vorinostat: a therapeutic approach for inhibiting mutant p53-mediated angiogenesis and facilitating mutant p53 degradation. *Ann Oncol*. 2015 May;26(5):1012–8.
180. Matulonis U, Berlin S, Lee H, Whalen C, Obermayer E, Penson R, et al. Phase I study of combination of vorinostat, carboplatin, and gemcitabine in women with recurrent, platinum-sensitive epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Aug;76(2):417–23.
181. Buller RE, Shahin MS, Horowitz JA, Runnebaum IB, Mahavni V, Petrauskas S, et al. Long term follow-up of patients with recurrent ovarian cancer after Ad p53 gene replacement with SCH 58500. *Cancer Gene Ther*. 2002 Jul;9(7):567–72.
182. Djordjevic B, Hennessy BT, Li J, Barkoh BA, Luthra R, Mills GB, et al. Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing. *Mod Pathol*. 2012 May;25(5):699–708.
183. Bakkar RM, Xie S-S, Urbauer DL, Djordjevic B, Vu K, Broaddus RR. Intact PTEN Expression by Immunohistochemistry is Associated With Decreased Survival in Advanced Stage Ovarian/Primary Peritoneal High-grade Serous Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2015 Nov;34(6):497–506.
184. McEllin B, Camacho CV, Mukherjee B, Hahm B, Tomimatsu N, Bachoo RM, et al. PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Cancer Res*. 2010 Jul 1;70(13):5457–64.
185. Abe A, Minaguchi T, Ochi H, Onuki M, Okada S, Matsumoto K, et al. PIK3CA overexpression is a possible prognostic factor for favorable survival in ovarian clear cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2013 Feb;44(2):199–207.

186. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim J-S, et al. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*. 2009 Sep;1(6–7):315–22.
187. Kinross KM, Montgomery KG, Kleinschmidt M, Waring P, Ivetac I, Tikoo A, et al. An activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):553–7.
188. Phosphatase and tensin homologue (PTEN) loss and response to phase I trials targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. [cited 2015 Nov 18]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/51867-74>
189. Hyman DM, Snyder AE, Carvajal RD, Gerecitano JF, Voss MH, Ho AL, et al. Parallel phase Ib studies of two schedules of buparlisib (BKM120) plus carboplatin and paclitaxel (q21 days or q28 days) for patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Apr;75(4):747–55.
190. Ledermann JA. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2016 Apr;27 Suppl 1:i40–4.
191. Jenner ZB, Sood AK, Coleman RL. Evaluation of rucaparib and companion diagnostics in the PARP inhibitor landscape for recurrent ovarian cancer therapy. *Future Oncol*. 2016 Apr 18;
192. Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermarck U, Jasin M, Pierce AJ, et al. Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11597–604.
193. Chan N, Pires IM, Bencokova Z, Coackley C, Luoto KR, Bhogal N, et al. Contextual synthetic lethality of cancer cell kill based on the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2010 Oct 15;70(20):8045–54.
194. Liu JF, Tolaney SM, Birrer M, Fleming GF, Buss MK, Dahlberg SE, et al. A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Sep;49(14):2972–8.
195. Liu JF, Barry WT, Birrer M, Lee J-M, Buckanovich RJ, Fleming GF, et al. Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014 Oct;15(11):1207–14.
196. A phase 1b dose-escalation study of BYL719 plus binimetinib (MEK162) in patients with selected advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. [cited 2015 Nov 17]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/129278-144>
197. Genotype matched treatment for patients with advanced type I epithelial ovarian cancer (EOC). *J Clin Oncol*. [cited 2015 Oct 30]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/130816-144>
198. Bedard PL, Tabernero J, Janku F, Wainberg ZA, Paz-Ares L, Vansteenkiste J, et al. A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in

combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. Clin Cancer Res. 2015 Feb 15;21(4):730–8.

199. A phase I study of ARQ 197 in combination with temsirolimus in advanced solid tumors. J Clin Oncol. [cited 2015 Nov 18]; Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/152364-156>

## ANNEXE 1 : Mode opératoire de la coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) en méthode manuelle.

 Institut de Cancérologie de Lorraine Alexis Vautrin		DATE D'APPLICATION : 16/12/2014 VERSION : 03.00 PAGE : 1/3	IDENTIFICATION MO/ANAP/510
TITRE		MODE OPERATOIRE D'UNE COLORATION HES MANUELLE EN ANAPATH	
	Nom (s)	Fonction (s)	Date
REDACTION	Christine CARDOT	Technicienne de laboratoire	04/11/2014
	Anne LECLERC	Technicienne de laboratoire	04/11/2014
	Alexandre SIMONOT	Technicien de laboratoire	04/11/2014
VALIDATION	Dr Agnès LEROUX	Responsable du service de Biopathologie	Accord tacite
	Valérie CHAMBONNIERE	Cadre du service de Biopathologie	18/11/2014
APPROBATION QUALITE ACCORD POUR DIFFUSION			16/12/2014
SI VOUS UTILISEZ UN EXEMPLAIRE PAPIER DE CE DOCUMENT, VERIFIER LA PRESENCE DU LOGO « ASSURANCE QUALITE » ROUGE. SANS CE LOGO, CONSIDEREZ CE DOCUMENT PAPIER COMME NON MAITRISE.			

### 1. Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire définit les modalités de réalisation d'une coloration HES (Hématoxyline Eosine Safran) en technique manuelle par les techniciens ACP.

**Mots clés :** coloration HES

### 2. Responsabilités

La mise en oeuvre et la mise à jour de ce mode opératoire sont assurées par les techniciens du laboratoire ACP.

### 3. Documents de référence

Norme NF EN ISO 1589/2007

SH REF 02

Mode opératoire de réalisation des lames standards

### 4. Mode opératoire

Filtrer si besoin l'éosine et l'hématoxyline, des bacs de coloration manuelle.

Réaliser des lames standards (cf mode opératoire de réalisation des lames standards), et les mettre sur un portoir métallique.


❖ Mode opératoire : passer les lames dans les différents réactifs selon les temps indiqués ci-dessous.

Remarque : Pour toute manipulation des réactifs, lors de la préparation de ceux-ci ou lors de la coloration, le port de gants et de lunettes de protection est obligatoire. Les manipulations se feront sur hotte aspirante.

Réactifs	Temps
Xylène	5'
Alcool anhydre	10 passages

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs.

© Tous droits réservés

	Identification MO/ANAP/510	Version 03.00
	Mode opératoire d'une coloration HES manuelle en Anapath	Page 2 sur 3



Alcool 96°	10 passages
Eau courante	5"
Hématoxyline de GILL 2	7"
Rinçage eau courante	Quelques passages (eau claire)
Alcool chlorhydrique	5 passages
Eau bicarbonatée	1"
Rinçage eau courante	Quelques passages
Alcool anhydre	10 passages
Eosine Y	20"
Alcool anhydre	1"
Safran	2"
Alcool anhydre	Rinçage (pissette)
Xylène	

Montage des lames avec lamelle et un milieu de montage adéquat (type Pertex).

Changer les réactifs et les colorants en début de semaine .

## 5. Annexes

### PREPARATION DES SOLUTIONS


- Alcool chlorhydrique : dans un bidon de 5 L mélanger 50 mL d'acide chlorhydrique à 37% dans 5 L d'alcool à 96°.
- Safran (préparation par extraction à l'alcool) :
  - Mettre 30 g d'étamines de safran dans un récipient, placé dans l'étuve d'histologie à 60° pendant une nuit, afin de faire sécher les étamines.
  - Broyer les étamines à l'aide d'un pilon.
  - Mettre les étamines broyées, une poignée de billes de verre et 1 L d'alcool anhydre dans un ballon.
  - Monter l'alambic sur le ballon et mettre dans un chauffe ballon.
  - Connecter le tuyau d'arrivée d'eau de l'alambic au robinet dans l'oriel.
  - Régler le débit d'eau et allumer le chauffe ballon.
  - Faire bouillir le mélange pendant 6 heures.
  - Arrêter le chauffage et laisser refroidir le mélange.
  - Récupérer la partie liquide et la conserver.
  - Le lendemain, refaire bouillir les étamines et les billes de verre avec 1 L d'alcool anhydre pendant 6h.
  - Récupérer la partie liquide et la conserver.
  - Mélanger les deux solutions obtenues = solution mère (à mettre dans une bouteille dans l'armoire pour produit inflammable). Mélanger ¼ de la solution mère à ¾ d'alcool anhydre = solution fille. (à mettre dans une pissette).

### REFERENCES DES REACTIFS

Xylène de VWR (prêt à l'emploi)	28973.363
Alcool anhydre de VWR (prêt à l'emploi)	PROL83813.360
Alcool 96° de VWR (prêt à l'emploi)	PROL83804.360
Acide chlorhydrique à 37% de VWR, HCL	20255 :290
Hématoxyline de Gill 2 THERMO SCIENTIFIC(prêt à l'emploi)	6765008
Eosine Y THERMO SCIENTIFIC(prêt à l'emploi)	6766008

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs.

© Tous droits réservés

	Identification MO/ANAP/510	Version 03.00
	Mode opératoire d'une coloration HES manuelle en Anapath	Page 3 sur 3



Safran de Gatinais en pistil RAL 10 gr

720.0184

### LOCALISATION DES SOLUTIONS

Les produits sont stockés dans les armoires ventilées et pour produits inflammables d'histologie.  
e safran (solution fille) se trouve dans une pissette étiquetée sur la paillasse.

### POSITION DES BACS

EOSINE	EAU BICARBONATEE
HEMATOXYLINE	ETHANOL HCL
XYLENE	
XYLENE	
ETHANOL 96°	
ETHANOL ANHYDRE	

## 6. Historique des modifications

Date	Version	Description	Rédacteur(s)
01/02/2010	0	Mise en application du document validé	S. Cours
25/03/2014	01.00	Remplacement du Toluène par le Xylène, suppression du paragraphe sur la préparation de l'éosine puisqu'utilisation de l'éosine prête à l'emploi (1%)	C. Cardot
29/04/2014	02.00	Ajout Acide chlorhydrique et ammoniaque dans références réactifs + ajout montage alambic	A. Simonot / C. Cardot
16/12/2014	03.00	Modification complète de la coloration due au changement de fixateur	A. Leclerc/ A. Simonot / C. Cardot

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs.

© Tous droits réservés

## **Protocol: DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit)**

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit.

### **Important points before starting**

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 17).
- Avoid repeated freezing and thawing of stored samples, since this leads to reduced DNA size.
- Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR. If RNA-free genomic DNA is required, include the RNase A digest, as described in step 5a of the protocol.

### **Things to do before starting**

- Equilibrate the sample to room temperature (15–25°C).
- Heat 2 water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 3, and one to 70°C for use in step 5.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

### **Procedure**

- 1. Excise the tissue sample or remove it from storage. Determine the amount of tissue. Do not use more than 25 mg (10 mg spleen).**

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

If DNA is prepared from spleen tissue, no more than 10 mg should be used.

The yield of DNA will depend on both the amount and the type of tissue processed.

1 mg of tissue will yield approximately 0.2–1.2 µg of DNA.



2. **Cut up (step 2a), grind (step 2b), or mechanically disrupt (step 2c) the tissue sample.**

The QIAamp procedure requires no mechanical disruption of the tissue sample, but lysis time will be reduced if the sample is ground in liquid nitrogen (step 2b) or mechanically homogenized (step 2c) in advance.

- 2a. **Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces. Place in a 1.5 ml microcentrifuge tube, and add 180  $\mu$ l of Buffer ATL. Proceed with step 3.**

It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time.

2 ml microcentrifuge tubes may be better suited for lysis.

- 2b. **Place up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into 1.5 ml microcentrifuge tube. Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw, and add 180  $\mu$ l of Buffer ATL. Proceed with step 3.**

- 2c. **Add up to 25 mg of tissue (10 mg spleen) to a 1.5 ml microcentrifuge tube containing no more than 80  $\mu$ l PBS. Homogenize the sample using the TissueRuptor or equivalent rotor-stator homogenizer. Add 100  $\mu$ l Buffer ATL, and proceed with step 3.**

Some tissues require undiluted Buffer ATL for complete lysis. In this case, grinding in liquid nitrogen is recommended. Samples cannot be homogenized directly in Buffer ATL, which contains detergent.

3. **Add 20  $\mu$ l proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.**

**Note:** Proteinase K must be used. QIAGEN Protease has reduced activity in the presence of Buffer ATL.

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h. Lysis overnight is possible and does not influence the preparation. To ensure efficient lysis, a shaking water bath or a rocking platform should be used. If not available, vortexing 2–3 times per hour during incubation is recommended.

4. **Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**
5. **If RNA-free genomic DNA is required, follow step 5a. Otherwise, follow step 5b.**

Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR.

- 5a. First add 4  $\mu$ l RNase A (100 mg/ml), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature (15–25°C). Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200  $\mu$ l Buffer AL to the sample. Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL. In most cases it will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

- 5b. Add 200  $\mu$ l Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70°C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

6. Add 200  $\mu$ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.

It is essential that the sample, Buffer AL, and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure or with any subsequent application.

Do not use alcohols other than ethanol since this may result in reduced yields.

7. Carefully apply the mixture from step 6 (including the precipitate) to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.\*

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

It is essential to apply all of the precipitate to the QIAamp Mini spin column.

Centrifugation is performed at 6000  $\times$  g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all the solution has passed through.

\* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.\*
9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.
10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.
12. Repeat step 11.

A 5 min incubation of the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water, before centrifugation, generally increases DNA yield.

A third elution step with a further 200 µl Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 25). Eluting with 4 x 100 µl instead of 2 x 200 µl does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and placing at -20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

Yields of DNA will depend both on the amount and the type of tissue processed. 25 mg of tissue will yield approximately 10–30 µg of DNA in 400 µl of water (25–75 ng/µl), with an  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, length, and purity, refer to pages 24–25 and Appendix A, page 50.

\* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

ANNEXE 3 : Feuille de travail pour la préparation d’une plaque de PCR-HRM (9 patients) pour l’analyse des mutations de l’exon 3 du gène KRAS et des exons 2, 3 et 4 du gène NRAS.

Détection de Mutations par Technologie High Melting Resolution (HRM) KRAS exons 3 et NRAS exons 2,3,4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
K3	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
N2	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
N3	E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
	F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
N4	G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix
	H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TM	TnM	Mix

Schéma de la plaque 96 puits pour le dépôt des mixes (une couleur par mix) et des ADN des patients (1 numéro par patient)

Nombre de prélèvements à analyser (x2) + 5

29

Mix réactionnel à préparer

Réactifs :	Volume (µl)	Volume à préparer (µl)
Master Mix	10.0	290
MgCl <sub>2</sub>	3.0	87
Amorce R	0.8	23.2
Amorce F	0.8	23.2
Eau	3.4	98.6

Volume de dépôt de mix : 18 µl

Volume de dépôt d'ADN à 10 ng/µl : 2µl

Programme PCR

Pré-incubation

95°C - 10min

Amplification

95°C - 10sec

65°C - 15sec

72°C - 30sec

45 cycles

HRM

95°C - 1min

40°C - 2min

70 - 1sec

95

0.02°C/sec

Refroidissement

40°C - 10sec

Témoins

TM = Calu-6 = K3

TM = Molt-4 = N2

TM = MZ-2 = N3

TnM = WDR

Amorces exons 3 KRAS et exons 2,3,4 NRAS

Dilutions des amorces à 10µM :  
Amorce R à 100µM : 20µl d'amorce + 180 µl dH2O  
Amorce F à 100µM : 20µl d'amorce + 180µl dH2O

1 = PATIENT

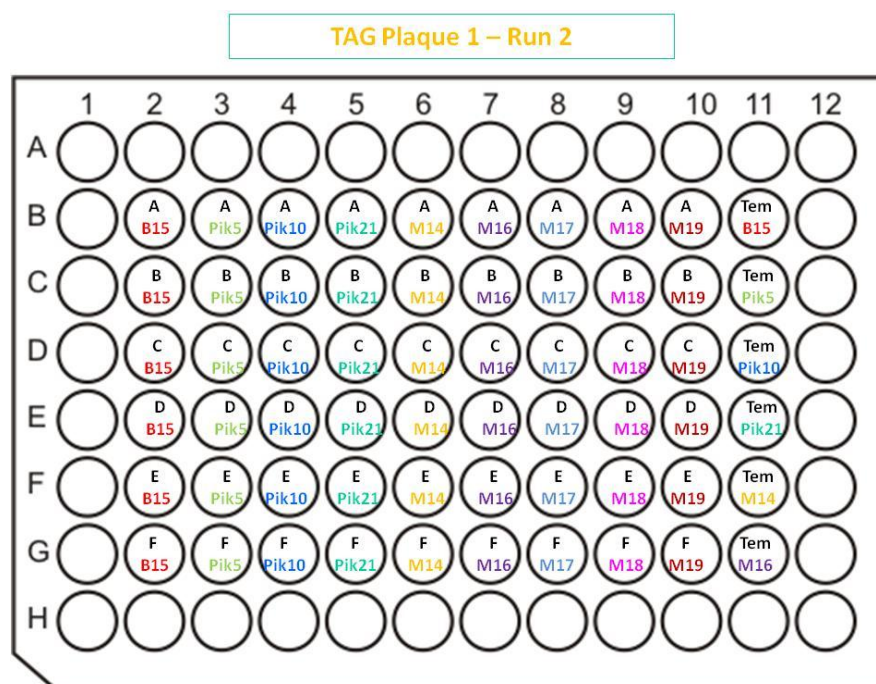
TM = Témoin muté

TnM = Témoin non muté

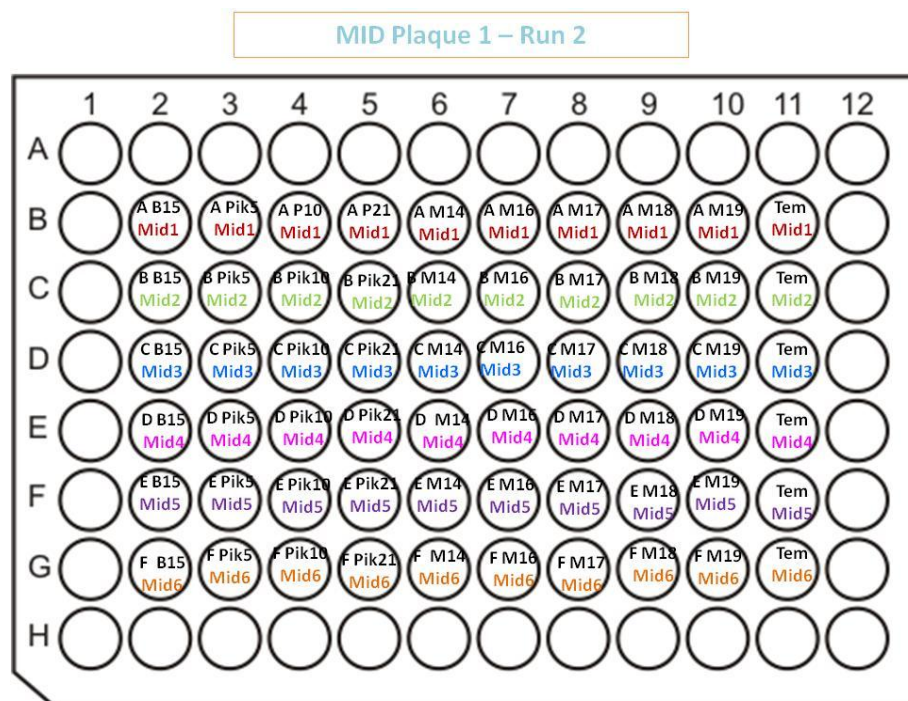
FO/ANAP/323 Version 00.00



**ANNEXE 4 : Exemples des schémas de plaques 96 puits pour les PCR TAG et PCR MID.**



En couleur sont inscrits les noms des mix à déposer (24µL par puits). En noir sont indiquées les lettres des ADN patientes à déposer (1µL par puits). Les témoins sont constitués des mix seuls. B15 : *BRAF* exon 15 – Pik5 = *PIK3CA* exon 5 – Pik10 = *PIK3CA* exon 10 – Pik21 = *PIK3CA* exon 21 – M14 = *MET* exon 14 – M16 = *MET* exon 16 – M17 = *MET* 17 - M18 = *MET* exon 18 – M19 = *MET* exon 19



En couleur sont inscrits les noms des mix des MID à déposer (24µL par puits). En noir sont indiqués les amplicons de la PCR TAG à déposer (1µL par puits). Les témoins sont constitués des mix seuls.

**ANNEXE 5 : Schéma de plaque 96 puits du dosage de 26 échantillons au Picogreen.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Std1 = 1/40	Std1 = 1/40	Ech1	Ech1	Ech1	Ech9	Ech9	Ech9	Ech17	Ech17	Ech17	Blanc
<b>B</b>	Std2 = 1/20	Std2 = 1/20	Ech2	Ech2	Ech2	Ech10	Ech10	Ech10	Ech18	Ech18	Ech18	Blanc
<b>C</b>	Std3 = 1/10	Std3 = 1/10	Ech3	Ech3	Ech3	Ech11	Ech11	Ech11	Ech19	Ech19	Ech19	Ech 25
<b>D</b>	Std4 = 1/5	Std4 = 1/5	Ech4	Ech4	Ech4	Ech12	Ech12	Ech12	Ech20	Ech20	Ech20	Ech 25
<b>E</b>	Std5 = 3/10	Std5 = 3/10	Ech5	Ech5	Ech5	Ech13	Ech13	Ech13	Ech21	Ech21	Ech21	Ech 25
<b>F</b>	Std6 = 2/5	Std6 = 2/5	Ech6	Ech6	Ech6	Ech14	Ech14	Ech14	Ech22	Ech22	Ech22	Ech26
<b>G</b>	Std7 = 1/2	Std7 = 1/2	Ech7	Ech7	Ech7	Ech15	Ech15	Ech15	Ech23	Ech23	Ech23	Ech26
<b>H</b>	Std8 = 1 (2µg/µL)	Std8 = 1 (2µg/µL)	Ech8	Ech8	Ech8	Ech16	Ech16	Ech16	Ech24	Ech24	Ech24	Ech26

Dans les deux premières colonnes sont déposées en duplicat différentes dilutions d'un ADN standard dilué à 2µg/µL. Dans les autres puits de la plaque sont déposés en triplicat les échantillons à doser, dilués au 1/100<sup>ème</sup>. L'ajout de Picogreen dans toute la plaque permet l'obtention d'une droite étalon. Grâce à l'équation de cette droite sont déterminées les concentrations des échantillons.

**ANNEXE 6 : Détermination de la dilution des échantillons purifiés suite au dosage par Picogreen.**

D'après : 454-LIFESCIENCESCORP. 2012. Amplicon Library Preparation Method Manual GS Junior Titanium Series 454 Life Sciences Corp.

## Amplicon Library Preparation Method Manual

### 3.4.3 Amplicon Dilution and Pooling

1. Calculate the concentration of each Amplicon in molecules/μl, using the following equation:

$$\text{Molecules}/\mu\text{l} = \frac{(\text{Sample conc. ; ng}/\mu\text{l}) \times 6.022 \times 10^{23}}{656.6 \times 10^9 \times \text{amplicon length; bp}}$$

2. Dilute each Amplicon (separately) to  $1 \times 10^9$  molecules/μl, in 1x TE Buffer. This is easily done by adding **1 μl** of each Amplicon sample in the volume of TE calculated as follows:

$$\left( \frac{\text{Molecules}/\mu\text{l (from Step 1)}}{10^9} - 1 \right) \mu\text{l}$$

3. If multiple Amplicons are to be sequenced together, *i.e.* within a region of a PicoTiterPlate device (which is typical), mix an equal volume (*e.g.* 10 μl) of each of these diluted Amplicons to prepare Amplicon pools.
4. Dilute each Amplicon pool to  $10^7$  molecules/μl by adding 2 μl of the Amplicon pool from Step 3 to 198 μl Molecular Biology Grade Water. Store the  $1 \times 10^9$  molecules/μl stock and the diluted aliquots at -15 to -25°C.

Ce raisonnement mathématique montre comment obtenir le volume de TE1X à ajouter à 1μL d'échantillon pour obtenir une concentration de  $10^9$  molécules d'ADN/μL, après avoir déterminé la concentration de l'échantillon par dosage au Picogreen.

## ANNEXE 7 : Résultats d'analyse des échantillons par les techniques de PCR-HRM, séquençage et immunohistochimie.

Patientes	Type histologique de la tumeur	Statut mutationnel																	Expression tissulaire			
		Résultats HRM				Résultats séquençage													P53 (expression nucléaire)	PTEN (expression cytoplasmique)		
		<i>KRAS</i> (exons 2, 3, 4)	<i>NRAS</i> (exons 2, 3, 4)	<i>BRAF</i> (exon 15)	<i>PIK3CA</i> (exons 10 et 21)	<i>KRAS</i> (exons 2, 3, 4)			<i>NRAS</i> (exons 2, 3, 4)			<i>BRAF</i> (exon 15)			<i>PIK3CA</i> (exons 5, 10, 21)			<i>MET</i> (exons 14, 16, 17, 18, 19)				
		c.	p.	FMA	c.	p.	FMA	c.	p.	FMA	c.	p.	FMA	c.	p.	FMA	c.	p.	FMA			
1	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			Exon 10 c.1571G>A p.R524K 15,65			WT			-	NI
2	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	-
3	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	NI
4	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			Exon 14 c.3029C>T p.T1010I 58,65			+	NI
5	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
6	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			Exon 5 c.1037T>A p.L346Q 60,32			WT			+	NI
7	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	NI
8	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			-	+
9	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
10	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
11	Carcinome endométrioïde	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			-	-
12	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	-
13	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
14	Carcinome endométrioïde	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
15	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	NI
16	Carcinome séreux	WT	Exon 3 muté	WT	WT	WT			Exon 3 c.181C>Ap.Q61K 24,12			WT			WT			WT			-	+
17	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
18	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
19	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			Exon 14 c.2962C>T p.R988C 65,28			+	-
20	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
21	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	-
22	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
23	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	-
24	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	+
25	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	WT			WT			WT			WT			WT			+	-
26	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			+	-
27	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			+	+
28	Carcinome séreux	WT	Exon 3 muté	WT	WT	Non analysé			Exon 3 c.181C>Ap.Q61K 24,68			WT			WT			WT			-	+
29	Carcinome à cellules claires	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			Exon 10 c.1571G>A p.R524K 17,08			WT			-	-
30	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			-	+
31	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			-	+
32	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			+	+
33	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			+	+
34	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			Exon 14 c.3029C>A p.T1010I 45,05			-	-
35	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé			Non analysé			WT			WT			WT			+	+
36	Carcinome à cellules claires	WT	WT	WT	Exon 21 muté	Non analysé			Non analysé			WT			Exon 21 c.3139C>T p.H1047Y 37,41			WT			-	+



37	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	+	-
38	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	-	+
39	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	<b>Exon 14</b> c.3029C>A p.T1010I 82,77	-	-
40	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	-	+
41	Carcinome endométrioïde	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	-	+
42	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	-	+
43	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	<b>Exon 10</b> c.1571G>A p.R524K 5,01	WT	+	-
44	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	-	-
45	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	+	-
46	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	<b>Exon 18</b> c.3619G>A p.A1207T 32,87	+	+
47	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	-	+
48	Carcinome à cellules claires	WT	WT	WT	<b>Exon 21 muté</b>	Non analysé	Non analysé	WT	<b>Exon 21</b> c.3140A<G p.H1047R 41,69	WT	-	-
49	Carcinome séreux	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	+	-
50	Carcinome non déterminé	WT	WT	WT	WT	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	+	-
51	Carcinome séreux	Non analysé	Non analysé	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	WT	WT	-	+
52	Carcinome à cellules claires	Non analysé	Non analysé	Non analysé	Non analysé	<b>Exon 2</b> c.35 G>T p.G12V 40,79	WT	WT	WT	WT	-	NI
53	Carcinome séreux	Non analysé	Non analysé	Non analysé	Non analysé	WT	WT	WT	WT	WT	-	-

<b><u>Légende :</u></b>
<b>WT</b> : Wild Type
<b>FMA</b> : Fréquence of Mutated Allele
- : Pas d'expression de la protéine
+ : Expression tissulaire de la protéine recherchée
NI : Non interprétable

## Submitted to International Journal of Oncology

# Beside P53 and PTEN: identification of molecular alterations of RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in high-grade serous ovarian carcinomas. Towards new therapeutic targets ?

Submitted by: Alexandre Harlé©, created on 04-04-2016

Type of Article: Article

### Abstract

**Objectives:** Despite the great histological and molecular heterogeneity, the clinical management of high-grade ovarian carcinoma remains univocal. As a major subgroup, high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOC) need novel therapy. Additionally to conventional histological prognostic markers and oncogenetic investigations, molecular diagnostic was performed using NGS to identify "druggable" targets that could provide access to innovative therapy. **Methods:** This study was performed in 45 HGSOC patients (pts) (mean age 59.1, range 25-87) with histologically proven HGSOC. BRCA1/2 germline mutations were screened in 17 pts with familial/personal cancer history justifying oncogenetic investigations. P53 and PTEN expression was assessed on formalin fixed paraffin-embedded tissues using immunohistochemistry. Somatic mutations of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and MET were screened using NGS on DNA extracts from frozen tumor specimens taken at diagnosis. **Results:** With a median follow-up of 38 months (range 6;93), 20 pts are alive, 10 pts disease-free and 14 progressed within 6 months after platinum-based therapy. P53 overexpression was detected in 67% and PTEN loss in 38% of the patients. Overexpression of mutant P53 was found to be associated with longer progression-free/overall survival. Two NRAS (exon 3), 3 PIK3CA (exon 5 and 10) and 5 MET mutations (exons 14 and 18) were detected. **Conclusion:** In HGSOC, beside P53 and PTEN alterations, somatic genetic abnormalities can be detected using NGS and provide molecular rationale for targeted therapies, potentially offering new therapeutic opportunities to the patients.

### Authors

Name	Institute	Email Address
Dr ShuHui Chen	Institut de Cancérologie de Lorraine	sh.chen@nancy.unicancer.fr
Miss Elisa Cavazza	Institut de Cancérologie de Lorraine	ubt@nancy.unicancer.fr
Dr Catherine Barlier	Institut de Cancérologie de Lorraine	c.barlier@nancy.unicancer.fr
Miss Julia Salleron	Institut de Cancérologie de Lorraine	j.salleron@nancy.unicancer.fr
Mr Pierre Filhine-Tresarrieu	Institut de Cancérologie de Lorraine	pierre.filhine-tresarrieu@hotmail.fr
Dr Céline Gavaille	Institut de Cancérologie de Lorraine	c.gavaille@nancy.unicancer.fr
Professor Jean-Louis Merlin	Institut de Cancérologie de Lorraine	jl.merlin@nancy.unicancer.fr
Dr Alexandre Harlé [Corresponding]	Institut de Cancérologie de Lorraine	a.harle@nancy.unicancer.fr

### Files

File Name	Type	Uploaded
CoverLetter.docx	Letter to the Editor	04-04-2016
Table 4.docx	Table	04-04-2016
Table 1.docx	Table	04-04-2016
Table 3.docx	Table	04-04-2016
Table 2.docx	Table	04-04-2016
Chen SH et al Int J Oncol.docx	Manuscript	04-04-2016
Figure 1.pdf	Figures and Images	04-04-2016

Dear Editor,

Please find enclosed our article entitled "**Beside P53 and PTEN: identification of molecular alterations of RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in high-grade serous ovarian carcinomas. Towards new therapeutic targets ?**" for submission to International Journal of Oncology.

In this paper, beside the analysis of oncogenic alterations of P53 and PTEN expression, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and MET mutations were screened as putative sources of RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways activators. The relation of these alterations with the clinical outcome of patients with HGSOC was then evaluated. We found that expression of non-null mutant P53 is associated with longer progression-free/overall survival and may be new "druggable" targets. We also show that mutant MET, NRAS or PIK3CA present in HGSOC may be new druggable targets for innovative therapy.

This study has been approved by scientific committee of Institut de Cancérologie de Lorraine and all the patients gave their formal consent for this study. This paper has not been and is not meant to be published in other journals and no conflict of interest could be raised from this work.

All the authors approve the observations, the results and the conclusions described in the manuscript.

Yours sincerely,

Dr. Alexandre Harlé

**1 Beside P53 and PTEN: identification of molecular alterations of RAS/MAPK and**  
**2 PI3K/AKT signaling pathways in high-grade serous ovarian carcinomas.**  
**3 Towards new therapeutic targets ?**

4 ShuHui Chen<sup>1,2,3\*</sup>, Elisa Cavazza<sup>1\*</sup>, Catherine Barlier<sup>1</sup>, Julia Salleron<sup>4</sup>, Pierre  
5 Filhine-Tresarrieu<sup>1</sup>, Céline Gavoille<sup>5</sup>, Jean-Louis Merlin<sup>1,2,3\*</sup>, Alexandre Harlé<sup>1,2,3\*</sup>

6 <sup>1</sup> Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 54001 Nancy, France

7 <sup>2</sup> CNRS UMR 7039 CRAN, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France

8 <sup>3</sup> Institut de Cancérologie de Lorraine, Service de Biopathologie, 54519 Vandoeuvre  
9 les Nancy, France

10 <sup>4</sup> Institut de Cancérologie de Lorraine, Cellule Data Biostatistiques, 54519  
11 Vandoeuvre les Nancy, France

12 <sup>5</sup> Institut de Cancérologie de Lorraine, Département d'Oncologie Médicale, 54519  
13 Vandoeuvre les Nancy, France

14 \*Contributed equally to the study

15 Correspondance: Dr Alexandre Harlé, Institut de Cancérologie de Lorraine, Service  
16 de Biopathologie, 54519 Vandoeuvre les Nancy, France.

17 Tel +33 383598484, Fax +33 383598569

18 Email a.harle@nancy.unicancer.fr

**19 KEYWORDS**

20 High-grade serous ovarian carcinoma; signaling pathway; HRM (High Resolution  
21 Melting) PCR; Immunohistochemistry; NGS; Targeted Therapy

## 22 ABSTRACT

23 *Objectives:* Despite the great histological and molecular heterogeneity, the clinical  
24 management of high-grade ovarian carcinoma remains univocal. As a major  
25 subgroup, high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOC) need novel therapy.  
26 Additionally to conventional histological prognostic markers and oncogenetic  
27 investigations, molecular diagnostic was performed using NGS to identify "druggable"  
28 targets that could provide access to innovative therapy.

29 *Methods:* This study was performed in 45 HGSOC patients (pts) (mean age 59.1,  
30 range 25-87) with histologically proven HGSOC. *BRCA1/2* germline mutations were  
31 screened in 17 pts with familial/personal cancer history justifying oncogenetic  
32 investigations. P53 and PTEN expression was assessed on formalin fixed  
33 paraffin-embedded tissues using immunohistochemistry. Somatic mutations of  
34 *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *MET* were screened using NGS on DNA extracts  
35 from frozen tumor specimens taken at diagnosis.

36 *Results:* With a median follow-up of 38 months (range 6;93), 20 pts are alive, 10 pts  
37 disease-free and 14 progressed within 6 months after platinum-based therapy. P53  
38 overexpression was detected in 67% and PTEN loss in 38% of the patients.  
39 Overexpression of mutant P53 was found to be associated with longer  
40 progression-free/overall survival. Two *NRAS* (exon 3), 3 *PIK3CA* (exon 5 and 10) and  
41 5 *MET* mutations (exons 14 and 18) were detected.

42 *Conclusion:* In HGSOC, beside P53 and PTEN alterations, somatic genetic  
43 abnormalities can be detected using NGS and provide molecular rationale for  
44 targeted therapies, potentially offering new therapeutic opportunities to the patients.

## 45 INTRODUCTION

46 Ovarian carcinoma is the seventh most common cancer in women worldwide, and  
47 the leading cause of death from gynecological malignancies (1). Despite the  
48 development of surgical techniques and emergence of novel chemotherapy agents,  
49 the 5-year overall survival rate remains as poor as nearly 30%. High grade serous  
50 carcinoma (HGSOC) is the dominant subgroup of ovarian carcinomas with rapid  
51 evolution, late diagnosis and very poor prognosis and justify the need of new  
52 therapeutic strategies (2). Many genetic alteration events are involved in the  
53 molecular mechanisms of cancer development, progression and metastasis.  
54 Understanding and elucidating these genetic aberrations in HGSOC could provide  
55 innovative therapeutic options with novel targeted agents.

56 P53 alterations are frequently detected in HGSOC and are associated with high  
57 tumor cell proliferation (2). Beside its interest as prognostic marker, P53 alterations  
58 could serve as a theranostic biomarker in HGSOC. As an example, destabilization  
59 and degradation of mutant P53 by the HDAC6 inhibitor vorinostat has been reported  
60 (3), leading to antitumor activity. Further, since tumor angiogenesis could be inhibited  
61 through the downregulation of VEGF induced by HDAC-mediated HIF inhibition (4),  
62 synergistic anti-tumor activity has been reported when combined inhibition of VEGF  
63 and HDAC was induced by pazopanib and vorinostat and demonstrated better  
64 anti-tumor activity with a significantly longer progression-free survival (PFS) and  
65 overall survival (OS) achieved in patients bearing mutant P53 solid tumors including  
66 ovarian cancers, than in P53 wild type tumors (5). Stratifying HGSOC patients on  
67 P53 alteration status has therefore been proposed as a molecular rationale for the  
68 addition of vorinostat to anti-VEGF maintenance therapy and may maximize the

69 clinical benefits limiting the significant toxicities related to the use of cytotoxic  
70 chemotherapy (6).

71 RAS/MAPK and PI3K/AKT and are two major intracellular signaling transduction  
72 pathways whose activation can result from loss of PTEN function, *PIK3CA*,  
73 *KRAS/NRAS*, *BRAF* gene mutations (7), and/or activating mutations of *MET* receptor  
74 (8) involved in the carcinogenesis of HGSOC. These genetic abnormalities are  
75 correlated with a decreased responsiveness to conventional chemotherapy and poor  
76 prognosis (9–11).

77 PI3K/AKT pathway is activated in approximately 70% of ovarian carcinoma,  
78 activation of this pathway is associated with higher invasive and migratory capacities  
79 of tumor cells and resistance to cytotoxic chemotherapy (12).

80 PTEN is a major negative regulator of PI3K signaling pathway and PTEN loss has  
81 been reported as a common driver event and prognostic classifier in HGSOC (13).  
82 Previous study has shown that IHC should be preferred for identifying loss of PTEN  
83 function (14). However, the relationship between loss of PTEN and patient outcome  
84 remains controversial (13,15).

85 Although *RAS* mutations have been considered as the molecular feature of the  
86 low-grade ovarian cancer, *NRAS* gene, member of the *RAS* family, was found as  
87 oncogenic driver in HGSOC, which indicates some overlapping of the molecular  
88 profiles of low and high grade ovarian carcinomas (16).

89 Pathologic activation of *MET* through *MET* gene mutation is well characterized as  
90 driver in oncogenesis (8) and has been reported to promote tumor proliferation,  
91 invasive growth, and angiogenesis, which are widely observed in HGSOC (7,17). In  
92 addition, *MET* activation can promote angiogenesis by activating common signaling  
93 pathways such as PI3K/AKT and RAS/MAPK, and it has been shown that the

94 hypoxic environment induced by anti-angiogenic agents could promote  
95 MET-dependent spreading of cancer cells (18). This suggests that the selective  
96 targeting of one pathway may induce the compensatory up-regulation of another one.  
97 This may explain that in clinical trials evaluating bevacizumab in ovarian carcinoma,  
98 no significant increase of overall survival was observed (19,20) and that, dual  
99 inhibition of MET/VEGFR2 in *MET*-mutated papillary renal carcinoma (21)  
100 demonstrated clinical benefit as observed in ovarian cancer models (22).  
101 In this study, beside the analysis of oncogenic alterations of P53 and PTEN  
102 expression, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *MET* mutations were screened as  
103 putative sources of RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways activators. The  
104 relation of these alterations with the clinical outcome of patients with HGSOC was  
105 then evaluated.



## 106 PATIENTS AND METHODS

### 107 Patients

108 Patients treated between January 2007 and December 2012 in our institution with a  
109 proven diagnosis of HGSOC were selected. In all cases, final diagnosis was  
110 established according to FIGO and WHO criteria. All women have received  
111 cytoreductive surgery and a platinum-based chemotherapy and were followed-up in  
112 the same institution. Tumor sample were taken before chemotherapy. This study has  
113 been approved by scientific committee of Institut de Cancérologie de Lorraine and all  
114 the patients gave their formal consent for this study.

### 115 Tumor samples

116 Formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens were used for  
117 immunohistochemistry (IHC). Hematoxylin-eosin (H&E) staining was performed on  
118 5-µm section and the tissue was validated by a senior pathologist. Only specimens  
119 with more than 20% tumor cells were used in the study.

120 Frozen tumor fragments were used for mutation analysis. Five-µm cryosections were  
121 immediately fixed in AFA (Alcohol, Formalin, acetic acid) then stained with  
122 hematoxylin-eosin (H&E) and the tissue was validated by a senior pathologist  
123 ensuring tumor cell content. Unfixed frozen macrodissected areas with more than  
124 20% tumor cells were then used for DNA extraction using QIAmp DNA mini kit  
125 (Qiagen). Extracted DNA was then purified and DNA concentration was measured by  
126 NanoVue (GE Healthcare) and finally stored at -80°C until processed for PCR and  
127 NGS.

### 128 Immunohistochemistry (IHC)

129 Five micrometer sections were cut from each block and deposited on an IHC specific  
130 slide with a distilled water drop and dried on a hot plate, then placed overnight in a  
131 stove at 56°C. The sections were deparaffinized and rehydrated using EZ Prep  
132 solution (Ventana Medical System Inc.) then restored with Cell Conditioner 1 (CC1,  
133 Ventana) for protein conformation. Primary mouse anti-human anti-PTEN antibody  
134 (D4.3, Dako) was incubated for 1 hour at room temperature (dilution 1:125) and  
135 primary anti-P53 antibody (DO-7, Dako) was incubated for 32 minutes at 42°C  
136 (dilution 1:50). The procedure was performed in a BenchMark Ultra® with UltraView  
137 Universal DAB Detection Kit (Ventana) and the sections were lightly counterstained  
138 with hematoxylin and « bluing reagent ». The IHC results were recorded as follows:  
139 cytoplasmic staining of PTEN was considered as positive, nuclear staining of P53  
140 was considered as positive. The interpretation of staining was blinded from the  
141 clinical outcome data.

#### 142 **Mutation analyses by High Resolution Melting PCR (HRM-PCR) and NGS**

143 PCR assays were performed to screen somatic mutations in *KRAS* and *NRAS* exons  
144 2, 3, 4, *BRAF* exon 15, and *PIK3CA* exons 10 and 21. PCR fragments were stained  
145 with Resolight® DNA fluorescent intercalant probe, then amplified using LightCycler®  
146 480 High Resolution Melting Master kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) in a  
147 LightCycler®480 thermocycler for 35 cycles (Roche Diagnostics).  
148 Appropriate positive and negative controls were included for each of the exons  
149 evaluated. Cell lines were used as positive controls were: Lovo, Calu6 and ML2  
150 (*KRAS* exon 2, 3 and 4); Molt 4, MZ2 and Nalm6 (*NRAS* exon 2, 3 and 4); HT29  
151 (*BRAF* exon 15); MCF7 and HCT116 (*PIK3CA* exon 10 and 21). The cell lines used

152 as negative control were: WIDR (*KRAS* and *NRAS* exon 2, 3 and 4); Lovo (*BRAF*  
153 exon15); MDA-MB231 (*PIK3CA* exon 10 and 21).

154 NGS was performed using ultra-deep biparallel pyrosequencing (GS Junior, Roche  
155 Diagnostics) to confirm and identify the somatic alterations detected by HRM-PCR  
156 and further investigate *PIK3CA* exon 5 and *MET* exon 14, 16, 17, 18, and 19. Firstly,  
157 for the library preparation, sequences of interest were amplified by TAG-PCR and  
158 MID-PCR using FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack kit (Roche  
159 Diagnostics). The procedure was performed using Nexus Mastercycler® (*Eppendorf*  
160 *AG, Hamburg, Germany*). The PCR products were then controlled by agarose gel  
161 electrophoresis and quantitated using Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay kit (Life  
162 Technologies, Eugene, Oregon, USA). DNA concentration was finally adjusted to  $10^6$   
163 DNA molecules/ $\mu$ L. Second, the prepared library was amplified by emulsion-PCR  
164 using GS Junior Titanium emPCR kit (Roche Diagnostics) and enriched with emPCR  
165 Bead Recovery Reagents kit (Roche Diagnostics) before being sequenced using GS  
166 Junior Titanium Sequencing kit (Roche Diagnostics) kit. Data were treated with  
167 Amplicon Variant Analyzer software (454 Life Sciences Corp. Roche, Branford,  
168 Connecticut, USA). Sequences were aligned with NM\_002524.4, NM\_006218.2 and  
169 NM\_000245.2 for references for *NRAS*, *PIK3CA* and *MET* sequences respectively  
170 and variant calling was processed. At X1000 depth, NGS sensitivity was 1%. A  
171 second data analysis using BWA 0.7.12 (mem algorithm, default parameters) for  
172 mapping and sorting and indexing using SAMtools was performed. VarScan2  
173 (mpileup2snp algorithm, with filters --min-coverage 100 --minreads 20 --min-var-freq  
174 0.01 --p-value 0.05) was used for variant calling as reported previously (23).

## 175 **Statistics**

176 Quantitative variables were described with mean, standard deviation and range;  
177 qualitative variables by frequency and percentage.

178 The association between P53 expression, PTEN loss of expression, *KRAS*, *NRAS*,  
179 *PIK3CA*, *MET* mutations and patient age, FIGO stage, chemosensitivity to platinum  
180 drugs (defined as lack of tumor progression at 6 months) was analyzed using  
181 Chi-squared test or Fisher's exact test. The progression-free survival (PFS) was  
182 defined as the time interval between the termination of frontline therapy and the first  
183 recurrence either by radiological findings or a rising of CA-125 level by two serial  
184 tests  $\geq 1$  month apart. Patients alive and free of recurrence were censored at the last  
185 follow-up. The overall survival (OS) was defined as the time interval between  
186 termination of frontline therapy and death (all causes). All causes of death were  
187 counted as failures. The PFS and OS curves according to the expression status of  
188 P53 and PTEN and the mutational status were established using logistic regression.

189 The PFS and OS were described with the Kaplan Meier method. Results are  
190 described with cumulative incidence and 95% confidence interval.

191 For each outcome, prognostic factors were tested with the Cox proportional hazard  
192 model in univariate analysis. Parameters with a p-value less than 0.1 were introduced  
193 in a multivariate Cox proportional hazard model with stepwise selection (with a  
194 significance level for entering effects at 0.1 and for removing effects at 0.05)

195 All statistical analyses were performed using SAS version 9.3 (SAS, Cary, NC, USA).

196 The significance level was set at 0.05.

## 197 RESULTS

### 198 Patient characteristics

199 Forty-five patients were included into this study. The characteristics of patient  
200 population are summarized in Table 1. Seven *BRCA* germline mutations (5 with  
201 *BRCA1* mutation, 2 with *BRCA2* mutation) were found in 17 patients that underwent  
202 oncogenetic test because of familial and/or personal history of ovarian/breast  
203 carcinoma. Primary cure was achieved in all patients combining surgery and 5-8  
204 cycles of platinum-based chemotherapy.

### 205 Immunohistochemistry

206 P53 overexpression was observed in 30 of 45 tumors (67%) and PTEN loss of  
207 expression was observed in 15 of 39 tumors (38%) (Figure 1). Six cases with  
208 negative stromal cell staining for PTEN were considered as unsuccessful IHC  
209 reactions and were excluded from the statistical analysis.

210 P53 overexpression was associated with the sensitivity to platinum-based  
211 chemotherapy ( $P=0.0393$ ) (Table 2). No other clinicopathological feature was  
212 associated with P53 status. No clinicopathological feature was associated with PTEN  
213 status.

### 214 Mutation analysis

215 HRM-PCR assay was performed in tumor DNA extracts from 50 tumors. Two cases  
216 were found to bear *NRAS* exon 3 mutation, none had *KRAS*, *BRAF* or *PIK3CA*  
217 mutation (Table 3).

218 Using NGS, all the mutations found by PCR were confirmed. In addition, 3 mutations  
219 of *PIK3CA* (2 in exon 10, 1 in exon 5) and 5 mutations of *MET* (4 in exon 14 and 1 in  
220 exon 18) were detected (Table 3).

221 The group of patients harboring one of these mutations showed no survival  
222 differences compared with the patients without any of these mutations.

### 223 **Clinical outcome**

224 The median follow-up was 38 months (range 6-93). Out the 45 patients, 35 patients  
225 had disease progression and 25 patients died during the follow-up. The 2-year PFS  
226 rate was 28% [16%;42%] and 5-year OS rate was 37% [21%;53%].

227 In univariate analysis, residual disease was significantly identified as predictive factor  
228 for shorter PFS (Hazard Ratio (HR) and 95% confidence interval (95% CI) : 2.134  
229 [1.080 ; 4.214]) and P53 overexpression (HR and 95% CI : 0.440 [0.216 ; 0.894]) was  
230 found to predict longer PFS (Table 4A). There was a trend for longer PFS among  
231 patients belonging to the subgroup with personal history of breast cancer (HR and  
232 95% CI: 0.319 [0.097; 1.045]) or *BRCA* germline mutations (HR and 95% CI: 0.321  
233 [0.098; 1.054]). In multivariate analysis, P53 overexpression remained significantly  
234 associated with a longer PFS (HR and 95% CI: 0.351[0.167; 0.739] (Table 4A).

235 In univariate analysis, no significant predictive factor of OS was identified (table 4B)  
236 although a trend for longer OS was observed (0.450 [0.195; 1.041]) in patients with  
237 tumors with P53 overexpression. In a multivariate Cox regression analysis, P53  
238 overexpression (HR and 95% CI: 0.269 [0.102; 0.708]) and personal history of breast  
239 cancer (0.168 [0.035; 0.809]) were identified as predictive factor of longer OS (Table  
240 4B).

## 241 **DISCUSSION**

242 The median PFS and OS of the cohort found in our series are consistent with  
243 previous studies (24).

244 Considering P53 IHC, the antibody used in our study can recognize both wild-type  
245 and non-null mutant P53 (25). When assessed by IHC, non-null mutant P53 often  
246 exhibits an intense nuclear staining in a high percentage of tumor cells whereas  
247 wild-type P53 exhibits a moderate nuclear staining in a small percentage of tumor  
248 cells. The null-mutant P53 is truncated and unstable, and does not produce nuclear  
249 staining (26). In our study, all P53 positive tumors exhibit a diffuse and intense P53  
250 nuclear staining and may present the non-null mutant P53 group, and the P53  
251 negative tumors showed a complete absence of nuclear staining which may present  
252 a null-mutant P53 group (27). This may reflect that P53 alterations occur in almost all  
253 HGSOC, presented as null or non-null mutant P53 (9).

254 P53 overexpression was observed in 30 of 45 (67%) tumors, while the complete  
255 absence of P53 expression was observed in 15 of 45 (33%) tumors, as already  
256 reported (28).

257 The association between the P53 overexpression and the patient outcome remains  
258 controversial, and this should be due to the different tumor populations explored,  
259 different methodology of detection and interpretation of P53 alterations (29). In our  
260 study, we found that P53 overexpression was associated with longer PFS and longer  
261 OS when compared with the group with complete absence of P53 expression, which  
262 is consistent with a broad-scale study (28). Although this can be explained by the fact  
263 that null-mutant P53 are often truncated and have no wild-type P53 function, while  
264 non-null P53 retain part of the wild-type P53 function (27), the full the mechanism  
265 underlying this difference in outcome is uncertain and needs further investigation.

266 Association between loss of PTEN and HGSOC patient outcome remains  
267 controversial (13, 15). In the present study, PTEN loss was observed in 38% of  
268 tumors, as previously reported (15). A recent study that evaluated PTEN expression  
269 in HGSOC reported an association between loss of PTEN expression and higher  
270 PFS (15). As suggested elsewhere, the association of PTEN loss and better  
271 prognosis may be partially explained by defected homologous recombination DNA  
272 repair function that could be caused by PTEN deficiency (30). This homologous  
273 recombination defect could sensitize tumor cells to anticancer drugs such as platinum  
274 or poly ADP ribose polymerase (PARP) inhibitors (31), similarly as observed in  
275 BRCA-deficient tumors. In our series, the lack of association of PTEN loss with PFS  
276 or OS may be related to the small sample size.

277 The rate of *MET* mutations (11%) observed in our study is consistent with previous  
278 study (32) and we confirm here the juxtamembrane exon 14 mutations (c.2962C>T  
279 p.Arg988Cys and c.3029C>T p.Thr1010Ile). These mutations have been reported to  
280 induce constitutive activation of MET in lung cancer cells (33) but were also  
281 described as SNP (rs34589476 and rs56391007, respectively) in NCBI ClinVar  
282 database. The c.3029C>T p.Thr1010Ile variation has also been related to ethnic  
283 polymorphism in people from Italian origin, which was the case of one of our patients  
284 with frequency of mutated allele of 45.0%. In addition, in other studies, these  
285 mutations did not enhance any transforming capacity (34), and did not exhibit  
286 onco-driver activity but could sensitize tumor cells to MET inhibitor (35). This  
287 suggests that these mutational activations of MET could be either an oncogene  
288 addiction as onco-driver in some cancers or an oncogene expedience as second  
289 event that exacerbates the malignant properties of already transformed cells in others  
290 (36). In addition, we identified a new mutation in the tyrosine kinase domain



291 (c.3619G>A p.Ala1207Thr on exon 18), for which the relationship with disease  
292 progression and response to therapy remains to be elucidated. The impact of these  
293 *MET* nucleotide variations in the biological or clinical behavior of HGSC needs to be  
294 thoroughly elucidated as *MET* inhibition is of great interest as a novel therapeutic  
295 target and many *MET* inhibitors are currently under investigation in other cancer  
296 types (36).

297 Large-scale study showed that the mutation of *PIK3CA* is usually observed in  
298 endometrioid carcinomas (9). In the present study, 2 different *PIK3CA* mutations  
299 were detected in 3 patients (7%) with one mutation newly identified (c.1037T>A  
300 p.Leu346Gln) that remains further investigated for its impact of protein function and  
301 tumor behavior. This mutation frequency is consistent with another study with a small  
302 sample size analysis including both types of ovarian cancers. *PTEN* loss was  
303 detected in 1 of the 3 tumors with *PIK3CA* mutations, as already reported previously  
304 in a study reporting that *PIK3CA* mutation associated with *PTEN* loss was sufficient  
305 to initiate ovarian tumors in animal models (37). Further, tumors with *PTEN* loss were  
306 reported to regress when exposed to drugs targeting PI3K pathway (38). Since more  
307 than one third of the HGSOC samples presented loss of *PTEN* expression, *PTEN*  
308 loss could be a predictive marker of PI3K pathway activation and response of PI3K  
309 pathway inhibitors such as NVP-BYL719 (39). Clinical trials of PI3K pathway  
310 inhibitors are ongoing in selected patients with tumors harboring *PIK3CA* mutation  
311 /*PTEN* loss including HGSOC patients (NCT00877773, NCT01219699,  
312 NCT01449058, NCT 01501604, NCT01708161, NCT01928459, NCT02439489,  
313 NCT02449538, NCT02449564).

314 Although the RAS/MAPK pathway was considered to be mostly altered in type I  
315 ovarian carcinoma (2), further studies showed that the HGSOC could share similar

316 molecular profiles. The *NRAS* mutation (c.181C>A p.Gln61Lys) identified in our study  
317 in 2 patients was already reported as oncogene driver in HGSOC (16). Besides, no  
318 *KRAS* or *BRAF* mutation was found in our study. This confirmed the less frequent  
319 dysregulation of RAS/RAF pathway and the potential interest of *NRAS* as biological  
320 marker for selecting patients who may benefit of targeted therapy (39). As the  
321 emerging targeted therapy showed antitumor activity in *NRAS*-mutated cancer (40),  
322 the role of *NRAS* mutations in HGSOC warrants further investigation.

### 323 CONCLUSIONS

324 High grade serous ovarian carcinoma is a group of heterogeneous malignancies with  
325 regard of P53 alteration, PTEN loss and alterations of PI3K/AKT and RAS/MAPK  
326 signaling pathways. Routine therapies almost reached the efficacy limit, and new  
327 therapeutic strategies are urgently needed. Mutant P53 and loss of PTEN are  
328 frequent events in HGSOC and showed association with patient outcome, these two  
329 markers may serve as predictive marker for stratifying patients for appropriate  
330 therapy. The pathway alterations bring new insights of personalized therapy for the  
331 clinical application of targeted therapy that has been used for other type of cancer.

### 332 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

333 The authors have no conflicts of interest to declare.

### 334 ACKNOWLEDGEMENTS

335 C.SH is supported by the China Scholarship Council.

336 **REFERENCES**

- 337 1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer  
338 statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar 1;65(2):87–108.
- 339 2. Kurman RJ, Shih I-M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and  
340 molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol.* 2008  
341 Apr;27(2):151–60.
- 342 3. Li D, Marchenko ND, Moll UM. SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53  
343 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90  
344 chaperone axis. *Cell Death Differ.* 2011 Dec;18(12):1904–13.
- 345 4. Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase  
346 inhibitors. *Cancer Lett.* 2009 Aug 8;280(2):145–53.
- 347 5. Fu S, Hou MM, Naing A, Janku F, Hess K, Zinner R, et al. Phase I study of pazopanib  
348 and vorinostat: a therapeutic approach for inhibiting mutant p53-mediated angiogenesis  
349 and facilitating mutant p53 degradation. *Ann Oncol.* 2015 May;26(5):1012–8.
- 350 6. Matulonis U, Berlin S, Lee H, Whalen C, Obermayer E, Penson R, et al. Phase I study  
351 of combination of vorinostat, carboplatin, and gemcitabine in women with recurrent,  
352 platinum-sensitive epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *Cancer*  
353 *Chemother Pharmacol.* 2015 Aug;76(2):417–23.
- 354 7. Bast RC, Hennesy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for  
355 translation. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun;9(6):415.
- 356 8. Skead G, Govender D. Gene of the month: MET. *J Clin Pathol.* 2015 Jun;68(6):405–9.
- 357 9. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian  
358 carcinoma. *Nature.* 2011 Jun 30;474(7353):609–15.

- 359 10. Huang J, Zhang L, Greshock J, Colligon TA, Wang Y, Ward R, et al. Frequent genetic  
360 abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient  
361 outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug;50(8):606–18.
- 362 11. Choi K-C, Auersperg N, Leung PCK. Mitogen-activated protein kinases in normal and  
363 (pre)neoplastic ovarian surface epithelium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Oct 7;1:71.
- 364 12. Bai H, Li H, Li W, Gui T, Yang J, Cao D, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is a  
365 potential predictor of distinct invasive and migratory capacities in human ovarian cancer  
366 cell lines. *Oncotarget*. 2015 Sep 22;6(28):25520–32.
- 367 13. Martins FC, Santiago I de, Trinh A, Xian J, Guo A, Sayal K, et al. Combined image and  
368 genomic analysis of high-grade serous ovarian cancer reveals PTEN loss as a common  
369 driver event and prognostic classifier. *Genome Biol*. 2014;15(12):526.
- 370 14. Djordjevic B, Hennessy BT, Li J, Barkoh BA, Luthra R, Mills GB, et al. Clinical  
371 assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry  
372 outperforms gene sequencing. *Mod Pathol*. 2012 May;25(5):699–708.
- 373 15. Bakkar RM, Xie S-S, Urbauer DL, Djordjevic B, Vu K, Broaddus RR. Intact PTEN  
374 Expression by Immunohistochemistry is Associated With Decreased Survival in  
375 Advanced Stage Ovarian/Primary Peritoneal High-grade Serous Carcinoma. *Int J*  
376 *Gynecol Pathol*. 2015 Nov;34(6):497–506.
- 377 16. Emmanuel C, Chiew Y-E, George J, Etemadmoghadam D, Anglesio MS, Sharma R, et  
378 al. Genomic classification of serous ovarian cancer with adjacent borderline  
379 differentiates RAS pathway and TP53-mutant tumors and identifies NRAS as an  
380 oncogenic driver. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 15;20(24):6618–30.
- 381 17. Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development  
382 and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Mar;27(1):85–94.

- 383 18. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer:  
384 rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 2012 Feb;12(2):89–103.
- 385 19. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, et al.  
386 Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed  
387 ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet*  
388 *Oncol*. 2015 Aug;16(8):928–36.
- 389 20. Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival  
390 and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without  
391 bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol*  
392 *Oncol*. 2015 Oct;139(1):10–6.
- 393 21. Choueiri TK, Vaishampayan U, Rosenberg JE, Logan TF, Harzstark AL, Bukowski RM,  
394 et al. Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in  
395 patients with papillary renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):181–6.
- 396 22. Zillhardt M, Park S-M, Romero IL, Sawada K, Montag A, Krausz T, et al. Foretinib  
397 (GSK1363089), an orally available multikinase inhibitor of c-Met and VEGFR-2, blocks  
398 proliferation, induces anoikis, and impairs ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res*.  
399 2011 Jun 15;17(12):4042–51.
- 400 23. Harlé A, Filhine-Tresarrieu P, Husson M, Boidot R, Rouyer M, Dubois C, et al. Rare  
401 RAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer Detected During Routine RAS  
402 Genotyping Using Next Generation Sequencing. *Target Oncol*. 2015 Dec 11;
- 403 24. Hennesy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet*. 2009 Oct  
404 17;374(9698):1371–82.
- 405 25. Bonsing BA, Corver WE, Gorsira MC, van Vliet M, Oud PS, Cornelisse CJ, et al.  
406 Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting,

- 407 immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry.  
408 Cytometry. 1997 May 1;28(1):11–24.
- 409 26. Psyrri A, Kountourakis P, Yu Z, Papadimitriou C, Markakis S, Camp RL, et al. Analysis  
410 of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated  
411 quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. *Ann Oncol*. 2007  
412 Apr;18(4):709–15.
- 413 27. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, et al. p53 null  
414 mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with  
415 early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*. 1999 Nov 1;59(21):5572–7.
- 416 28. Köbel M, Reuss A, du Bois A, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, et al. The biological  
417 and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol*.  
418 2010 Oct;222(2):191–8.
- 419 29. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human  
420 benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*. 2003  
421 Jan 15;97(2):389–404.
- 422 30. McEllin B, Camacho CV, Mukherjee B, Hahm B, Tomimatsu N, Bachoo RM, et al. PTEN  
423 loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for  
424 glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors.  
425 *Cancer Res*. 2010 Jul 1;70(13):5457–64.
- 426 31. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim J-S, et al.  
427 Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*.  
428 2009 Sep;1(6-7):315–22.

- 429 32. Tang C, Jardim DLF, Falchook GS, Hess K, Fu S, Wheler JJ, et al. MET nucleotide  
430 variations and amplification in advanced ovarian cancer: characteristics and outcomes  
431 with c-Met inhibitors. *Oncoscience*. 2014;1(1):5–13.
- 432 33. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational  
433 analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating  
434 cytoskeletal functions. *Cancer Res*. 2003 Oct 1;63(19):6272–81.
- 435 34. Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C, et  
436 al. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity.  
437 *Cancer Res*. 2010 Aug 1;70(15):6233–7.
- 438 35. Arriola E, Cañadas I, Arumí-Uría M, Dómine M, Lopez-Vilariño JA, Arpí O, et al. MET  
439 phosphorylation predicts poor outcome in small cell lung carcinoma and its inhibition  
440 blocks HGF-induced effects in MET mutant cell lines. *Br J Cancer*. 2011 Sep  
441 6;105(6):814–23.
- 442 36. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting  
443 oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Jun;7(6):504–16.
- 444 37. Kinross KM, Montgomery KG, Kleinschmidt M, Waring P, Ivetac I, Tikoo A, et al. An  
445 activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian  
446 tumorigenesis in mice. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):553–7.
- 447 38. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, et al.  
448 PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies  
449 harboring PIK3CA mutations. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):777–82.
- 450 39. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al.  
451 Characterization of the novel and specific PI3K $\alpha$  inhibitor NVP-BYL719 and

- 452 development of the patient stratification strategy for clinical trials. Mol Cancer Ther.  
453 2014 May;13(5):1117–29.
- 454 40. Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, et  
455 al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF  
456 mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. Lancet Oncol. 2013  
457 Mar;14(3):249–56.



**458 FIGURE LEGENDS****459 Figure 1 : P53 and PTEN expression analysis using immunohistochemistry (X 20).**

460 (A) Positive P53 expression: Diffuse and intense nuclear staining.

461 (B) Negative P53 expression: Complete absence of nuclear staining.

462 (C) Positive PTEN expression: The intensity of PTEN nuclear expression in tumor cells is  
463 comparable with that of stromal cells that acts as an internal positive control.

464 (D) PTEN loss of expression: complete absence of nuclear expression in tumor cells.

**Table 1: Clinico-pathological characteristics of the patient population**

Cohort	Number (percentage)
Number of patients	45
Age	
Mean, years (STD)	59.1 (12.1)
range	25-87
Familial history	
YES	19 (42%)
NO	26 (58%)
Personal history	
YES	7 (16%)
NO	38 (84%)
Oncogenetic consultation	
YES	17 (38%)
NO	28 (62%)
BRCA mutation (n= 17)	
No mutation	10 (59%)
BRCA 1+	5 (29%)
BRCA 2+	2 (12%)
Tumor stage	
I-II	5 (11%)
III-IV	40 (89%)
Surgery modality	
Primary cytoreductive	36 (80%)
Neoadjuvant chemotherapy	9 (20%)
Surgical outcome	
Completed	21 (47%)
Not competed	24 (53%)
Adjuvant chemotherapy regimen	
Single agent platinum	8 (18%)
Platinum/Taxane doublet	31(69%)
Bevacizumab included	6 (13%)
Response to platinum-based chemotherapy	
Sensitive <sup>1</sup>	31 (69%)
Resistant <sup>2</sup>	14 (31%)

PFS, progression-free survival; OS, overall survival; STD, standard deviation; SE, standard error; <sup>1</sup> interval between last course of platinum-based chemotherapy and disease progression > 6 months; <sup>2</sup> interval between last course of platinum-based chemotherapy and disease progression < 6 months

**Table 2: Relationship between P53 and PTEN protein expression\* and the clinicopathological features**

	P53+	P53-	<i>P</i>	PTEN+	PTEN-	<i>P</i>
Expression, n (%)	30 (67%)	15 (33%)		24 (62%)	15 (38%)	
Age, n (%)						
< 59	17 (57%)	7 (47%)	0.546	14 (58%)	7 (47%)	0.525
> 59	13 (43%)	8 (53%)		10 (42%)	8 (53%)	
FIGO stage						
I-II	3 (10%)	2 (13%)	1.000	3 (13%)	1 (7%)	1.000
III-IV	27 (90%)	13 (87%)		21 (87%)	14 (93%)	
Response to platinum-based chemotherapy, n (%)						
sensitive	24 (80%)	7 (47%)	<b>0.0393</b>	15 (63%)	10 (67%)	1.000
resistant	6 (20%)	8 (53%)		9 (37%)	5 (33%)	

\* 39 tumors were available for PTEN expression interpretation

**Table 3: Mutation analysis**

	Chromosome	HRM-PCR		exon	c.	p.	NGS		Clinical significance <sup>4</sup>
		exon	Number of cases				Number of cases	Mutated allele frequency (%)	
<i>NRAS</i> <sup>1</sup>	1	3	2	3	181 C>A	Gln61Lys	2	24.7 / 24.1	Pathogenic
<i>PIK3CA</i> <sup>2</sup>	3			5	1037 T>A	Leu346Gln	1	60.3	<b>New identified mutation</b>
				10	1571 G>A	Arg524Lys	2	17.1 / 5.0	Missense mutation, uncertain
				14	2962 C>T	Arg988Cys	1	65.3	Missense mutation uncertain
<i>MET</i> <sup>3</sup>	7				3029 C>T	Thr1010Ile	3	45.1 / 82.8 / 58.7	Missense mutation, uncertain
					3619 G>A	Ala1207Thr	1	32.9	<b>New identified mutation</b>

<sup>1</sup> based on the 100% negative results of PCR, only the sample of 24 patients in the 45 analysed by PCR and the last 3 patients directly analysed by NGS

<sup>2</sup> *PIK3CA* exon 5 only analyzed using NGS

<sup>3</sup> *MET* only analyzed using NGS

<sup>4</sup> database "ensembl" (<http://www.ensembl.org/index.html>)

**Table 4: Pronostic factors of progression-free survival (A) and overall survival (B)**

<b>A</b>				
Variable	Univariate analyses		Multivariate analysis	
	HR and 95% CI	P	HR and 95% CI	P
Age (years)				
< 59	1			
> 59	1.564 [0.803 ; 3.045]	0.1888		
Family history <sup>1</sup>				
No	1			
Yes	0.984 [0.499 ; 1.942]	0.9632		
Personal history <sup>2</sup>				
No	1		1	
Yes	0.319 [0.097 ; 1.045]	<b>0.0592</b>	0.261[0.078;0.869]	0.0286
BRCA mutations <sup>3</sup>				
No	1			
Yes	0.321 [0.098; 1.054]	<b>0.0610</b>		
Stage				
I+II	1			
III+IV	2.030 [0.616 ; 6.687]	0.2443		
Surgery modality				
Upfront surgery	1			
Interval surgery	1.962 [0.876 ; 4.395]	0.1014		
Residual disease				
Complete	1		1	
Non complete	2.134 [1.080 ; 4.214]	<b>0.00291</b>	2.127[1.056;4.286]	0.0346
Bevacizumab-containing chemotherapy				
No	1			
Yes	1.105 [0.426 ; 2.870]	0.8372		
P53 overexpression				
No	1		1	
Yes	0.440 [0.216 ; 0.894]	<b>0.0233</b>	0.351[0.167;0.739]	0.0058
PTEN loss				
No	1			
Yes	0.886 [0.426 ; 1.841]	0.7452		
Mutation status <sup>4</sup>				
No	1			
Yes	0.763 [0.331 ; 1.758]	0.5259		

**B**

Variable	Univariate analyses		Multivariate analysis	
	HR and 95% CI	P	HR and 95% CI	P
Age (years)				
< 59	1			
> 59	1.524 [0.690; 3.369]	0.2974		
Family history <sup>1</sup>				
No	1			
Yes	0.876 [0.393 ; 1.954]	0.7463		
Personal history <sup>2</sup>				
No	1		1	
Yes	0.299 [0.069 ; 1.284]	0.1043	0.168[0.035;0.809]	0.0261
BRCA mutations <sup>3</sup>				
No	1			
Yes	0.186 [0.025 ; 1.382]	0.1002		
Stage				
I+II	1			
III+IV	3.933 [0.530 ; 29.158]	0.1804		
Surgery modality				
Upfront surgery	1			
Interval surgery	1.440 [0.480 ; 4.318]	0.5155		
Residual disease				
Complete	1			
Non complete	1.983 [0.885 ; 4.442]	0.0961		
Bevacizumab-containing chemotherapy				
No	1			
Yes	0.739 [0.216 ; 2.533]	0.6308		
P53 overexpression				
No	1		1	
Yes	0.450 [0.195 ; 1.041]	<b>0.0619</b>	0.269[0.102;0.708]	0.0078
PTEN loss				
No	1			
Yes	1.027 [0.442 ; 2.388]	0.9501		
Mutation status <sup>4</sup>				
No	1			
Yes	1.022 [0.381 ; 2.741]	0.9655		

<sup>1</sup> ovarian and/or breast cancer<sup>2</sup> breast cancer<sup>3</sup> BRCA 1/2<sup>4</sup> any *NRAS*, *PIK3CA* or *MET* mutation

**Figure 1 : P53 and PTEN expression analysis using immunohistochemistry (X 20).**

- (A) Positive P53 expression: Diffuse and intense nuclear staining.
- (B) Negative P53 expression: Complete absence of nuclear staining.
- (C) Positive PTEN expression: The intensity of PTEN nuclear expression in tumor cells is comparable with that of stromal cells that acts as an internal positive control.
- (D) PTEN loss of expression: complete absence of nuclear expression in tumor cells.

