



Détermination sur tissu endométrial néoplasique de profils d'expression de micro-ARNs associés à l'envahissement ganglionnaire dans le cancer de l'endomètre de type endométrioïde de stade précoce

Geoffroy Canlorbe

► To cite this version:

Geoffroy Canlorbe. Détermination sur tissu endométrial néoplasique de profils d'expression de micro-ARNs associés à l'envahissement ganglionnaire dans le cancer de l'endomètre de type endométrioïde de stade précoce. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066198 . tel-01895258

HAL Id: tel-01895258

<https://theses.hal.science/tel-01895258>

Submitted on 15 Oct 2018

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité :
Physiologie et physiopathologie
(Ecole Doctorale 394)

Présentée par :
Mr. Geoffroy CANLORBE

Pour obtenir le grade de :
DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE.

Sujet de la thèse :

Détermination sur tissu endométrial néoplasique de profils d'expression de micro-ARNs associés à l'envahissement ganglionnaire dans le cancer de l'endomètre de type endométrioïde de stade précoce.

Soutenue le : 13 octobre 2017

Devant le jury composé de :

Mr Le Professeur Marcos BALLESTER	(Directeur de thèse)
Mr Le Professeur François GOLFIER	(Rapporteur)
Mr Le Professeur Pierre BUSSON	(Rapporteur)
Mme Le Professeur Catherine UZAN	(Président)
Mr Le Professeur Emmanuel BARRANGER	(Examineur)
Mme Le Professeur Anne-Sophie BATS	(Examineur)
Mr Le Professeur Vincent LAVOUE	(Examineur)

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6
15 rue de l'école de Médecine
75270 PARIS Cedex 06.

Remerciements.

Je tiens à remercier les membres du jury :

- Monsieur le Professeur Marcos BALLESTER
- Monsieur le Professeur François GOLFIER
- Monsieur le Docteur Pierre BUSSON
- Madame le Professeur Catherine UZAN
- Monsieur le Professeur Emmanuel BARRANGER
- Madame le Professeur Anne-Sophie BATS
- Monsieur le Professeur Vincent LAVOUE

Merci pour votre disponibilité, c'est un honneur de vous avoir dans mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier :

Le Professeur Marcos BALLESTER qui m'a formé sur le plan chirurgical et scientifique. Son encadrement et son soutien permanent m'ont permis d'être là aujourd'hui.

Le Professeur Emile DARAÏ dont la rigueur, la persévérance et l'enthousiasme pour notre profession me servent de modèle au quotidien.

Le Professeur Selim ARACTINGI dont la culture scientifique et l'engagement dans la recherche sont un exemple.

Le Professeur Catherine UZAN qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son équipe et avec qui la collaboration chirurgicale et scientifique ne fait que commencer.

Le Professeur Serge UZAN, le Professeur Alexandre ESCARGUEIL et le Professeur Vincent MARECHAL pour leur tutorat au sein de l'Institut Universitaire du Cancer.

Le Docteur Céline MEHATS qui a été la première à me former à la recherche scientifique. Ce projet n'aurait pu être réalisé sans la poursuite de notre collaboration, qui, je l'espère, se poursuivra longtemps.

Le Professeur Isabelle BROCHERIOU, le Docteur Annie CORTEZ, le Docteur Marine LEFEVRE et Monsieur Emmanuel ROUX, du service d'anatomopathologie de l'hôpital Tenon, pour leurs conseils avisés.

Le Professeur Nathalie CHABBERT-BUFFET, le Docteur Romain FONTAINE, le Docteur Sarah GUEGAN et le Dr Zhe WANG pour leur expertise scientifique.

Sébastien JACQUES, de la plateforme Génomique de l'Institut Cochin, pour son expertise et sa disponibilité.

Le Docteur Mathieu CASTELLA et Mr Thomas ROUILLE, qui m'ont accompagné au laboratoire. Merci pour leur bonne humeur et leurs compétences

Mes collègues le Docteur Sofiane BENDIFALLAH, le Docteur Jérémie BELGHITI, le Docteur Maryam NIKPAYAM, le Docteur Henri AZAÏS, le Docteur Sonia ZILBERMAN, le Docteur Enora LAAS, le Docteur Amandine MAULARD, le Docteur Patrick ARISTIZABAL, le Docteur Elise FURET, le Docteur Dan STEFANESCU.

Mme Michèle OSTER pour sa collaboration et ses conseils.

Le Docteur Bruno RENEVIER pour son amitié et son soutien permanent.

Mes parents et mon frère, Grégoire, à mes cotés depuis toujours.

Laurence, pour son affection quotidienne, Manon, Emile, et Gaius.

RESUME.

La classification actuelle du cancer de l'endomètre, basée uniquement sur l'histologie, conditionne la prise en charge thérapeutique alors qu'elle ne montre pas une pertinence suffisante pour prédire l'envahissement ganglionnaire dans les stades supposés de bon pronostic. La détermination de profils d'expression biologiques corrélés au statut ganglionnaire et à d'autres facteurs pronostiques majeurs tels que les embolies lymphovasculaires dans les cancers endométriaux présumés de stade précoce apparaît donc fondamentale pour mieux adapter la prise en charge chirurgicale et la thérapeutique adjuvante.

Nous avons montré, par une analyse de puce à partir des ARNs extraits de tissus sous paraffine de cancer de l'endomètre de type endométrioïde, de grade 1-2, supposé limité à l'utérus, que les niveaux d'expression de cinq micro-ARNs (miR-34c-5p, -375, -184, -34c-3p, et -34b-5p) étaient significativement plus faibles dans les tissus tumoraux avec envahissement ganglionnaire que dans ceux sans envahissement ganglionnaire. Aussi, les niveaux d'expression de trois micro-ARNs (miR-34c-5p, -23b-5p, et -23c) étaient significativement plus faibles dans les tissus tumoraux avec embolies lymphovasculaires que dans ceux sans embolies. Une analyse d'enrichissement a montré que les ARNs messagers cibles de ces micro-ARNs étaient associés aux voies de signalisation impliquées dans la transformation cellulaire et l'invasion néoplasiques.

Une seconde analyse par RT-qPCR a permis de valider ces données puis de déterminer des seuils de micro-ARNs corrélés aux facteurs pronostiques. Les patientes avec seuil d'expression du micro-ARN-375 $<0,30$ avaient un risque significativement plus élevé d'avoir un envahissement ganglionnaire (53,3%) que les patientes avec un seuil d'expression de micro-ARN-375 $>0,30$ (4,8%), $p=0,001$. Les patientes avec seuil d'expression du micro-ARN-184 $<0,30$ avaient un risque significativement plus élevé d'avoir un envahissement ganglionnaire (60%) que les patientes avec un seuil d'expression de micro-ARN-184 $>0,30$ (11,5%), $p=0,006$. Les patientes avec seuil d'expression du micro-ARN-34c-5p $<0,15$ avaient un risque significativement plus élevé d'avoir des embolies (92,3%) que les patientes avec un seuil d'expression de micro-ARN-34c-5p $>0,15$ (0,0%), $p<0,001$. Les patientes avec seuil d'expression du micro-ARN-23b-5p $<0,51$ avaient un risque significativement plus élevé d'avoir des embolies (90,0%) que les patientes avec un seuil d'expression de micro-ARN-23b-5p $>0,51$ (21,4%), $p=0,003$.

Ces profils d'expression de micro-ARNs fournissent les bases pour de nouvelles études sur la fonction des micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre et pourraient constituer un nouvel outil au diagnostic du statut ganglionnaire. Le projet de recherche translationnel GYNOMIR est en cours pour valider ces résultats au niveau plasmatique.

Mots-clés : micro-ARN, cancer endomètre, statut ganglionnaire, embolies, miR-34c-5p

ABSTRACT.

Current histological classification of early-stage endometrial cancer (EC) may show insufficient accuracy to precisely predict lymph node metastases leading to potential over or under treatment. Hence, additional highly sensitive and specific molecular prognostic biomarkers correlated with prognostic factors, such as nodal involvement and lymphovascular space involvement (LVSI), are needed to better adapt surgical management and adjuvant therapies.

We first studied by microarray analysis microRNA expression profiles of formalin-fixed paraffin-embedded grade 1–2 supposed early-stage endometrioid adenocarcinomas specimen. The expression levels of 5 microRNAs (miR-34c-5p, -375, -184, -34c-3p, et -34b-5p) were significantly lower in the EC with positive nodal status compared to those with negative nodal status. Furthermore, the expression levels of 3 microRNAs (miR-34c-5p, -23b-5p, et -23c) were significantly lower in the EC with positive LVSI compared to those with negative LVSI. An enrichment analysis showed that the validated targets for these micro-RNAs were significantly related to neoplasm cell transformation and cancer progression.

A quantitative reverse transcriptase–PCR assay was used to confirm these results and to determine micro-RNAs thresholds correlated with prognostic factors. Women with a microRNA-375-fold change <0.30 were more likely to have positive lymph node ($n=8$; 53.3%) compared with those with a microRNA-375-fold change >0.30 ($n=1$; 4.8%), $p=0.001$. Women with a microRNA-184-fold change <0.30 were more likely to have positive lymph node ($n=6$; 60.0%) compared with those with a microRNA-184-fold change >0.30 ($n=3$; 11.5%), $p=0.006$. Women with a microRNA-34c-5p fold change <0.15 were more likely to have positive LVSI status ($n=12$; 92.3%) compared with those with a microRNA-34c-5p fold change >0.15 ($n=0$; 0.0%), $p<0.001$. Women with a microRNA-23b-5p fold change <0.51 were more likely to have positive LVSI status ($n=9$; 90.0%) compared with those with a microRNA-23b-5p fold change >0.51 ($n=3$; 21.4%), $p=0.003$.

These microRNA expression profiles may provide a basis for further studies of the micro-RNA function in endometrioid adenocarcinoma, and be used as a diagnostic tool for nodal status. The on going translational research project GYNOMIR aims to validate these results at plasmatic level.

Key-words: microRNA; endometrial cancer; nodal status; lymphovascular space involvement; miR-34c-5p

Laboratoires où la thèse a été préparée.

Laboratoire d'accueil :

Pr Selim ARACTINGI - Pr Emile DARAÏ

INSERM - UMRS 938, Hôpital Saint-Antoine

Equipe "Stem cells and transition from pre-invasive tumors"

27, rue Chaligny 75012 Paris

Tél. : +33 (1) 40 01 14 65

<http://www.cdr-saint-antoine.fr>

selim.aractingi@gmail.com

emile.darai@aphp.fr

Institut Cochin (U1016 Inserm/UMR8104 CNRS/UMR-S8104)

Equipe : Génomique, Epigénétique et Physiopathologie de la Reproduction

Département : Développement, Reproduction et Cancer

Bâtiment Faculté, 2ème étage

24 rue du faubourg Saint Jacques

75014 Paris-France

Tel : +33 1 44 41 23 01

Celine.mehats@inserm.fr

Plateforme génomique Institut Cochin INSERM U1016

Bâtiment G. Roussy 3ème étage

27 rue du faubourg Saint Jacques

75014 Paris

tel : 01 40 51 65 65

fax : 01 40 51 65 35

sebastien.jacques@inserm.fr

Service d'Anatomie Pathologique

Chef de Service : Pr Isabelle BROCHERIOU puis Dr Eva Maria COMPERAT

Hôpital Tenon

4 rue de la Chine

75020 PARIS

isabelle.brocheriou@aphp.fr

TABLE DES MATIERES.

Liste des abréviations	10
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
I – Introduction	15
II - Micro-ARN et cancer de l'endomètre	18
II.A – Endomètre : du normal au pathologique	19
II.A.1- Variations physiologiques	19
II.A.1.a- Généralités	19
II.A.1.b- Influence des hormones stéroïdes sexuelles sur l'endomètre.....	20
II.A.1.c- Phase proliférative	21
II.A.1.d- Phase sécrétoire	22
II.A.1.e- Phase menstruelle	23
II.A.1.f- Endomètre à la ménopause	23
II.A.2- Lésions pré cancéreuses	24
II.B- Adénocarcinome de l'endomètre	25
II.B.1- Epidémiologie	25
II.B.2- Anatomie pathologique	26
II.B.3- Aspects de génétique moléculaire associés aux carcinomes endométrioïdes de l'endomètre	28
II.B.4- Prise en charge chirurgicale et stadification ganglionnaire	33
II.C- Micro-ARNs	34
II.C.1- Historique	34
II.C.2- Nomenclature	34
II.C.3- Biogénèse des micro-ARNs	35
II.C.4- Mécanismes moléculaires d'action des micro-ARNs	37
II.C.5- Régulation des micro-ARNs	39
II.C.6- Etude des cibles de micro-ARNs	41
II.C.7- Micro-ARN en cancérogénèse et dans la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse	43
II.C.8- Micro-ARN et cancer de l'endomètre	46
II.C.8.a- Généralités	46
II.C.8.b- Profil d'expression de micro-ARNs associé au tissu endométrial malin ..	53
II.C.8.c- Profil d'expression de micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre selon le statut ganglionnaire	54
II.C.8.d- Profil d'expression de micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre selon la survie	54
II.C.8.e- Micro-ARNs oncogènes (oncomirs) dans le cancer de l'endomètre	61
II.C.8.f- Micro-ARNs suppresseurs de tumeur (suppresseurs mirs) dans le cancer de l'endomètre	65
II.D- Ouverture sur la thérapeutique	67

III – Objectifs	68
IV – Résultats	69
• Article 1 : Détermination de profils d’expression de micro-ARNs associés à l’envahissement ganglionnaire dans le cancer de l’endomètre de stade précoce de grade 1-2	70
• Article 2 : Détermination de profils d’expression de micro-ARNs associés à la présence d’embolies dans le cancer de l’endomètre de type I	83
V - Synthèse des résultats et Discussion	95
VI - Conclusion et Perspective	110
VII – Références	112

Liste des abréviations.

A-SMA : Alpha-smooth muscle actin
ADAM17 : a disintegrin and metalloproteinase metalloproteinase domain 17;
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ago : protéine argonaute
AKT : protéine kinase B
APC : adenomatous polyposis coli
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger (ARNm)
AUC : Aire Sous la Courbe
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BMI1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
c-myc : Myelocytomatosis oncogene
CA125 : carbohydrate antigen 125
CD151 : cluster of differentiation 151
CD44 : cluster of differentiation 44
CDH1 : Cadherin-1
CDKN1C : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
CE : cancer de l'endomètre
CGH : hybridation génomique comparative
CHUK : conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase;
CTNNB1 : gène de la protéine bêta-caténine
CUL5 : cullin 5
DGCR8 : DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DGOS : Direction Générale de l'Offre des Soins
DIU : dispositif intra utérin
DNMT1 : DNA methyltransferase 1
DRCD : Département de la Recherche Clinique et du Développement
E2 : 17 β -estradiol (E2)
E2F3 : E2F transcription factor 3
eIF : Eukaryotic initiation factors
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
Era : récepteurs estrogènes
FGF2 : fibroblast growth factor 2
FIGO : fédération internationale de gynécologie obstétrique
FRA-1 : Fos-related antigen 1
GADD45A : growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha.
GPER : G-protein-coupled estrogen receptor-1
GSK3 β : glycogène synthétase kinase
GTP : Guanosine-5'-triphosphate
h-MLH1 : human-MutL homolog 1
h-MSH2 : human-MutL homolog 2
h-MSH6 : human-MutS homolog 6
HEC-1B : Human endometrial adenocarcinoma cell lines – 1B
HNPCC : Cancer colorectal héréditaire sans polyposé

HOXD10 : Homeobox D10
 hsa : Homo sapiens
 IGF-1R : insulin-like growth factor 1 receptor
 IMC : Indice de Masse Corporelle
 INCa : Institut National du Cancer
 IRM : imagerie par résonnance magnétique
 IRS1 : insulin receptor substrate 1
 K-ras : Kirsten ras
 kDA : kiloDalton
 KLF4 : Kruppel-like factor 4
 LNA : locked nucleic acids : acides nucléiques « verrouillés »
 LOH : perte de l'hétérozygotie
 LOX : lysyl oxidase
 LVSI : embolies lymphovasculaires
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase
 MET : mesenchymal to epithelial transition
 miARN : micro-ARN
 miRISC : miRNA-containing RNA induced silencing complex
 MMPs : métalloprotéases matricielles
 MMP-7 : métalloprotéases matricielles -7
 MMP2 : métalloprotéases matricielles -2
 MMP3 : métalloprotéases matricielles -3
 MMP9 : métalloprotéases matricielles -9
 MMR : mismatch repair
 MSI : instabilité des microsatellites
 MSS : stabilité des microsatellites
 MTA-1 : metastasis-associated protein-1
 N- : statut ganglionnaire négatif
 N+ : statut ganglionnaire positif
 NiS : nickel sulphide
 NSCLC : non-small cell lung cancer
 OMS : organisme mondial de la santé
 PCR : réaction en chaîne par polymérase
 PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
 POLE : ADN polymérase ϵ
 PRT : Projet de Recherche Translationnelle
 PTEN : Phosphatase and tensin homolog
 qPCR : PCR quantitative (=PCR en temps réel)
 RE : Récepteurs aux estrogènes
 RICTOR : rapamycin-insensitive companion of mechanistic target of rapamycin
 RISC : RNA-Induced Silencing Complex
 RNU44 : U44 small nuclear RNA
 RNU48 : U48 small nuclear RNA
 RNU6 : U6 small nuclear RNA
 RP : Récepteurs à la progestérone
 RT : rétrotranscription (transcription inverse)
 RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
 S-100A4 : S100 calcium-binding protein A4

SEC23A : Sec23 homolog A (*S. cerevisiae*)
siARNs : ARN interférents
SIRT1 : sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (*S. cerevisiae*)
Slug : Snail2 (=Zinc finger protein SNAI2)
SNAI1 : Zinc finger protein SNAI1
TEP-FDG/TDM : tomographie à émission de positons au 2-[18]-Fluoro-2-désoxy-D -glucose couplée à un scanner dédié
TGF α : transforming growth factor alpha
TIMPS : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases
TIMP3 : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases 3
Tm : température de demi-dénaturation
TRPS1 : tricho-rhino-phalangeal syndrome type I protein
TWF1 : Twinfilin-1
RNU6b : U6 small nuclear 2
VEGF-A : Vascular endothelial growth factor A
Wnt1 : wingless-related integration site 1
ZEB : Zinc E-box Binding factor
NGS : séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des carcinomes de l'endomètre (selon OMS, 2003).

Tableau 2 : Mutations identifiées dans le cancer de l'endomètre selon le type histologique

Tableau 3 : Liste des applications permettant de déterminer les ARNs messagers cibles des micro-ARNs

Tableau 4 : Micro-ARNs impliqués dans la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse

Tableau 5 : Micro-ARNs impliqués dans le cancer de l'endomètre

Tableau 6 : Profil d'expression des micro-ARNs entre un tissu endométrial malin et un tissu endométrial sain

Tableau 7 : Profil d'expression de micro-ARNs au sein de tissu endométrial néoplasique selon le statut ganglionnaire associé

Tableau 8 : Profil d'expression de micro-ARNs au sein de tissu endométrial néoplasique selon la survie

Tableau 9 : Variation de l'expression de miR-181a dans les tissus endométriaux

Tableau 10 : ARNs messagers cibles du miR-152

Tableau 11 : ARNs de ménage utilisés par 23 études ayant traité de l'expression des micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre

Tableau 12 : Relation entre micro-ARNs plasmatiques/sériques et cancer de l'endomètre

Liste des figures

Figure 1 : Coupe histologique endomètre et myomètre (HES, x5)

Figure 2 : Glandes de l'endomètre en phase de prolifération (HES, x400)

Figure 3 : Glandes de l'endomètre en phase de sécrétion (HES, x400)

Figure 4 : Endomètre en phase de menstruation (HES, x40)

Figure 5 : Adénocarcinomes de l'endomètre, aspects anatomopathologiques

Figure 6 : A) classification moléculaire des cancers de l'endomètre en 4 groupes. B) Survie sans récurrence du cancer de l'endomètre selon les 4 groupes moléculaires.

Figure 7 : Représentation schématisée de la biosynthèse et de la maturation des micro-ARNs

Figure 8 : Modèle illustrant la relation entre le micro-ARN et la protéine AGO

Figure 9 : Mécanisme moléculaire d'action des micro-ARNs

Figure 10 : Inhibition de la transcription de miR-200b par c-Myc

Figure 11 : Types de cibles des miARNs

Figure 12 : Caractéristiques générales de la transition épithélio-mésenchymateuse

Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de l'endomètre

Figure 14 : Mécanisme de régulation des gènes impliqués dans la cancérogénèse par l'oncomiR-181a

Figure 15 : Intégration de miR-10b dans les voies cellulaires impliquées dans le contrôle de la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse

Figure 16 : Etapes de transcription inverse puis de réaction en chaîne par polymérase avec le miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)

Figure 17 : Diagramme en étoile présentant les performances des différents kits de RT-qPCR

Figure 18 : Origine intracellulaire et extracellulaire des micro-ARNs

I - Introduction.

I - Introduction

Le cancer de l'endomètre (CE) est le premier cancer gynécologique en termes d'incidence avec 6500 nouveaux cas par an diagnostiqués en France. Les stades précoces représentent 75% des cas dépistés et sont classés en trois groupes à risque de récurrence (bas, moyen, haut) selon trois critères anatomopathologiques : le type et le grade histologiques, le degré d'envahissement du myomètre (1).

Les sociétés savantes françaises (2) et européennes (1) ont émis des recommandations visant à homogénéiser les pratiques de prise en charge de ce cancer et à limiter les morbidités pour les patientes qui pourraient relever d'un traitement limité. Il est ainsi recommandé de ne pas réaliser de lymphadénectomie pour les patientes à bas et moyen risques alors qu'une lymphadénectomie lombo-aortique +/- pelvienne systématique est recommandée pour les patientes à haut risque ou de stade plus avancé. Cependant, 15% des patientes ayant un CE présumé de stade précoce classé à moyen ou bas risque de récurrence ont des métastases ganglionnaires et sont potentiellement sous-traitées (3). En effet, s'affranchir de l'information ganglionnaire peut engendrer la mise en place de traitements adjuvants insuffisants avec un risque de récurrence théoriquement plus élevé. La classification actuelle, uniquement basée sur l'histologie, conditionne la prise en charge thérapeutique alors qu'elle ne montre pas une pertinence suffisante pour prédire l'envahissement ganglionnaire. La détermination de profils d'expression biologiques corrélés au statut ganglionnaire dans les cancers endométriaux (type 1 histologique) présumés de stade précoce apparaît donc fondamentale pour mieux adapter la prise en charge chirurgicale et la thérapeutique adjuvante.

Les micro-ARNs (miARNs), longs d'environ 22 nucléotides, sont des régulateurs post-transcriptionnels pouvant être impliqués dans certains mécanismes de cancérogénèse et de résistance aux traitements (4). Leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager (ARNm) du gène cible conduit à la répression transcriptionnelle ou à la dégradation de cet ARNm (5). Les techniques de séquençage de nouvelle génération permettent de les détecter et de quantifier leur expression (6) à partir de tissus frais ou sous paraffine (7) et de prélèvements sanguins (8). Plusieurs auteurs ont montré que des profils d'expression de miARNs apparaissent associés à l'envahissement ganglionnaire dans le CE (9–11).

L'objectif de notre travail était double. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de miARNs dans le CE de type I, grade 1-2, en comparant les profils d'expression des miARNs au sein des tumeurs associées ou non à un envahissement ganglionnaire. L'amélioration des connaissances biologiques de ces cancers, et en particulier de leur profil moléculaire, devrait permettre de mieux comprendre le développement et le comportement de ces tumeurs. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la corrélation entre le seuil d'expression de miARNs d'intérêts et le statut ganglionnaire. La corrélation de ces niveaux d'expression de miARNs au statut ganglionnaire devrait permettre de constituer un nouvel outil diagnostique et une aide à la prise en charge thérapeutique.

Nous avons donc étudié, par une technique d'hybridation sur puce associée à une analyse bioinformatique, les profils d'expression de 2560 miARNs matures selon le statut ganglionnaire. Une analyse d'enrichissement a permis de confirmer que les miARNs, dont les profils d'expression variaient selon le statut ganglionnaire, étaient impliqués dans des voies de cancérogénèse et de processus métastatique. Les niveaux d'expression des principaux miARNs mis en évidence par l'étape précédente (miR-34c-5p, miR-375, miR-184, miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-148a-3p, miR-504-5p, miR-129-5p, miR-5001-5p, miR-6068, miR-4467, et miR-6850-5p) ont été validés par rétrotranscription (RT) - réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR). Une analyse statistique a finalement permis d'établir des seuils d'expression des miARNs (miR-375, miR-184, miR-34c-5p, miR-34b-5p, miR-148a-4p, miR-129-5p, et miR-4467) significativement associés au statut ganglionnaire. Le même travail a par la suite été réalisé pour établir une corrélation entre les profils d'expressions de miARNs et la présence d'embolus tumoraux, autre marqueur pronostic majeur dans le CE.

II - Micro-ARN et cancer de l'endomètre.

II - Micro-ARN et cancer de l'endomètre.

II.A – Endomètre : du normal au pathologique

II.A.1 – Variations physiologiques

II.A.1.a – Généralités

La paroi de l'utérus est essentiellement composée de deux tuniques : la muqueuse ou endomètre et la musculieuse ou myomètre. On distingue ainsi deux zones au niveau de l'endomètre : l'endomètre basal (stratum basale), au contact du myomètre, d'aspect plus foncé, qui reste toujours présent au cours du cycle avec des variations morphologiques minimales et l'endomètre fonctionnel (stratum spongiosum), qui répond aux sollicitations des hormones (œstrogènes et progestérone) et desquame lors de chaque menstruation. (Figure 1). La zone fonctionnelle est régénérée en début de chaque cycle menstruel par la zone résiduelle. A la ménopause, l'absence d'hormones stéroïdes conduit à l'atrophie du tissu endométrial. (220)

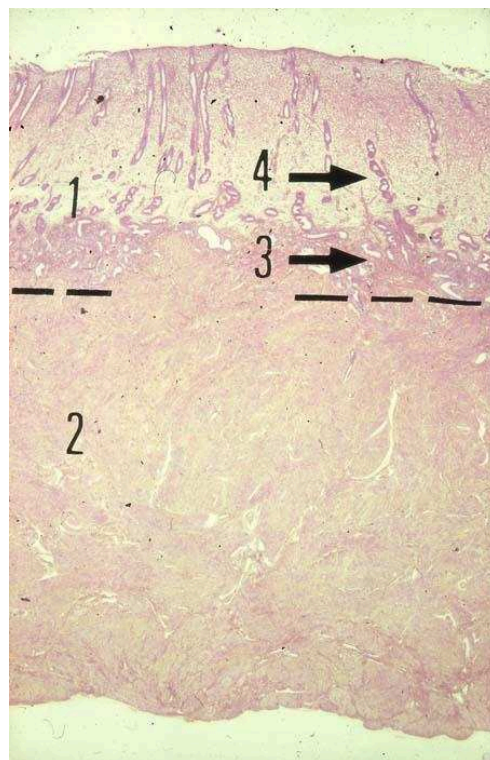


Figure 1 : Coupe histologique endomètre et myomètre (HES, x5)

(d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, FUNDP, consulté à partir de <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/index.htm>). 1 : endomètre ; 2 : musculieuse ; 3 : zone profonde résiduelle ; 4 : zone fonctionnelle

II.A.1.b – Influence des hormones stéroïdes sexuelles sur l'endomètre

L'action des hormones stéroïdes sexuelles sur l'endomètre est effectuée par l'intermédiaire de récepteurs hormonaux spécifiques : récepteurs aux estrogènes (RE) et récepteurs à la progestérone (RP).

Les estrogènes, hormones de prolifération, sont capables d'agir sur l'endomètre, même au repos, car c'est sous l'influence du 17 β estradiol qu'apparaissent ses propres sites récepteurs (252). Les estrogènes font proliférer cette muqueuse qui augmente ainsi d'épaisseur et la quantité d'estrogènes circulants est corrélée à l'intensité de ce phénomène.

La progestérone n'a quand à elle aucun effet sur une muqueuse au repos puisqu'il faut que l'endomètre soit déjà sous influence estrogénique pour que son action puisse se manifester. C'est en effet le 17 β œstradiol qui, au cours de la phase pré-ovulatoire, détermine l'apparition puis l'augmentation des sites récepteurs à la progestérone.

La progestérone inhibe l'action des estrogènes deux façons :

- en inhibant la synthèse des récepteurs des estrogènes et par voie de conséquence des récepteurs de la progestérone, avec une action antiproliférative, qui se manifeste tant sur les glandes que sur le stroma, avec arrêt de la multiplication cellulaire à tous les niveaux, et disparition des mitoses
- en synthétisant la 17 β -hydroxydéshydrogénase au niveau des glandes qui convertit l'estradiol en estrone ayant une faible affinité pour les récepteurs des estrogènes.

La chute du taux de progestérone en fin de cycle va déclencher la menstruation en induisant la vasoconstriction des artères spiralées qui est modulée par des prostaglandines telles que PGF2 α et ET-1, sécrétées localement et de façon abondante en phase prémenstruelle au niveau de l'endomètre et du myomètre superficiel (221).

II.A.1.c – Phase proliférative

La phase proliférative reflète les effets de l'estradiol produit par les cellules granuleuses des follicules ovariens. Elle correspond aux 14 premiers jours du cycle avec augmentation des mitoses et de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) cytoplasmique. On y constate (Figure 2), sous l'effet des estrogènes, une augmentation du volume de la muqueuse endométriale en rapport à une prolifération du stroma, des glandes et des vaisseaux. En microscopie, les glandes sont droites et perpendiculaires à la surface au début de la phase proliférative puis deviennent volumineuses et tortueuses durant la phase proliférative intermédiaire et tardive. Elles sont bordées par un épithélium pseudostratifié, fait de cellules cylindriques aux noyaux en forme de cigare avec de nombreuses figures de mitoses et un petit cytoplasme éosinophile. Puisqu'il y a régénération de toute la zone fonctionnelle, il est normal d'y rencontrer de nombreuses mitoses. Le chorion cytogène est dense, œdémateux et les vaisseaux sont fins. (220)

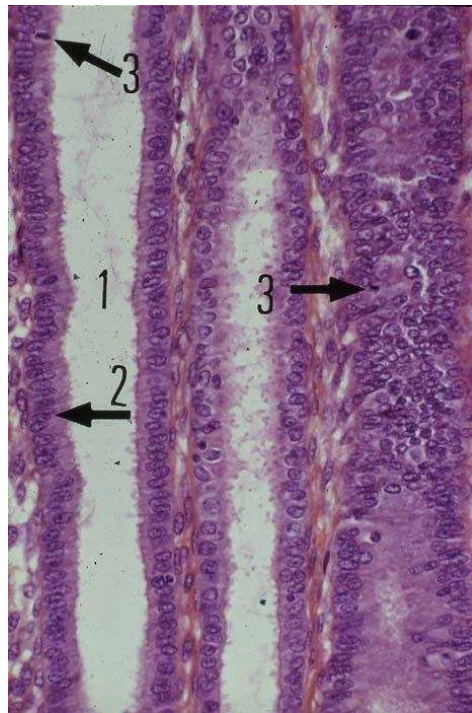


Figure 2 : Glandes de l'endomètre en phase de prolifération (HES, x400)

(d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, FUNDP, consulté à partir de <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/index.htm>). En 1, la lumière des glandes tubuleuses. Fléché en 2, l'épithélium cylindrique simple. Fléché en 3, les mitoses.

II.A.1.d – Phase sécrétoire

La phase sécrétoire traduit les effets combinés de la production de progestérone et d'estradiol par les cellules granuleuses lutéinisées et les cellules thécales du corps jaune. Elle correspond à la période entre le 14^{ème} et le 28^{ème} jour du cycle et débute après l'ovulation. Cette période a été dénommée fenêtre d'implantation car elle correspond à la courte période pendant laquelle l'implantation est possible. Au-delà de cette période, l'endomètre devient réfractaire.

On y constate (Figure 3), sous l'effet de la progestérone, des modifications glandulaires (apparition de phénomènes sécrétoires), stromales (transformation déciduiforme) et vasculaires (épaississement des parois des artérioles qui se disposent en hélices = artérioles spiralées). L'apoptose n'est pas mise en évidence dans les glandes pendant la phase proliférative grâce à l'action de bcl-2 et elle va permettre la diminution progressive du volume des glandes pendant la phase sécrétoire (222).

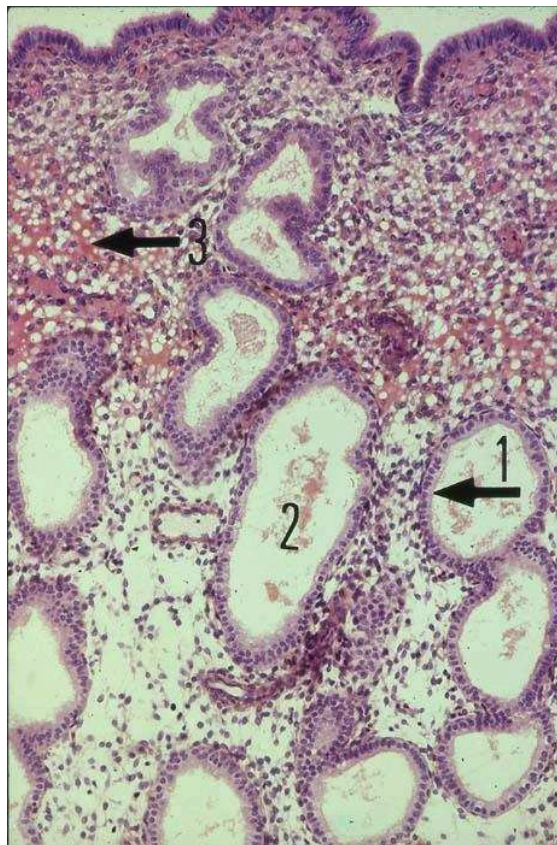


Figure 3 : Glandes de l'endomètre en phase de sécrétion (HES, x200)

(d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, FUNDP, consulté à partir de <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/index.htm>). En 1 l'épithélium cylindrique du premier stade (mais contrairement à ce stade de prolifération, il n'y a plus de mitoses ni d'images de pseudostratification). En 2, la lumière des glandes est beaucoup plus large et plus déformée. En 3, le chorion est bourré d'œdème.

II.A.1.e – Phase menstruelle

La phase menstruelle est le résultat d'une autodigestion enzymatique et d'une nécrose ischémique liées aux prostaglandines. Le tissu menstruel correspond à des cellules du stroma en agrégats sous forme de morules, des glandes rompues et un fond hémorragique et inflammatoire (Figure 4). La menstruation est stoppée par la vasoconstriction des artères de la partie basale de la muqueuse qui est mise à nu et des artères radiaires et arquées présentes dans le myomètre. (220)

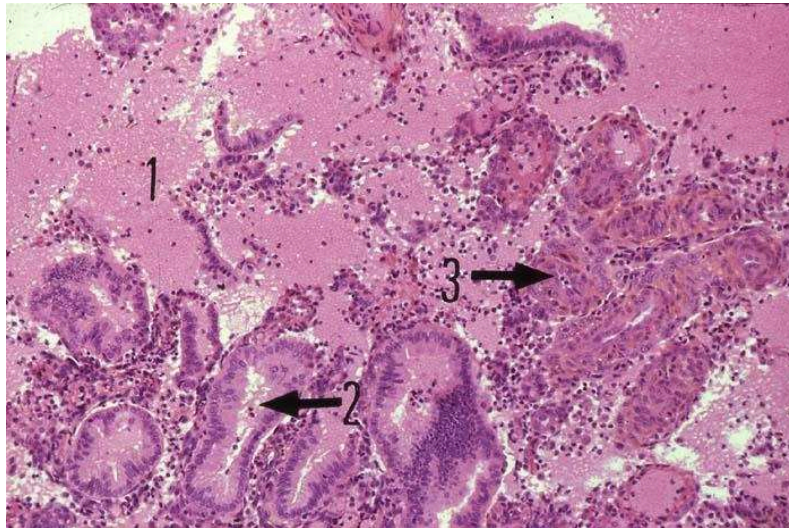


Figure 4 : Endomètre en phase de menstruation (HES, x100)

(d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, FUNDP, consulté à partir de <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/index.htm>). En 1, des globules rouges dans le chorion. En 2, les tubes glandulaires déformés. En 3, des fragments d'artéioles spiralées.

II.A.1.f – Endomètre à la ménopause

En l'absence d'estrogènes endogènes ou exogènes, l'endomètre devient inactif puis atrophique. Sa faible épaisseur correspond à la moitié de l'épaisseur de la partie basale d'une muqueuse en période préménopausique. Les glandes y deviennent parallèles à la surface de l'épithélium et ne contiennent plus de mitoses. Il n'y a plus de séparation nette entre la partie fonctionnelle et la partie basale. Le stroma est fibreux, et les vaisseaux sont oblitérés par la fibrose. Au début de l'installation de la ménopause, la synthèse des récepteurs des estrogènes est maintenue. En l'absence de progestérone, une stimulation estrogénique exogène peut induire une hyperplasie qui régresse sous l'action de la progestérone. (220)

II.A.2 – Lésions pré cancéreuses

Les carcinomes endométriaux de type I sont œstrogénodépendants et se développent dans un contexte d'hyper-œstrogénie selon une séquence hyperplasie et cancer (223).

La classification des hyperplasies glandulaires de l'endomètre est basée sur l'architecture (simple ou complexe) et sur les atypies cellulaires (avec ou sans atypies) :

- L'hyperplasie glandulaire simple correspond à l'augmentation homogène du nombre des glandes endométriales mais sans modification importante du rapport glande/stroma.
- L'hyperplasie glandulaire complexe correspond à l'augmentation du nombre de glandes avec un rapport glande/stroma pouvant aller jusqu'à 3/1. Les glandes sont bordées soit par des cellules régulières (hyperplasie glandulaire sans atypie) soit par des cellules irrégulières (hyperplasie glandulaire avec atypie).
- L'hyperplasie endométriale avec atypies présente un rapport glande/stroma élevé, des lésions architecturales diffuses (aspect de papilles) et des histiocytes spumeux dans le stroma. Jusqu'à 30 % des hyperplasies glandulaires avec atypies sont associées ou évoluent vers un adénocarcinome de type endométrioïde (224-227). L'hyperplasie atypique est actuellement considérée comme une lésion précancéreuse des adénocarcinomes de type endométrioïde et nécessite un traitement adapté consistant le plus souvent en une hystérectomie totale. D'après Hecht et Mutter (228, 229), les lésions d'hyperplasie atypique se développent à partir d'un clone sur lesquelles des mutations additionnelles, incluant généralement des anomalies au niveau de PTEN, de K-Ras et de la β -caténine, conduisent à une lésion invasive. L'analyse en CGH (hybridation génomique comparative) de lésions d'hyperplasie atypique rapportent le même type d'anomalies génétiques entre ces lésions hyperplasiques atypiques et les lésions endométriales invasives de type I (230). L'exposition aux hormones stéroïdes sexuelles peut agir sur la sélection des clones mutants.

II.B- Adénocarcinome de l'endomètre.

II.B.1- Epidémiologie.

Le CE est le cancer gynécologique le plus fréquent ; en termes d'incidence, il se situe au 4^{ème} rang des cancers chez les femmes. Il survient le plus souvent chez des femmes entre 55 et 65 ans, en période post-ménopausique et est diagnostiqué dans 14% des cas en période pré-ménopausique et dans 5% des cas avant 40 ans (12). L'incidence est plus élevée chez les femmes d'origine caucasienne que chez les femmes d'origine africaine ou asiatique et dans les populations urbaines par rapport aux populations rurales (13).

Le pronostic de ce cancer est réputé favorable car il est le plus souvent limité à l'utérus. La survie globale à 5 ans est estimée à 80% pour les stades I de la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO) I (tumeur limitée au corps de l'utérus), 60% pour les stades FIGO II, 30% pour les stades FIGO III et 5% pour les stades FIGO IV (13). Néanmoins, il s'agit d'une pathologie hétérogène et la survie globale à 5 ans peut varier de 92% à 42% dans les stades I selon le type histologique et le grade de la tumeur (14).

Les facteurs de risque de cette pathologie sont relativement bien connus : prédisposition génétique de type HNPCC (Cancer colorectal héréditaire sans polypose), ménarche précoce et ménopause tardive (plus de 55 ans) augmentant la fenêtre d'exposition aux hormones sexuelles, nulliparité, obésité, traitement par tamoxifène et existence d'une hyperplasie endométriale avec atypies (15). Le diabète est facteur de risque controversé, puisque parmi les 4 études de cohortes sur lesquelles un ajustement a pu être fait sur l'Indice de Masse Corporelle (IMC), le diabète est resté un facteur de risque significatif que dans un cas. Le dispositif intra-utérin (DIU) au levonorgestrel semblerait avoir un effet protecteur sur le CE. (12)

II.B.2- Anatomie pathologique.

La biopsie endométriale confirme la malignité, mais permet également d'identifier le type histologique et d'évaluer le grade. Durant les 30 dernières années, les analyses de l'histologie, des récepteurs hormonaux et du grade ont permis de différencier 2 types de CE que sont les types I et II (12,16,17).

Le type I, forme la plus fréquente (80% des CE), est le plus souvent de type endométrioïde avec des récepteur hormonaux positifs et ressemble sur le plan morphologique à un endomètre en phase proliférative. Dans cette forme, il est possible d'observer une différenciation épidermoïde, séreuse, mucineuse ou à cellules claires mais qui ne doit pas occuper plus de 10% du volume tumoral. En général, il s'agit de cancer de bon pronostic, de stade I. Il peut présenter des variants histologiques (villo-glandulaire, sécrétoire et à cellules ciliées). Un adénocarcinome endométrioïde est le plus souvent d'architecture tubulo-glandulaire, parfois en nappes confluentes. Les cellules tumorales sont cylindriques, stratifiées et présentent des atypies cytonucléaires variées (17).

Le grade histologique s'applique uniquement à l'adénocarcinome endométrioïde. Ce grade est basé sur l'architecture et les atypies cytonucléaires. Tout d'abord, le grade est évalué selon l'architecture de la tumeur : grade 1 si les zones solides occupant moins de 5% de la tumeur ; grade 2 si les zones solides occupent de 6 à 50% de la surface tumorale et grade 3 si elles excèdent plus de 50% de la surface tumorale. Puis, si les atypies cytonucléaires sont très importantes, le grade 1 passe en grade 2 et le grade 2 en grade 3. (17) (Figure 5)

Les autres types histologiques de CE sont plus rares et figurent dans le tableau rappelant la classification anatomopathologique proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003) (tableau 1).

Tableau 1 : classification des carcinomes de l'endomètre (selon OMS, 2003)

Carcinome endométrial endométrioïde	Carcinome endométrial non endométrioïde
Variante commune : - carcinome endométrioïde avec/sans différenciation épidermoïde	- carcinome séreux papillaire - carcinome à cellules claires - carcinome épidermoïde
Variantes rares : - adénocarcinome villoglandulaire - adénocarcinome sécrétoire - adénocarcinome à cellules ciliées	- carcinome mucineux - carcinome mixte - carcinome transitionnel - carcinome à petites cellules - carcinome indifférencié

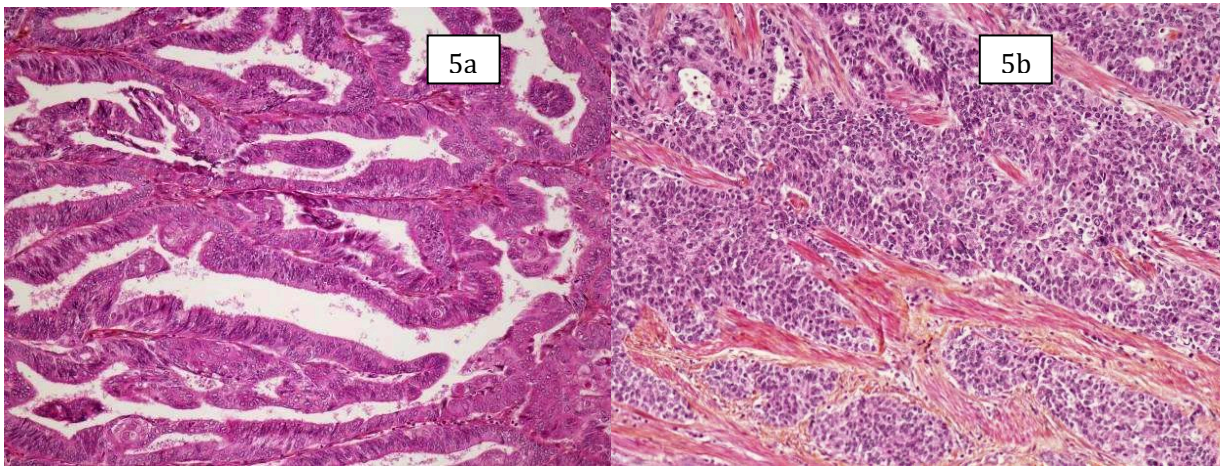


Figure 5 : adénocarcinomes de l'endomètre, aspects anatomopathologiques. adénocarcinome endométriode bien différencié de grade 1 (5a, x200) et peu différencié de grade 3 (5b, x200), (coloration HES, d'après Doll, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2008) (16) (220).

Toutefois, cette classification binaire ne rend pas exactement compte du pronostic de toutes les patientes. En effet, 20% des patientes ayant un adénocarcinome endométriode (supposé de bon pronostic) récidivent dans les 5 ans et à l'inverse, 50% des patientes ayant un adénocarcinome non endométriode ne récidiveront pas. Ainsi, une classification moléculaire prenant en compte les aspects génétiques associés aux carcinomes endométriodes devrait permettre de mieux préciser le pronostic de ces lésions. (12)

II.B.3- Aspects de génétique moléculaire associés aux carcinomes endométrioides de l'endomètre.

Une revue de la littérature (12) a permis de rappeler les types et les pourcentages de mutations retrouvées selon le type histologique de CE (Tableau 2). Les gènes clés de la carcinogenèse endométriale seraient deux gènes suppresseurs de tumeurs : PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), pour les tumeurs de type I et P53 pour les tumeurs de type II. D'autres anomalies génétiques semblent également impliquées à des degrés variables dans le développement des carcinomes endométriaux comme K-Ras, bêta-caténine, l'instabilité des microsatellites (MSI) (12). Plus récemment, les analyses systématiques du génome des tissus endométriaux néoplasiques confirment la prépondérance des mutations de gènes tels que PTEN et K-RAS (231). Aussi, Kandoth et coll. démontrèrent par analyse du génome de 373 échantillons de CE que l'on pouvait classer les lésions selon 4 groupes moléculaires avec un pronostic spécifique pour chacun (Figure 6). Là aussi, les cancers de l'endomètre de type II étaient associés à d'avantage de mutation P53 et à un mauvais pronostic. On relève néanmoins une nouvelle catégorie de cancer associé à un bon pronostic et présentant une mutation du domaine exonucléase de l'ADN polymérase ϵ (POLE). (232)

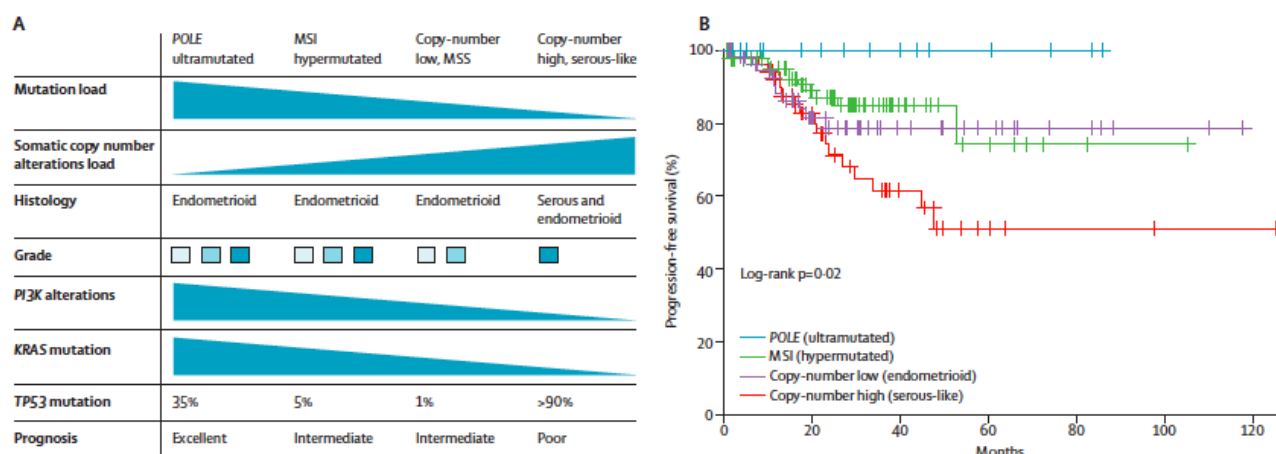


Figure 6 : A) classification moléculaire des cancers de l'endomètre en 4 groupes (ultra-muté, hyper-muté, faible nombre de copies, nombre de copies élevé). B) Survie sans récurrence du cancer de l'endomètre selon les 4 groupes moléculaires. (D'après Kandoth et all., Nature, 2013 (232))

Tableau 2 : Mutations identifiées dans le cancer de l'endomètre selon le type histologique. (D'après Morice et coll., Lancet, 2015 (12))

	Endometrioid	Serous	Carcinosarcoma	Clear cell
Bokhman subtype	I	II	II	II
TP53 mutation	Rare	>90%	60-90%	35%
PI3K alterations	PTEN mutation (75-85%) PIK3CA mutation (50-60%) PIK3R1 mutation (40-50%)	PTEN mutation (11%) PIK3CA amplification (45%) PIK3CA mutation (35%) PIK3R1 mutation (12%)	PTEN mutation (19%) PIK3CA mutation (35%) PIK3CA amplification (14%)	PTEN loss (80%) PIK3CA mutation (18%)
KRAS mutation	20-30%	3%	17%	0%
ERBB alterations	None	ERBB2 amplification (25-30%)	ERBB2 amplification (13-20%) ERBB3 amplification or mutation (13%)	ERBB2 mutation (12%) ERBB2 amplification (16%)
FGFR amplification or mutation	FGFR2 mutation (12%)	FGFR2 mutation (5%) Frequent FGFR1 and FGFR3 amplification	FGFR3 amplification (20%)	..
Wnt/ β -catenin	CTNNB1 mutation (25%)	CTNNB1 mutation (3%)	..	..
Other	ARID1A mutation (35-40%)	PPP2R1A mutation (20%) FBXW7 mutation (20% of undifferentiated endometrial carcinoma) LRPB1 deletion Frequent amplifications in MYC, CCNE1, and SOX17	PPP2R1A mutation (28%) FBXW7 mutation (35-40%) ARID1A mutation (25%) CCNE1 amplification (42%) SOX17 amplification (25%)	ARID1A (25%) TERT promoter mutations

Les principales lésions mutations retrouvées dans le cancer de l'endomètre de type I sont détaillées ci-dessous.

PTEN.

L'anomalie génétique la plus fréquemment retrouvée dans les carcinomes de l'endomètre concerne PTEN qui code pour une protéine ayant une fonction tyrosine kinase et une activité phosphatasique lipidique et protéique (18). Cette protéine est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et intervient sur le mécanisme de l'apoptose en induisant la surexpression de facteurs anti-apoptotiques incluant certaines caspases et en réduisant l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que bcl-2 (B-cell lymphoma 2). L'activité phosphatasique de cette protéine est aussi impliquée dans les processus d'adhésion cellulaire et dans l'inhibition des voies de signalisation des facteurs de croissance MAPK (Mitogen-activated protein kinase) dépendantes. La perte de l'activité PTEN aboutit à une croissance et une migration cellulaires anormales et à l'échappement aux mécanismes de l'apoptose (19). L'inactivation de PTEN augmente également la demi-vie de p53 (21).

Plus de 80% des adénocarcinomes endométrioïdes et plus de 55% des lésions précancéreuses de l'endomètre ont une perte d'expression de PTEN suggérant la précocité de survenue de cette anomalie dans le processus de carcinogénèse ; cette perte d'expression étant par ailleurs le plus souvent liée à une mutation et plus rarement à une perte d'hétérozygotie (LOH) (18). La méthylation du promoteur a été retrouvée dans 20% des tumeurs ayant une anomalie de PTEN, souvent associée à une instabilité des microsatellites et à un stade évolué alors que l'inactivation de PTEN liée à une mutation est associée à un stade précoce et un pronostic plus favorable (20).

Instabilité des microsatellites.

Les gènes essentiellement concernés sont les gènes hMLH-1, hMSH-2 et hMSH-6 qui codent pour des enzymes responsables de la réparation des anomalies survenant au cours de la réplication de l'ADN. Les anomalies ont été détectées initialement chez les patients présentant des cancers colorectaux de type HNPCC (Cancer colorectal héréditaire sans polypose) et pour lesquels le risque de développer d'autres cancers est élevé (ovaire, estomac, intestin, voies urothéliales, voies hépatobiliaires, cerveau, glandes sébacées) (24). Généralement, les patients ont une mutation germinale au niveau de la séquence d'ADN d'un de ces gènes. Quand une mutation somatique vient se surajouter au niveau du même gène et l'inactiver, on voit apparaître le phénotype MSI (25). Dans le CE, il s'agit le plus souvent d'anomalies conduisant à l'inactivation épigénétique ou à l'extinction de ces gènes et non pas de mutations, comme par exemple l'hyperméthylation des îlots

CpG du promoteur de ces gènes (26). La MSI est retrouvée dans 17 à 25% des formes sporadiques de CE de type I et très rarement dans les CE de type II et surviendrait précocement dans le processus pathologique (22,23). Les cancers de l'endomètre avec MSI auraient un meilleur pronostic que ceux ayant un phénotype MSS (stable) (27). Le risque cumulé de CE à 70 ans serait de 54% en cas de mutation MLH1, 21% en cas de mutation MSH2 et 16% en cas de mutation MSH6 (12,24).

K-ras.

Le proto-oncogène K-ras code pour une GTPase membranaire impliquée dans la croissance et la différenciation tumorales. Les mutations de K-ras ont été mises en évidence dans 19 à 46% des cancers endométriaux de l'endomètre et concernent essentiellement l'exon 1 (codons 12 et 13) et plus rarement l'exon 2 (codon 61) (28). On retrouve les mutations de K-ras dans 16% des hyperplasies endométriales suggérant qu'il s'agit d'un événement survenant précocement dans la carcinogénèse endométriale (29). Les mutations de K-ras sont retrouvées plus fréquemment dans les tumeurs de phénotype MSI et ont une distribution topographique homogène, suggérant que ces 2 événements surviennent simultanément avant l'expansion clonale alors que les mutations de PTEN ne coexistent pas avec celles de K-ras au sein d'une même tumeur (30,31).

β-caténine.

Les caténines sont des protéines cytoplasmiques qui ont été classées selon leur mobilité électrophorétique. Le gène de la β-caténine (CTNNB1) joue un rôle essentiel dans l'organisation du cytosquelette et l'adhésion inter-cellulaire médiée par l'E-cadhérine et agit sur la voie de signalisation Wnt. La concentration intracellulaire de β-caténine est très étroitement régulée par un complexe multiprotéique (associant la sérine/thréonine kinase GSK3β (glycogène synthétase kinase), la protéine APC (adenomatous polyposis coli) et l'axine) qui facilite sa phosphorylation et sa dégradation (32). Les mutations de la β-caténine sont présentes dans 30 à 40% des cancers endométriaux de l'endomètre et conduisent à l'accumulation de β-caténine dans le cytoplasme et à sa translocation dans le noyau de la cellule où elle active directement ou indirectement ses gènes cibles (c-myc, cyclin D, MMP-7), alors qu'on retrouve ces mutations de façon exceptionnelle dans les cancers non endométriaux (33–35). L'accumulation nucléaire de β-caténine a également été démontrée dans les hyperplasies atypiques (36).

POLE.

L'ADN polymérase ϵ , ou pol ϵ , est une ADN polymérase présente chez les eucaryotes et qui intervient dans les processus de réplication de l'ADN et de réparation de l'ADN1. Cette enzyme est constituée de quatre sous-unités : POLE, POLE2, POLE3 et POLE4 ; la sous-unité POLE est la sous-unité catalytique centrale. Il a été initialement montré que les mutations de POLE sur modèle animal (233) puis sur lignées cellulaires humaines (234) étaient associées à la tumorigénèse, notamment dans le CE (235). Ainsi, les mutations de POLE sont retrouvées dans environ 8% des CE en général, et de façon plus prépondérante dans les CE de grade 3 et associées à une amélioration de la survie sans récurrence (232, 236-241).

II.B.4- Prise en charge chirurgicale et stadification ganglionnaire

En cas de CE de stade précoce, il est proposé une chirurgie par voie coelioscopique comprenant au minimum une hystérectomie avec annexectomie bilatérale. La réalisation d'un geste ganglionnaire dépend quant à elle du risque de récurrence selon les recommandations européennes récentes (1) :

- Pour les patientes à risque élevé (Stade FIGO IB et Grade 3) et/ou type 2 histologique, il existe un consensus pour recommander une lymphadénectomie pelvienne et lombo-aortique du fait d'un taux d'envahissement ganglionnaire élevé
- Pour les patientes à risques bas (Stade FIGO IA et Grade 1-2), une lymphadenectomie chirurgicale n'est pas recommandée
- Pour les patientes à risque intermédiaire (Stade FIGO IA et Grade 3 ou Stade FIGO IB et Grade 1-2), une lymphadenectomie chirurgicale est une option de prise en charge

Dans les groupes à risques bas ou intermédiaire, 15% des patientes ont un envahissement ganglionnaire et pourraient bénéficier d'une thérapeutique adjuvante (3). De ce fait, il existe un risque principalement de sous-traitement et plus rarement de sur-traitement de ces patientes si l'indication de traitement adjuvant est fondée sur des critères reposant exclusivement sur l'analyse de la pièce d'hystérectomie.

Ainsi, malgré la connaissance du stade de la maladie et des facteurs histopronostiques évoqués, le statut ganglionnaire après analyse anatomopathologique définitive est mal corrélé à ces paramètres dans près de 15% des cas de CE de bas et moyen risque, suggérant que d'autres paramètres biologiques seraient utiles pour rendre plus pertinente l'analyse pronostique en permettant ainsi d'adapter les stratégies thérapeutiques. Il n'y a pas à l'heure actuelle de recommandations concernant l'utilisation en pratique clinique de paramètres moléculaires permettant d'affiner ce point. D'autres marqueurs biologiques doivent donc être recherchés et évalués afin d'améliorer la prise en charge des patientes.

II.C- Micro-ARNs

II.C.1- Historique

Les miARNs ont déjà fait l'objet de plusieurs revues de la littérature en langue anglaise (37–43) et française (4,44).

Les miARNs constituent une famille d'ARN endogènes de petite taille (environ 22 nucléotides), fonctionnels et non codants avec une séquence conservée au cours de l'évolution (45). On estime à 1 000 le nombre de gènes de miARN dans le génome humain (46).

Le concept de miARN a été soulevé une première fois par Heywood en 1974 lorsqu'il avait décrit le rôle de petites séquences d'ARNs dans la régulation de la traduction et observé leur complémentarité avec les messagers (47–49). Il faudra attendre 1993, pour que Lee et coll. publient sur le sujet en décrivant des petits ARNs non codants, connus sous les noms de lin-4 et let-7, transcrits à partir d'un gène hétérochronique de *C. elegans* et antisens d'un autre gène dont ils modulaient la traduction (50). Les miARNs ont par la suite été retrouvés dans les plantes, les algues vertes, les virus, et de nombreux animaux dont les mammifères (51), mais ce n'est qu'à partir des années 2000 que leur abondance (plusieurs centaines) ainsi que leur rôle dans les processus de développement ont été pleinement appréciés (52–54).

II.C.2- Nomenclature

Dès qu'une séquence a été déterminée comme étant un miARN unique, la base de registre miRBase assigne un nom en accord avec les recommandations existantes (55–57). Dans cette base de données, une séquence de 3 ou 4 lettres désigne l'espèce (« hsa » pour *Homo sapiens*) ; cependant, ce préfixe est souvent omis dans la littérature. La partie principale du nom du miRNA est la désignation « miR » (indiquant une séquence mature), suivi par un numéro d'identification unique attribué séquentiellement. Des suffixes sous forme de lettres sont ajoutés aux miRs, quand ils diffèrent par seulement 1 ou 2 bases (par exemple : miR-10b) et des suffixes sous forme de chiffres sont assignés aux miRs quand ils ont la même séquence mais qu'ils sont dérivés de transcrits primaires différents. Un suffixe – 5p ou – 3p est donné quand les miARNs matures sont dérivés du bras 5' ou du bras 3', du précurseur du miARN. Pour ce domaine en évolution rapide, la miRBase conserve les dernières dénominations de la nomenclature.

II.C.3- Biogénèse des micro-ARNS

Plusieurs revues récentes (4,42–44) décrivent en détail ce mécanisme (figure 7). Les miARNs sont transcrits par l'ARN-polymérase II ou III sous forme de molécules primaires de très grande taille possédant une coiffe du côté 5' et une queue de polyA en 3'. Certains de ces miARNs sont issus de transcrits primaires qui leur sont propres et qui ne contiennent aucune séquence codante. D'autres, au contraire, proviennent de pré-messagers, et ils sont localisés dans leurs introns. Ces transcrits primaires sont ensuite modifiés au niveau nucléaire par la Rnase III Drosha et par le « complexe microprocesseur » DGCR8 pour former des pré-miARN comportant une structure repliée sur elle-même, de type « stem-loop » (« tige-boucle »), d'environ 70 nucléotides. Cette structure en épingle à cheveux est liée à une tige en double chaîne, par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième moitié de la séquence, surmontée d'une boucle en simple chaîne (58–61). Le clivage par Drosha semble être cotranscriptionnel et il peut même arriver que ce soit l'épissage lui-même qui produise le pré-miARN, court-circuitant ainsi l'action de Drosha. Les pré-miARN sont par la suite transportés activement grâce à l'exportine-5 du noyau vers le cytoplasme, au sein duquel ils subissent une maturation complémentaire par l'endonucléase RNase III Dicer (62,63) : la nucléase Dicer va éliminer la boucle en respectant la tige en double chaîne du pré-miARN pour former un duplex imparfait constitué du miARN mature et d'un fragment de taille similaire (miARN*), qui provient du bras opposé du pré-miARN. Ce duplex va être alors incorporé au complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex)/Ago2 au sein duquel l'une des chaînes (miARN*) sera éliminée par la nucléase Argonaute Ago2 (64). Le miARN mature en simple chaîne se retrouvera donc seul dans le complexe miRISC (miRNA-containing ARN induced silencing complex), également appelé miRNP, qui va le guider jusqu'à sa séquence cible sur le messager.

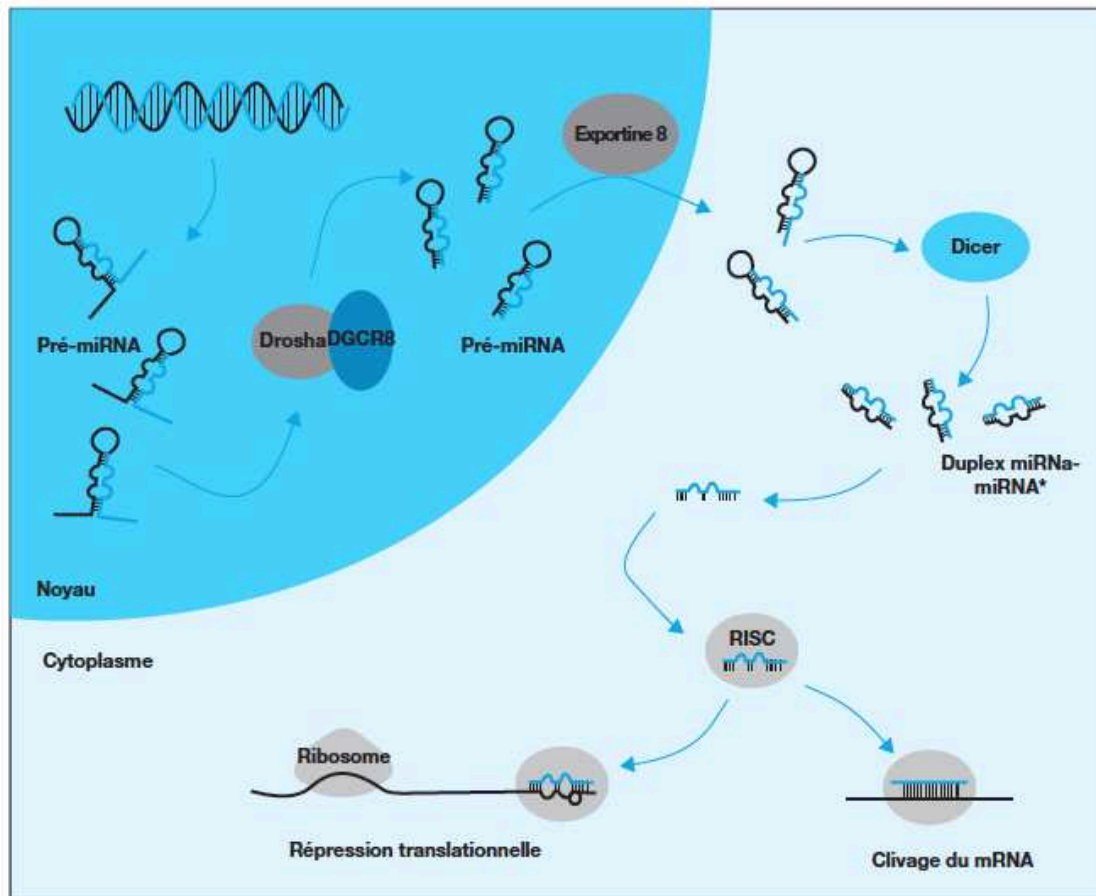


Figure 7 : Représentation schématique de la biosynthèse et de la maturation des micro-ARNs (d'après Bartels et coll., Ann Biol clin, 2010) (44)

II.C.4- Mécanismes moléculaires d'action des micro-ARNs

La compréhension des mécanismes moléculaires d'action des miARNs est en pleine évolution et plusieurs auteurs ont récemment publié sur ce sujet (5,42,65).

Comme représenté dans la figure 8, le miARN est accroché à la protéine Ago de telle sorte que la séquence de nucléotides 2-8 soit dans une conformation optimale à l'appariement avec une séquence complémentaire. L'appariement du miARN avec son ARNm cible se fait en général dans la région 3' non codante de ce dernier, à la faveur d'une complémentarité imparfaite avec une séquence située préférentiellement entre les nucléotides 2 et 7 de la partie 5' du miARN (37,42). Le miARN et l'ARNm vont poursuivre leur appariement en s'enroulant plus ou moins l'un sur l'autre.

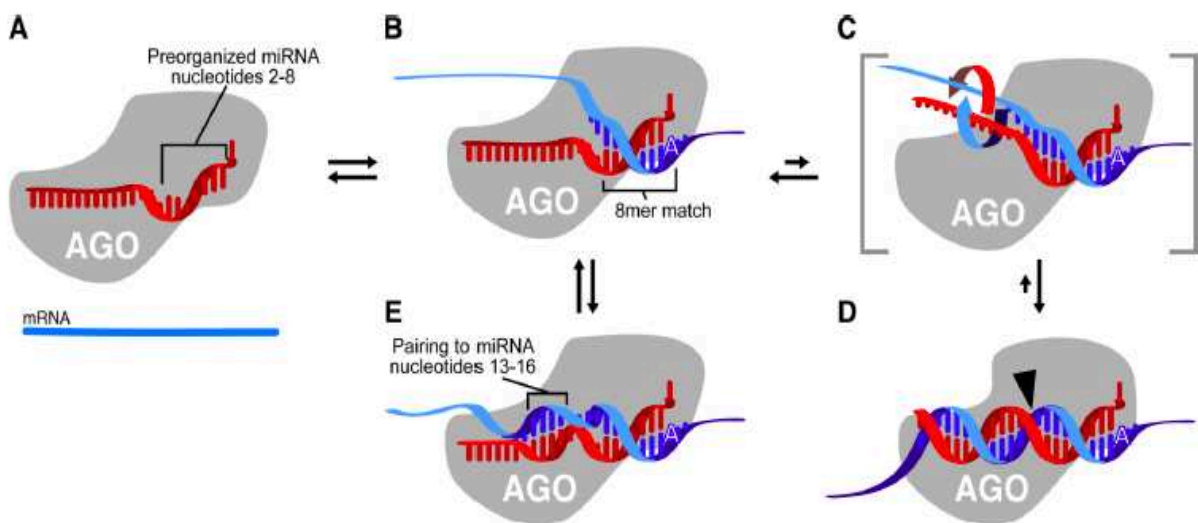


Figure 8 : Modèle illustrant la relation entre le micro-ARN et la protéine AGO (d'après Bartel,Cell,2009) (42)

Trois options sont proposées concernant le mécanisme d'action moléculaire du miARN (figure 9) (4):

- Répression de la traduction. Celle-ci peut s'exercer à deux niveaux : répression de l'initiation ou bloc à l'élongation. Dans le premier cas, la protéine Ago2 présente dans le complexe RISC va empêcher une étape essentielle de l'initiation de la traduction : la fixation du facteur eIF sur la coiffe. Dans le second, le complexe RISC va bloquer la progression des ribosomes sur le messager et favoriser leur détachement induisant ainsi une terminaison prématurée avec production d'une protéine tronquée. Seul le premier mécanisme a pour l'instant reçu une confirmation biochimique ;
- Dégradation du messager. Les premiers travaux sur ce sujet avaient semblé indiquer que le niveau des ARNm ciblés par des miARNs n'était pas notablement réduit. C'est plutôt la notion contraire qui prévaut actuellement où il semble que les messagers sont souvent déstabilisés par leur interaction avec leurs miARNs. L'ARNm est alors déadénylé dans un premier temps avant de subir une dégradation exonucléolytique 3' → 5' ;
- Dégradation de la protéine en cours de synthèse. Cela se fait suite au recrutement de protéases par le complexe miRISC. Ce dernier mécanisme reste encore à l'état d'hypothèse.

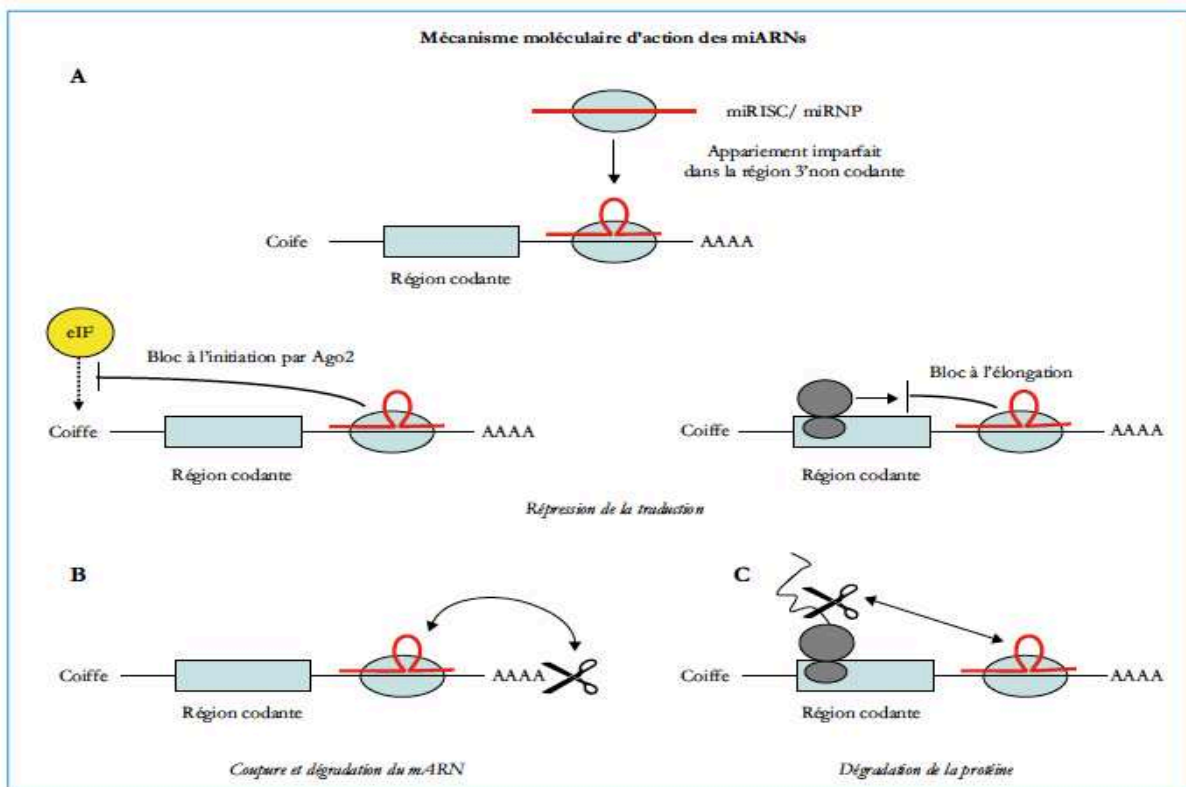


Figure 9 : Mécanisme moléculaire d'action des micro-ARNs (d'après Jeanteur, bulletin du cancer, 2010) (4) miRISC=miRNP : miRNA-containing RNA induced silencing complex

II.C.5- Régulation des micro-ARNs

Les mécanismes qui peuvent conduire à une dérégulation de l'expression des miARNs dans le cancer sont nombreuses et ont fait l'objet de plusieurs revues récentes (39–41,66,67). La production des miARNs peut être régulée à plusieurs niveaux :

- Transcriptionnel par l'ARN polymérase II
- Post transcriptionnel. L'enzyme Drosha est notamment fortement régulée par les récepteurs des estrogènes ER α (68,69), ce qui apparaît fondamental dans les cancers estrogénodépendants tel que le CE (70). En présence d'estrogène, ER α régule négativement la production de certains miARNs en réduisant la maturation de leurs précurseurs par Drosha. Il s'ensuit une stabilisation, donc une surexpression, de certains messagers estrogénodépendants. Ce mécanisme de régulation hormonale des miARNs a pu être mis en évidence in-vitro par plusieurs auteurs (71–73) et notamment par Kong et coll qui a montré en 2014 que le miR-30c (suppresseur de tumeur) est inhibé par un traitement par E2 dans les lignées cellulaires Ishikawa (ER-positive) et HEC-1-B (ER-negative) entraînant une augmentation de l'expression de sa cible le metastasis-associated protein(MTA)-1 et donc la prolifération cellulaire (74). A noter qu'un terrain d'hyper-oestrogénie peut également favoriser la survenue de cancer par l'activation d'oncomiRs tels que let-7 et miR-27a (75). Le travail de Zhang et al. (76) a également montré une fréquence élevée d'amplification des gènes pour les protéines Dicer ou Ago2 qui sont impliquées respectivement dans le processus de maturation des miARNs et leur interaction avec les messagers cibles.
- Pré-transcriptionnel. Calin et coll. ont montré (77) en 2004 qu'environ la moitié des gènes de miARN étaient situés sur des sites fragiles ou bien des zones de susceptibilité au cancer. Aussi, l'amplification génomique, les délétions chromosomiques, les mutations ponctuelles et les méthylations aberrantes des promoteurs sont les principaux mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour modifier les profils d'expression des miARNs (78,79). Plusieurs auteurs ont notamment montré que la méthylation de certains miARNs (miR-145 et -143 (80), 129-2 (81), miR-152 (82)) étaient associés à un mauvais pronostic dans le CE. Aussi, l'hyperméthylation des miR-148a et -152 étaient associés à une instabilité des

microsatellites alors que l'hyperméthylation du miR-18b était associée avec un cancer sporadique (83).

Une inhibition directe de la transcription a également été décrite. Ainsi, le traitement des cellules cancéreuses endométriales par le Tamoxifène induit l'expression de c-Myc. C-Myc va réguler négativement l'expression de la famille du miR-200 par action directe au niveau de son promoteur. A noter que la sous-expression du miR-200 entrainera une levée l'inhibition de ZEB2, puis une sous-expression de E-cadherin pour favoriser le processus EMT. (84) (Figure 10)

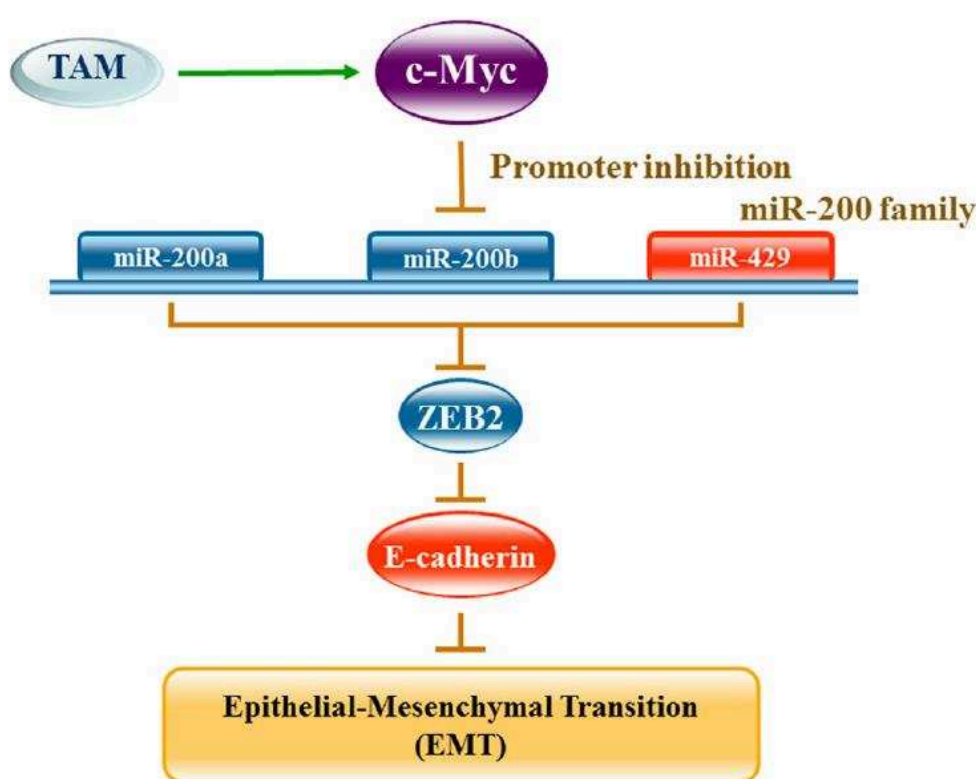


Figure 10 : Inhibition de la transcription de miR-200b par c-Myc (d'après Bai et coll., Endocrinology, 2013) (84) Le traitement par Tamoxifène de cellules de cancer de l'endomètre induit l'expression de c-Myc. C-Myc entraîne la diminution d'expression de la famille miR-200 en se fixant directement au niveau de sa région promotrice. La diminution d'expression de la famille du miR-200 lève l'inhibition de ZEB2. L'élévation de ZEB2 aboutit à la sous-expression de E-Cadherin, qui finalement favorise le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse.

II.C.6- Etude des cibles de micro-ARNs

Une conséquence très importante de la complémentarité imparfaite entre le miARN et sa cible qui prévaut chez l'homme est que plus de la moitié des ARNm possèdent une séquence 3' conservée et appairable avec un miARN et que jusqu'à 400 ARNm peuvent être régulés par une même famille de miARN. (42,85).

Les cibles spécifiques des miARNs sont validées par études fonctionnelles ou bien par outil bio-informatique. Le nombre d'ARNm cibles par miARN variant en fonction du nombre de nucléotides considérés sur le miARN. (figure 11).

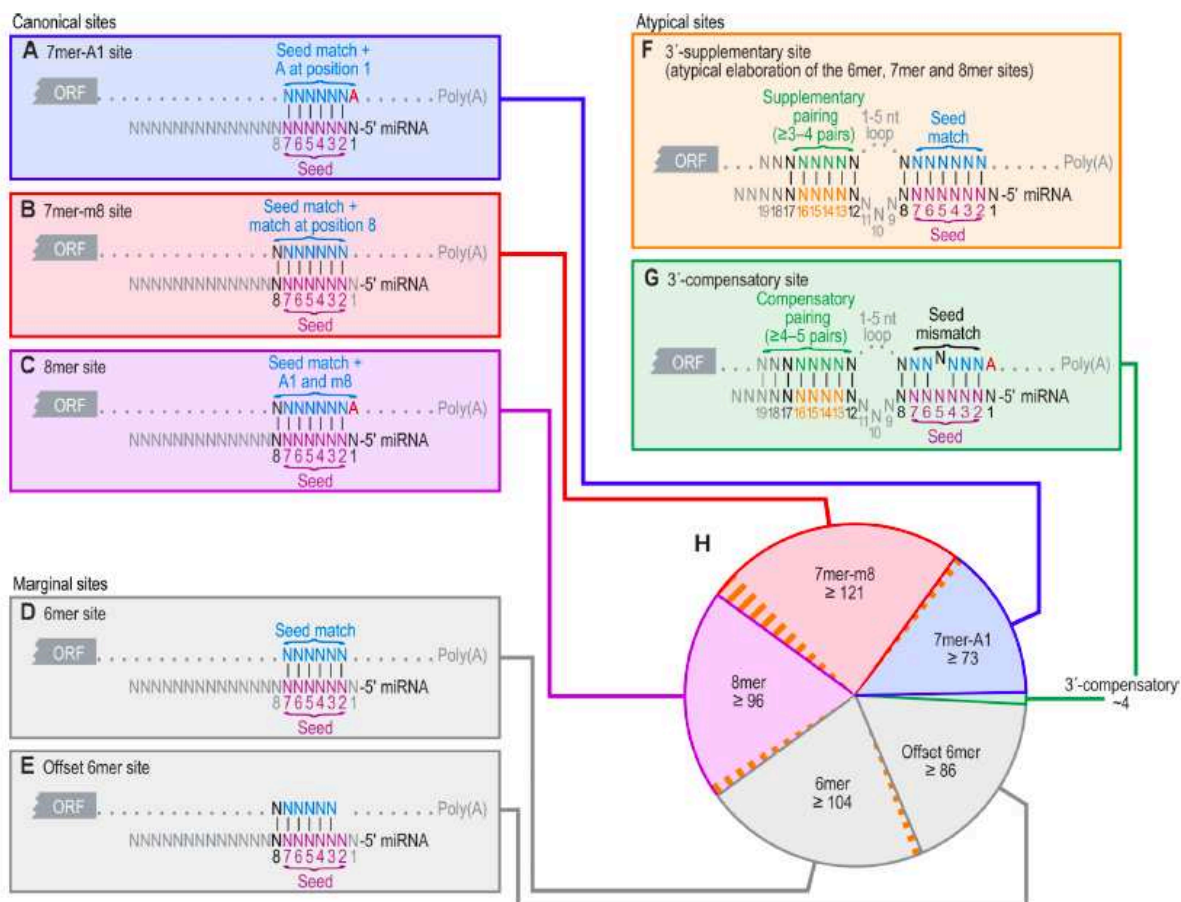


Figure 11 : Types de cibles des miARNs (d'après Bartel, Cell, 2009) (42) L'appariement entre les micro-ARNs et leur ARNm peut s'effectuer au niveau de sites canoniques (A-C), marginaux (D-E) ou atypiques (F-G).

Différents sites internet ont été conçus pour rechercher les ARNm cibles d'une famille donnée de miARNs. parmi lesquels on peut citer mirbase (<http://www.mirbase.org>), mirtarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>), miRsearch (<https://www.exiqon.com/miRSearch>), miRDB (<http://www.mirdb.org>) (42)

Une liste plus ancienne d'applications permettant de déterminer les ARNm cibles des miARNs avaient déjà été listée par Bartel et coll. en 2009 (42) (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des applications permettant de déterminer les ARNs messagers cibles des micro-ARNs (d'après Bartel, Cell, 2009) (42)

Tool (Refs)*	Clades**	Criteria for Prediction and Ranking	Website URL
Site conservation considered			
TargetScan (1)	m	Stringent seed pairing, site number, site type, site context (which includes factors that influence site accessibility); option of ranking by likelihood of preferential conservation rather than site context	targetscan.org
	f,w	Stringent seed pairing, site number, site type	targetscan.org
EMBL (2)	f	Stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability	russell.embl-heidelberg.de/miRNAs/
PicTar (3)	m,f,w	Stringent seed pairing for at least one of the sites for the miRNA, site number, overall predicted pairing stability	pictar.mdc-berlin.de
EIMMo (4)	m,f,w	Stringent seed pairing, site number, likelihood of preferential conservation	mirz.unibas.ch/EIMMo2
Miranda (5)	m,f,w,+	Moderately stringent seed pairing, site number, pairing to most of the miRNA	microRNA.org
miRBase Targets (6)	m,f,w,+	Moderately stringent seed pairing, site number, overall pairing	microrna.sanger.ac.uk
PITA Top (7)	m,f,w	Moderately stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability, predicted site accessibility	genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html
mirWIP (8)	w	Moderately stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability, predicted site accessibility	146.189.76.171/query
Site conservation not considered			
TargetScan All (9)	m	Stringent seed pairing, site number, site type, site context (which includes factors that influence site accessibility)	targetscan.org
PITA All (7)	m,f,w	Moderately stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability, predicted site accessibility	genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html
RNA22 (10)	m,f,w	Moderately stringent seed pairing, matches to sequence patterns generated from miRNA set, overall predicted pairing and predicted pairing stability	cbcsrv.watson.ibm.com/ma22

* References (refs) for current versions/releases: 1 (mammals, Friedman et al., 2008; flies, Ruby et al., 2007; worms, Ruby et al., 2006); 2 (Stark et al., 2005); 3 (Lall et al., 2006); 4 (Giadatzis et al., 2007); 5 (Betel et al., 2008); 6 (Griffiths-Jones et al., 2008); 7 (Kertesz et al., 2007); 8 (Hammell et al., 2008); 9 (Grimson et al., 2007); 10 (Miranda et al., 2006). Tools are listed according to criteria for prediction and ranking, which for those tools assessed using recent proteomics results corresponds to their overall performance (Baek et al., 2008).

** Letters indicate predictions provided for the mammalian/vertebrate (m), fly (f), worm (w), or additional (+) clades.

II.C.7- Micro-ARN en cancérogénèse et dans la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse

Vu le très large spectre des messagers régulés par des miARNs, ceux-ci se retrouvent notamment impliqués en cancérogénèse (4,43,87) avec des effets diamétralement opposés selon que la cible des miRNAs sera un messenger d'oncogène ou de gène suppresseur et que leur propre dérégulation ira dans le sens d'une surexpression ou au contraire d'une diminution. Selon le même principe que pour les oncogènes et gènes suppresseurs, on distinguera des miARNs à effet oncogène (qualifiés d'oncomirs) et des miARNs à effet suppresseur (on parlera alors de suppresseurs miARNs). Des effets oncogènes pourront résulter de la dérégulation positive d'un oncomir ciblant un gène suppresseur aussi bien que de la dérégulation négative d'un suppresseur mir normalement chargé de contenir l'expression d'un oncogène.

Certains oncomirs et suppresseurs miARNs se retrouvent être particulièrement impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus réversible de reprogrammation des cellules épithéliales immobiles en cellules mésenchymateuses mobiles, prélude essentiel à l'invasion tumorale et à la survenue de métastases. Les caractéristiques de l'EMT sont d'ordre phénotypique (augmentation de la mobilité cellulaire), morphologique (perte de polarité) et moléculaires (acquisition des marqueurs mésenchymateux et perte des molécules d'adhésion cellulaire) (Figure 12) (88)

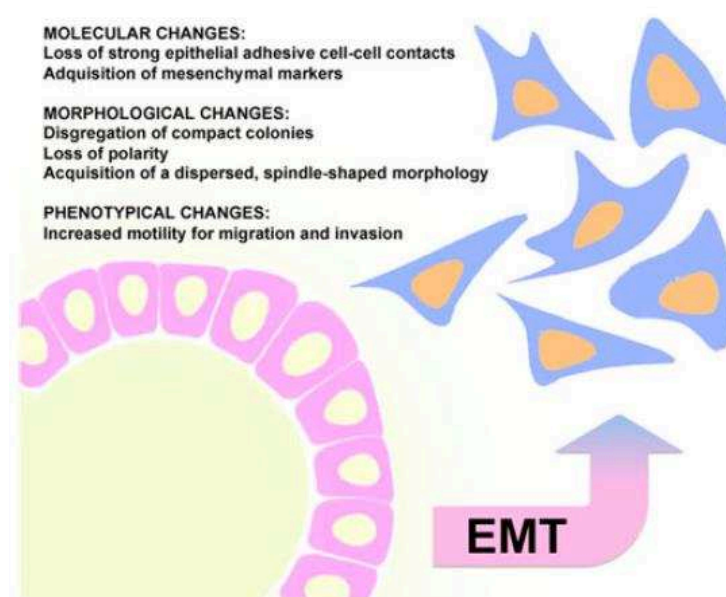


Figure 12 : Caractéristiques générales de la transition épithélio-mésenchymateuses (d'après Colas et coll., Clin Transl Oncol, 2012) (88)

De nombreuses revues récentes (89,90) ont rappelé l'importance de l'EMT dans le processus métastatique du CE.

La figure 13, ci-dessous, résume les différentes voies de signalisation impliquées dans le processus d'EMT aboutissant notamment à l'expression de marqueurs mésenchymateux (N-cadherin, vimentin, S-100A4, A-SMA, fibronectin, MMP9, MMP2) et à la disparition des marqueurs épithéliaux (E-cadherin, cytokératin, A-catenin, claudin) (90).

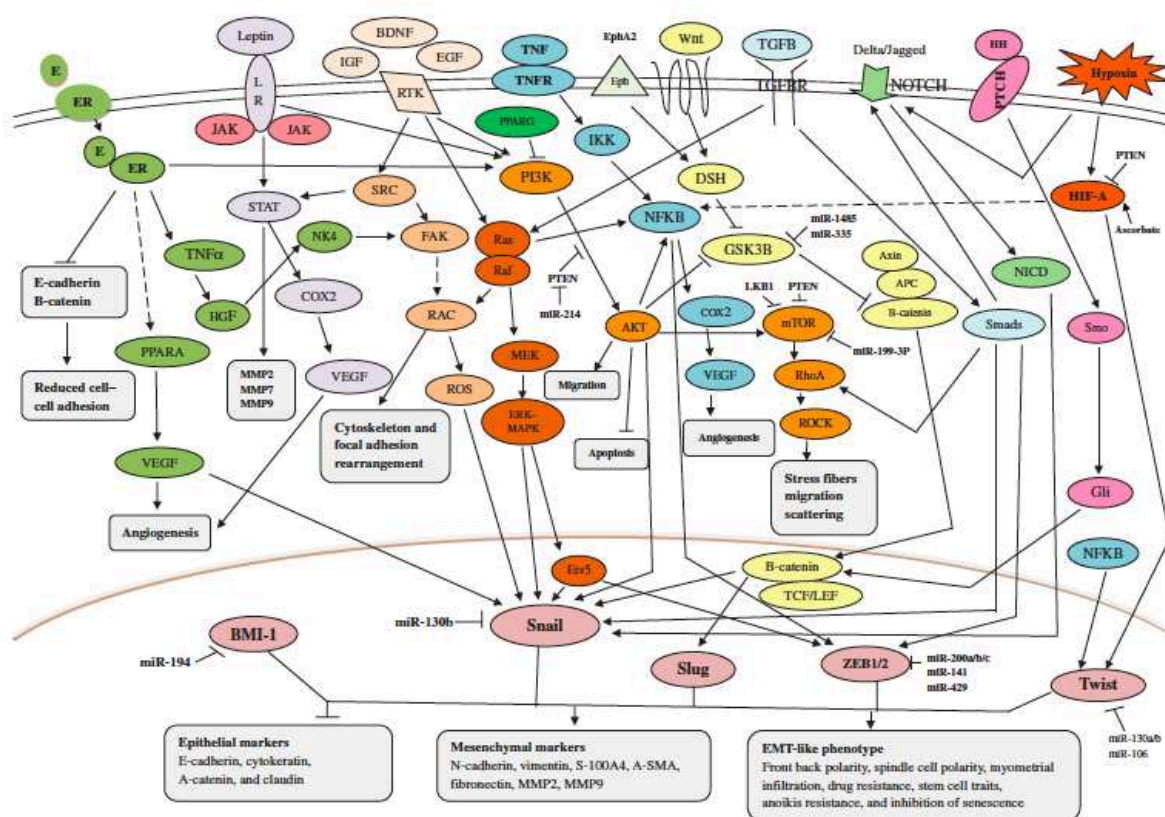


Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de l'endomètre (d'après Makker, Endocr Relat Cancer, 2016) (90)

Une revue de la littérature récente a été proposée par Diaz-Lopez en 2014 (91). Elle met ainsi en évidence les principaux miARNs connus pour être impliqués dans la voie de l'EMT avec leur cible validée (76,92–118). Le profil de ces miARNs est appelé à devenir un facteur pronostique important, dans la mesure où il est associé à l'apparition des métastases. (Tableau 4)

Tableau 4 : Micro-ARNs impliqués dans la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse (d'après Diaz-Lopez et coll., Cancer Manag Res, 2014) (91)

miARN	Organe	Cible du miARN	Référence
miR-1	Prostate	SNAIL 2	(92)
miR-9	Sein	CDH1	(93,94)
miR-10b	Sein, Mélanome	HOXD10	(76,95)
miR-29	Prostate, Sein, Colon-Rectum	SNAIL1, LOX, MMP2, MMP9, VEGFA	(96–99)
miR-30	Poumon	SNAIL1	(100)
miR-34	Sein, Poumon, Colon, Prostate	SNAIL1, NOTCH4, CD44, FRA-1, SIRT1, BCL2, NMYC	(101–103)
miR-103 / miR-107	Sein	DICER	(104)
miR-141	Prostate, Colon-Rectum, Endomètre	ZEB1/ZEB2	(105–107)
miR-192	Foie	ZEB2	(108)
miR-200	Pancréas, Colon-Rectum, Endomètre	ZEB1/ZEB2, SEC23A, BMII	(105,109–112)
miR-203	Prostate, Sein	ZEB2, BMII, RUNX2, SNAIL2	(113,114)
miR-205	Œsophage	ZEB1/ZEB2	(110,115)
LET-7	Sein, Endomètre	HMGA2, BACH1	(116–118)

II.C.8- Micro-ARN et cancer de l'endomètre

II.C.8.a- Généralités

Les miARNs ont souvent des cibles multiples parmi lesquelles on peut trouver aussi bien des oncogènes que des gènes suppresseurs de tumeur. Un même miARN pourra alors avoir des effets opposés selon le tissu où il s'exprime et agir tantôt en oncogène tantôt en gène suppresseur de tumeur. Un cas exemplaire de cette situation est celui des miR-221 et miR-222. Dans les érythroblastes, ces miARNs ciblent, donc régulent négativement, l'oncogène Kit et exercent donc un effet suppresseur de tumeur dans ce tissu (119). Mais dans un certain nombre de tumeurs solides, ils régulent aussi négativement plusieurs suppresseurs de tumeur comme PTEN, p27, p57 et TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) (120). C'est pourquoi, il est important, avant de qualifier un miARN d'oncogène ou de suppresseur, de préciser dans quel tissu il exerce sa fonction.

Il n'existe à ce jour, à notre connaissance, aucune compilation des données concernant l'expression des miARNs décrits dans le CE et leur association avec des facteurs pronostiques. La connaissance de ces miARNs, et de leurs profils d'expression dans le CE permettrait de mieux expliquer certains mécanismes moléculaires associés au CE et servir de base à des tests diagnostiques, pronostiques ou à l'étude de cibles thérapeutiques. Une recherche sur les données de la littérature concernant les miARNs dans le CE a été réalisée en interrogeant les bases de données suivantes :

- Medline : PubMed (Internet portal of the National Library of Medicine)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

- The Cochrane library: Cochrane-database 'Cochrane Reviews' and 'Clinical Trials'

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/106568753/HOME>

DARE

La recherche dans ces bases de données a été complétée par la revue des références contenues dans les méta-analyses, revues systématiques et articles originaux inclus. Seuls les articles publiés en langue anglaise ou française ont été pris en compte.

Cette recherche a permis de colliger les données de 7 revues de littérature (121–127) et de 39 articles originaux (7,8,10,11,73–75,80–84,86,128–153)(154) publiés entre 2008 et 2016 sur les modalités d'expression de 231 miARNs dans le CE comprenant 119 oncomiRs, 98 suppresseurs miRs et 14 miARNs avec des fonctions discordantes selon les études (miR-18b, 23a*, -34a, -130b, -142-3p, -142-5p, -194, -204, -432, -630, -760) (Tableau 5).

Tableau 5 : Micro-ARNs impliqués dans le cancer de l'endomètre

Nom du micro-ARN	Abondance augmentée dans le tissu tumoral ou associée à un mauvais pronostic	Abondance diminuée dans le tissu tumoral ou associée à un meilleur pronostic	Référence
miR-1		X	(137)
miR-1-1		X	(83)
miR-7	X		(137)
miR-9	X		(11,133,139,147)
miR-9*	X		(147)
miR-9-3p	X		(139)
miR-10a	X		(132,137,149)
miR-10b*		X	(137,147)
miR-10b		X	(10)
miR-10b	X		(133)
miR-15b	X		(134)
miR-17	X		(137)
miR-17-5p	X		(132)
miR-18a	X		(137,147)
miR-18a-3p	X		(139)
miR-18b	X		(137)
		X	(83)
miR-19b	X		(133)
miR-21		X	(10)
miR-23a	X		(132)
miR-23a*	X		(137)
		X	(147)
miR-23b		X	(137)
miR-24-1*		X	(137)
miR-25	X		(132)
miR-25p	X		(150)
miR-26a	X		(133)
miR-26a1	X		(133)
miR-27a	X		(75)
miR-27b		X	(137)
miR-28	X		(132)
miR-29b		X	(137)
miR-30a-5p		X	(10)
miR-30a-3p		X	(10)
miR-30c		X	(74,130)
miR-30c2*	X		(137)
miR-31	X		(137,149)
miR-32		X	(133)
miR-33a		X	(137)
miR-33b		X	(133)
miR-33b*	X		(137)
miR-34a	X		(132,145)

		X	(132,145,146)
miR-34b		X	(137)
miR-34b*		X	(137)
miR-34c		X	(138,142)
miR-34c-5p		X	(137)
miR-95	X		(132,137)
miR-96	X		(11,137,147,149)
miR-98	X		(73)
miR-99a		X	(143,148)
miR-99a-3p		X	(150)
miR-99b		X	(149)
miR-100		X	(147,148)
miR-101		X	(137)
miR-103	X		(130,132)
miR-106a	X		(130,132,137)
miR-106b		X	(136)
miR-107	X		(130,132)
miR-123	X		(133)
miR-124a-1		X	(83)
miR-124a-2		X	(83)
miR-124a-3		X	(83)
miR-125a-3p	X		(137)
miR-125b-1	X		(133)
miR-125b-2		X	(134)
	X		(133)
miR-127-3p		X	(137,147)
miR-129-2		X	(81)
miR-129-3p		X	(134)
miR-130b	X		(132)
		X	(135)
miR-132*		X	(137)
miR-133a		X	(134,137)
	X		(133)
miR-133b		X	(134,137,149)
miR-134	X		(137)
miR-135a*	X		(137)
miR-135a	X		(134,139)
miR-135b	X		(10,11,134,137,139)
miR-136		X	(137)
miR-136*		X	(137)
miR-137		X	(134)
miR-139-5p		X	(137)
miR-140-3p		X	(137)
miR-140-5p		X	(137)
miR-141	X		(7,11,132,134,147)
miR-142-3p		X	(137)
	X		(134)
miR-142-5p	X		(134,149)

		X	(137)
miR-143		X	(80,137)
	X		(133)
miR-143*		X	(137)
miR-145		X	(80,137)
miR-145*		X	(137)
miR-145a	X		(133)
miR-146	X		(133)
miR-146a	X		(147)
miR-148a		X	(83,128)
miR-150*	X		(137)
miR-151	X		(132)
miR-152		X	(82,83,130,137,147)
miR-155	X		(131,132,149)
miR-181a	X		(73,86,130)
miR-181c	X		(133)
miR-181c-3p	X		(150)
miR-182	X		(7,11,132,137,139,141,145,149)
miR-183	X		(11,132,133,137,139,141,145)
miR-184	X		(132)
miR-185	X		(130)
miR-186	X		(8)
miR-188-5p	X		(137)
miR-191	X		(132)
miR-193		X	(130)
miR-193a		X	(149)
miR-193a-5p	X		(137)
miR-193b		X	(149)
miR-194	X		(132)
		X	(153,154)
miR-195		X	(10,137)
miR-196a-5p		X	(150)
miR-196b		X	(137)
miR-198	X		(137)
miR-199a-5p		X	(137)
miR-199b-5p		X	(137,139,147)
miR-199b-3p		X	(137,147)
miR-199b		X	(148)
miR-200		X	(84)
miR-200a	X		(11,132,134,137,141,145,147,149)
miR-200a-5p	X		(139)
miR-200a*	X		(7,11,137,152)
miR-200b	X		(11,134,137,147,149,152)
miR-200b*	X		(7,137,147)
miR-200c	X		(11,132–134,137,140,141,147,149)

miR-202	X		(137)
miR-203	X		(11,132,134,137,147,149)
miR-203		X	(155)
miR-204		X	(149)
	X		(8)
miR-204-5p		X	(129)
miR-205	X		(7,10,11,132– 134,137,140,141,145,147,149)
miR-210	X		(130,132,134,137,147,149)
miR-214		X	(137,139)
miR-214*		X	(137)
miR-215	X		(132)
miR-218	X		(139)
miR-221	X		(130)
miR-222	X		(8)
miR-222-3p	X		(144)
miR-223	X		(8,132,133,137)
miR-224	X		(137)
miR-299-3p		X	(137)
miR-299-5p		X	(137)
miR-301	X		(132)
miR-325	X		(132)
miR-326	X		(132)
miR-328-3p		X	(150)
miR-330	X		(132)
miR-330-3p	X		(137)
miR-337-3p		X	(150)
miR-337-5p		X	(137,139)
miR-363	X		(149)
miR-368		X	(149)
miR-369		X	(133)
miR-370		X	(139,147)
miR-371-5p	X		(137)
miR-376a		X	(137,147)
miR-376c		X	(137,139,147)
miR-377		X	(137,139)
miR-379		X	(137)
miR-381		X	(137,147)
miR-409		X	(133)
miR-410		X	(11,137,147)
miR-411		X	(137,145)
miR-421	X		(147)
miR-423	X		(130,133)
miR-424		X	(133,137,147,156)
miR-424*		X	(147)
miR-424-3p		X	(139)
miR-425	X		(133,137)
miR-429	X		(11,134,137,139,147,149,15)

			2)
miR-431		X	(133,147)
miR-432	X		(149)
		X	(147)
miR-449	X		(149)
miR-450a		X	(137)
miR-451		X	(133)
miR-455-3p		X	(137)
miR-455-5p		X	(137)
miR-483-5p	X		(137)
miR-487b		X	(145)
miR-494	X		(137)
miR-496		X	(133)
miR-497		X	(137)
miR-499	X		(10)
miR-501-5p	X		(137)
miR-503		X	(133,137,147,151)
miR-504		X	(134)
miR-505*	X		(137)
miR-513a-5p	X		(137)
miR-513b	X		(137)
miR-516		X	(133)
miR-516a-5p	X		(147)
miR-518c*	X		(137)
miR-519a	X		(134)
miR-542-3p		X	(137,147)
miR-542-5p		X	(137,139,147)
miR-557	X		(137)
miR-564	X		(137)
miR-572	X		(145)
miR-575	X		(137)
miR-596		X	(147)
miR-601	X		(137)
miR-605	X		(147)
miR-610		X	(147)
miR-614	X		(147)
miR-622	X		(137,145)
miR-623	X		(137)
miR-629*	X		(137)
miR-630	X		(137)
		X	(147)
miR-632		X	(147)
miR-650	X		(145)
miR-652	X		(137)
miR-654-3p		X	(137)
miR-663	X		(137)
miR-758		X	(139)
miR-760	X		(137)

		X	(147)
miR-765	X		(137)
miR-768-5p	X		(137)
miR-801	X		(137)
miR-873		X	(137)
miR-877	X		(137)
miR-892b	X		(137)
miR-888	X		(134)
miR-923	X		(137)
miR-936	X		(147)
miR-939	X		(137)
miR-1224-5p	X		(137)
miR-1225-5p	X		(137)
miR-1226*	X		(137)
miR-1228	X		(11)
miR-1247		X	(139)

II.C.8.b- Profil d'expression de micro-ARNs associé au tissu endométrial malin

Une synthèse des données est reportée dans le tableau 6.

La revue de la littérature a permis de relever 17 articles consacrés à l'étude des profils d'expression de miARN au sein de tissu endométrial selon son statut tumoral ou bénin +/- hyperplasique. (10,11,74,86,130,132,133,139–141,145,147–152)

Les études comportaient en moyenne 45 échantillons d'endomètre tumoral (minimum=7 ; maximum=141) avec exclusivement des types I histologiques pour 12 études. Les études comportaient en moyenne 18 échantillons d'endomètre sain (minimum=5 ; maximum=48). L'endomètre sain était issu de pièces opératoires de patientes opérées pour pathologie bénigne, excepté pour 4 études dans lesquelles l'endomètre sain était prélevé dans une région adjacente à la tumeur.

L'extraction d'ARN a été faite de façon équitable à partir de tissu conservé sous paraffine ou à -80°C. L'analyse des niveaux d'expression était réalisée dans sept études à partir de technique d'hybridation sur puce, dans deux études à partir de séquençage de nouvelle génération, et systématiquement par RT-qPCR.

Le tissu endométrial tumoral était le siège (par rapport au tissu endométrial sain) :

- d'une augmentation de l'expression des miR : -9, -9*, -9-3p, -10a, -18a-3p, -19b, -25-5p, -31, -34a, -95, -96, -103, -106a, -107, -130b, -135a, -135b, -141, -142-5p, -146, -151, -155, -181a, 181c-3p, -181c, -182, -183, -184, -191, -194, -200a, -200a*, -200a-5p, -200b, -200b*, -200c, -203, -205, -210, -215, -223, -218, -301, -325, -326, -330, -363, -423, -425, -429, -432, -449, -499
- d'une diminution de l'expression des miR : -10b, -10b* -21, -23a*, -30a-3p, -30a-5p, -30c, -32, -33b, -99a, -99a-3p, -99b, -100, -127-3p, -133b, -152, -193, -193a, -193b, -195, -196a-5p, -199b, -199b-3p, -199b-5p, -204, -214, -221, -328-3p, -337-3p, -368, -369, -370, -376a, -376c, -377, -377-5p, -381, -409, -410, -411, -424, -424*, -424-3p, -431, -432, -451, -487b, -496, -503, -516, -542-3p, -542-5p, -596, -610, -630, -632, -758, -760, -1247

II.C.8.c- Profil d'expression de micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre selon le statut ganglionnaire

Une synthèse des données est reportée dans le tableau 7.

La revue de la littérature a permis de relever 11 articles qui détaillaient en analyse secondaire le profil d'expression des miARNs selon le statut ganglionnaire. (10, 11, 80, 86, 129, 132, 133, 137, 143, 144, 148)

Les études comportaient en moyenne 11 échantillons associés à un statut ganglionnaire positif (minimum= 2 ; maximum=29) et 42 échantillons associés à un statut ganglionnaire négatif (minimum=13 ; maximum=121).

Sept études n'incluaient que des types I histologiques.

Le statut ganglionnaire positif était associé à une augmentation de l'expression des miR-10a, -10b, -26a, -26a1, -34a, -95, -123, -125b1, -125b2, -133a, -143, -145a, -181a, -200a*, -203, -222-3p, -429.

Le statut ganglionnaire positif était associé à une diminution de l'expression du miR -204-5p.

II.C.8.d- Profil d'expression de micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre selon la survie

Une synthèse des données est reportée dans le tableau 8.

La revue de la littérature a permis de relever 11 articles qui détaillaient en analyse secondaire le profil d'expression des miARNs au sein du tissu endométrial tumoral selon la survie globale ou sans récurrence. (10, 11, 80, 81, 129, 133, 135, 137, 140, 148, 153)

Cinq études n'incluaient que des types I histologiques.

L'extraction d'ARN a été faite de façon majoritaire à partir de tissu conservé sous paraffine.

L'amélioration significative de la survie globale est associée à :

- L'augmentation de l'expression des miR-10b*, -29b, -100, -101, -129-2, -130b, -139-5p, -152, -194, -199a-5p, 455-5p
- La diminution de l'expression des miR-200c, -205, -429, -1228

L'amélioration significative de la survie sans récurrence est associée à :

- L'augmentation de l'expression des miR-29b, -152, -199a-5p, 455-5p
- La diminution de l'expression des miR-429, -1228

Tableau 6 : Profil d'expression des micro-ARNs entre un tissu endométrial malin et un tissu endométrial sain

Référence étude	Type échantillon	Echantillon Cas	Echantillon Témoin	miR augmenté (Cas vs. Témoin)	miR diminué (Cas vs. Témoin)	Technique
Yoneyama et coll., 2015 (152)	Tissu frais	Cancer de l'endomètre de type I (n=7) : IA Grade1-2, IB Grade1-2-3, IIIAG1, IIICG2	Tissu endométrial sain adjacent (n=7)	miR-200a, -200b, -429	-	Puce RT-qPCR
He et coll., 2015 (86)	Paraffine	Cancer de l'endomètre de type I (n=47) : 38 FIGO I-II et 9 FIGO III-IV ; 32 Grade1 et 15 Grade 2-3, 42 N- et 5 N+	Tissu endométrial hyperplasique (n=18), tissu endométrial sain (n=13)	miR-181a	-	RT-qPCR
Kong et coll., 2014 (74)	-	Cancer de l'endomètre de type I (n=21)	Tissu endométrial sain (n=14)	-	miR-30c	RT-qPCR
Jurcevic et coll., 2014 (139)	Paraffine	Cancer de l'endomètre (n=30) : 10 FIGO I, 10 FIGO II et 10 FIGO III	Tissu endométrial sain (n=20) : 10 en phase folliculaire et 10 en phase sécrétoire	miR-183, -182, -429, -135a, -9-3p, -9, 135b, -200a-5p, -218, -18a-3p	miR-1247, -199b-5p, -214, -370, -424-3p, -376c, -542-5p, -758, -377, -337-5p	RT-qPCR
Tsukamoto et coll., 2014 (10)	-	Cancers de l'endomètre de type I (n=28) : 4N+ et 21 N- , 7 IAG1	Tissu endométrial sain (n=14)	miR-499, -135b, -205	miR-10b, -195, -30a-5p, -30a-3p, -21	Séquençage nouvelle génération RT-qPCR
Xiong et coll., 2014 (150)	-80°C	Cancer de l'endomètre de type I (n=15)	Tissu endométrial sain adjacent (n =15)	miR-181c-3p, -25-5p	miR-99a-3p, -96a-5p, -328-3p, -337-3p, let-7c-5p	Séquençage nouvelle génération RT-qPCR
Xu et coll., 2013 (151)	-80°C	Cancer de l'endomètre de type I (n=71)	Tissu endométrial sain (n=5), tissu endométrial sain adjacent au cancer (n=10), hyperplasie atypique (n=9)	-	miR-503	RT-qPCR

Torres et coll., 2013 (11)	Paraffine -80°C	Cancer de l'endomètre de type I (n=77) 50 FIGO I, 5 FIGO II, 20 FIGO III, 2 FIGO IV 29 Grade1, 30 Grade2, 18 Grade3 29 N+, 15 N-	Tissu endométrial sain (n=31)	miR-9, -141, -183, -200a, -200a*, -200b, -200b*, -200c, -203, -205, -429, -96, -182, -135b	miR-410	Puce RT-qPCR
Torres et coll., 2012 (148)	Paraffine -80°C	Cancer de l'endomètre de type I (n=77) : 50 FIGO I, 5 FIGO II, 20 FIGO III, 2 FIGO IV ; 29 Grade1, 30 Grade2, 18 Grade3 : 29 N+, 15 N-	Tissu endométrial sain (n=31)	-	miR-99a, -100, -199b	RT-qPCR
Lee et coll., 2012 (141)	Paraffine	Cancer de l'endomètre (n=22) : 15 FIGO IA, 5 FIGO IB, 2 FIGO IIC1	Tissu endométrial sain (n=10), hyperplasie simple (n=21), hyperplasie atypique complexe (n=22)	miR-182, -183, -200a, -200c, -205	-	RT-qPCR
Karaayvaz et coll., 2012 (140)	Paraffine	Cancer de l'endomètre (n=48) : 24 endométrioïdes, 13 séreux, 5 cellules claires, 5 canaux de Muller, 1 indifférenciée ; 26 FIGOI, 4 FIGOII, 6 FIGO3, 12 FIGOIV	Tissu endométrial sain adjacent (n=48)	miR-200c miR-205	-	RT-qPCR
Snowdon et coll., 2011 (147)	Paraffine	Cancer de l'endomètre de type I (n=19) : 9 FIGO IA, 4 FIGO IB, 1 FIGO II.	Tissu endométrial sain (n=14)	miR-9/-9*, -18a, -96, -141, -146a, -200a/b/b*/c, -203, -205, -210, -421, -429, -516a-5p, -605, -614, -936	miR-10b*, -23a*, -100,-127-3p,-152,-199b-3p, -199b-5p, -370, 376a/c,-381,-410,-424,-424*, -431, -432,-503, -542-3/5p,-596, 610,630,632, 760	Puce RT-qPCR

Cohn et coll., 2010 (133)	Paraffine	Cancer de l'endomètre (n=141) : 121 endométrioïdes de stade I (90 grades 1, 27 grades 2, 4 grades 3), 3 endométrioïdes de stade III, 7 séreux de stade III, 4 endométrioïdes de stade IV et 6 séreux de stade IV	Tissu endométrial sain : 10 tissus en préménopause et 10 tissus en post ménopause	miR-9, -19b; -146, -181c, -183, -200c, -205, -223, -423, -425	let-7a, miR-32, -33b, -369, -409, -424, -431, -451, -496, -503, -516	Puce RT-qPCR
Ratner et coll., 2010 (145)	Paraffine -80°C	Cancer de l'endomètre (n=90) : 57 endométrioïdes (27 stades I, 12 stades II, 18 stades III), 27 papillaires séreux et 6 carcinosarcomes.	Tissu endométrial bénin (n=5)	miR-182, -183, -200a, -205, -34a, -572, -622, -650	miR-411, -487b	Puce RT-qPCR
Chung et coll., 2009 (132)	-80°C	Cancer de l'endomètre type I (n=30) : 25 stades I-II et 5 stades III ; 19 grades 1, 11 grades 2 ; 3 N+ et 27 N-	Tissu endométrial sain (n=22) : 7 en phase proliférante, 7 en phase sécrétoire et 8 post ménopausique	miR-10a, -17-5p, -23a*, -25, -28, -34a, -95, -103, -106a, -107, -130b, -141, -151, -155, -182, -183, -184, -191, -194, -200a/c, -203, -205, -210, -215, -223, -301, -325, -326, -330	-	RT-qPCR
Wu et coll., 2009 (149)	-80°C	Cancer endomètre type I (n=10) : 5 stades I, 5 stades II	Tissu endométrial sain adjacent (n=10)	miR-200C, -449, -205, -182, -429, -200b, -96, -31, -141, -200a, -363, -210, -432, -203, -10a, -155, -142-5p	miR-204, -193a, -368, -133b, -193b, -99b	Puce RT-qPCR
Boren et coll., 2008 (130)	-80°C	Cancer endomètre type I (n=37)	Tissu endométrial sain (n=20) Hyperplasie complexe atypique (n :4)	Let-7c, miR-103, -106a, -107, -181a, -185, -210, -423	let 7i, miR-30c, -152, -193, -221	Puce RT-qPCR

Tableau 7 : Profil d'expression de micro-ARNs au sein de tissu endométrial néoplasique selon le statut ganglionnaire associé

Référence étude	Type échantillon	Histologie échantillon	Echantillon Cas	Echantillon Témoin	miR augmenté (Cas vs. Témoin)	miR diminué (Cas vs. Témoin)
Li et coll., 2016 (143)	Paraffine	Cancers endomètre (n=47) : 36 Grade1-2, 11 Grade3, 34 FIGO I-II, 13 FIGO III-IV	17 N+	30 N-	-	-
He et coll., 2015 (86)	Paraffine	Cancer endomètre de type I (n=47) : 32 Grade1-15 Grade 2-3 ; 38 FIGO I-II et 9 FIGO III-IV	5N+	42N-	miR-181a	-
Liu et coll., 2014 (144)	-80°C	Cancers endomètre (n=75) : 36 Grade1, 26 Grade2, 13 Grade3, 47 FIGO I, 16 FIGO II, 12 FIGO III	11 N+	64 N-	miR-222-3p	-
Tsukamoto et coll., 2014 (10)	-	Cancers endomètre de type I (n=28)	4 N+	21 N-	-	-
Bao et coll., 2013 (129)	-80°C	Cancers endomètre (n=71) : 57 endométrioïdes, 14 non endométrioïdes , 32 Grade1, 18 Grade2, 7 Grade3, 60 FIGO I, 7 FIGO II, 4 FIGO III	8 N+	63 N-	-	miR-204-5p
Zhang et coll., 2013 (80)	Paraffine	Cancers endomètre (n=107) : 85 endométrioïdes, 22 non endométrioïdes ; 30 Grade1, 39 Grade2, 16 Grade3 ; 18 LVSI+, 87 LVSI - ; 74 FIGO I, 17 FIGO II ; 13 FIGO III ; 1 FIGO IV	6 N+	42 N-	-	-
Torres et coll., 2013 (11)	Paraffine -80°C	Cancers endomètre Type I (n=77) : 29 Grade1, 30 Grade2, 18 Grade3	15 N+	29 N-	miR-200a* /miR-203/miR-429	-
Torres et coll., 2012 (148)	Paraffine -80°C	Cancers endomètre type I (n=77) : 29 Grade1, 30 Grade2, 18 Grade3 ; 50 FIGO I, 5 FIGO II, 15 FIGO III, 2 FIGO IV	29 N+	15 N-	-	-
Cohn et coll., 2010 (133)	Paraffine	Cancers endomètre (n=141) : 121 endométrioïdes FIGO I, 3 endométrioïdes FIGO III, 7 séreux FIGO III, 4 endométrioïdes FIGO IV, 6 séreux FIGO IV	20 FIGO III-IV	121 FIGO I	miR-145a, -10b, -123, 26a, 125b1, -125b2, -143, -133a, -26a1	-
Hiroki et coll., 2010 (137)	-80°C	Adénocarcinomes séreux (n=21) : 8 FIGO I, 2 FIGOII, 3 FIGOIII, 8 FIGO IV, 5 LVSI+, 16 LVSI-	2 N+	13 N-	-	-
Chung et coll., 2009 (132)	-80°C	Cancers de l'endomètre de type I (n=30) : 25 stades I-II et 5 stades III ; 19 grades 1, 11 grades 2	3 N+	27 N-	miR-10a, miR-34a and miR-95	-

Tableau 8 : Profil d'expression de micro-ARNs au sein du tissu endométrial néoplasique selon la survie

Référence étude	Type échantillon	Histologie échantillon	Conclusion
Tsukamoto et coll., 2014 (10)	-	Cancers endomètre de type I (n=28) : 7 IAGrade1 et 21 autres stades, 4 N+ et 21 N-	Le niveau d'expression de miR-135b, -205, -21, -30a-3p, -499, -10b, -30a-5p, -195 n'est pas corrélé à la survie sans récurrence
Bao et coll., 2013 (129)	-	Carcinomes endométrioïdes issus du Cancer Génome Atlas database (n=279)	L'augmentation d'expression de miR-204-5p est associée à une amélioration non significative de la survie globale (OR=1,32, p=0,12)
Dong et coll., 2013 (135)	Paraffine	Cancers endomètre suivis pendant 15 ans (n=32) : 15 endométrioïdes, 8 séreux, 5 cellules claires, 4 autres, 18 FIGO I, 1 FIGO II, 5 FIGO III, 8 FIGO IV	L'augmentation d'expression de miR-130b est associée à une meilleure survie globale (p=0,05)
Zhang et coll., 2013 (80)	Paraffine	Cancers endomètre (n=107) : 85 endométrioïdes, 22 non endométrioïdes ; 30 Grade1, 39 Grade2, 16 Grade3 ; 18 LVSI+, 87 LVSI - ; 74 FIGOI, 17 FIGOII ; 13 FIGOIII ; 1 FIGOIV ; 6N+,42 N-	La diminution d'expression de miR-145 et miR-143 est associée à une diminution non significative de la survie globale (p>0,05)
Torres et coll., 2013 (11)	Paraffine -80°C	Cancers endomètre (n=77) : Type I : 29 Grade1, 30 Grade2, 18 Grade3 15 N+, 29 N-	Les expressions des miR-1228/miR-200c/miR-429, et miR-1228/miR-429 sont respectivement associées à la survie globale (HR: 2.978, 95% CI:1.580-5.614, p < 0.001) et sans récurrence (HR: 4.149, 95% CI: 2.193-7.852, p < 0.001).
Zhai et coll., 2013 (153)	Paraffine	Cancers endomètre suivis pendant 15 ans (n=32) : 15 endométrioïdes, 8 séreux, 5 cellules claires, 4 autres ; 17 FIGO I, 1 FIGO II, 5 FIGO III, 9 FIGO IV	L'augmentation d'expression de miR-194 est associée à une meilleure survie globale (p=0,007)
Karaayvaz et coll., 2012 (140)	Paraffine	Cancer endomètre (n=48) : 24 endométrioïdes, 13 séreux, 5 cellules claires, 6 autres ; 26 FIGOI, 4 FIGOII, 6 FIGOIII, 12 FIGOIV	L'augmentation d'expression de miR-205 est associée à une moins bonne survie globale (p=0,03) L'expression de miR-200c n'est pas corrélée à la survie globale (p=0,58)

Torres et coll., 2012 (148)	Paraffine -80°C	Cancers endomètre type I (n=77) : 29 Grade1, 30 Grade2, 18 Grade3 ; 50 FIGO I, 5 FIGO II, 15 FIGO III, 2 FIGO IV ; 29 N+, 15 N-	L'augmentation d'expression de miR-100 est associée à une meilleure survie globale (p=0,02)
Cohn et coll., 2010 (133)	Paraffine	Cancers endomètre (n=141) : 121 endométrioïdes FIGO I, 3 endométrioïdes FIGO III, 7 séreux FIGO III, 4 endométrioïdes FIGO IV, 6 séreux FIGO IV	L'augmentation d'expression de miR-199a-5p est associée à une meilleure survie globale (p=0,007) et sans récurrence (p=0,048)
Hiroki et coll., 2010 (137)	-80°C	Adénocarcinomes séreux (n=21) : 8 FIGOI, 2 FIGOII, 3 FIGOIII, 8 FIGOIV ; 5 LVSI+, 16 LVSI-	Les sous-expressions de miR-152, -29b et -455-5p sont associées à de moins bonnes survies globale et sans récurrence (p<0,05). Les sous-expressions de miR-101, -10b*, et -139-5p sont associées à une moins bonne survie globale (p<0,05)
Huang et coll., 2009 (81)	-	Cancers endomètre (n=117)	La méthylation du gène de miR-129-2 est associée à une moins bonne survie globale (p=0,039)

II.C.8.e- Micro-ARNs oncogènes (oncomirs) dans le cancer de l'endomètre

Une revue de la littérature a permis d'expliquer les mécanismes moléculaires associés aux oncomiRs impliqués dans le CE. Nous faisons, ci-dessous, un commentaire synthétique concernant l'évolution de 4 miARNs dont l'augmentation d'expression est généralement associée à un mauvais pronostic dans le CE et pour lesquels des cibles ont été proposées ou validées.

miR-181a

Une augmentation de l'expression du miR-181a dans le tissu endométrial tumoral est associée, selon les études sus-citées, à l'envahissement ganglionnaire. (73,86,130)

Son expression varie également selon le type histologique du cancer d'après le travail de He et coll. ayant porté sur l'analyse de 78 tissus sous paraffine : 13 endomètres normaux, 18 hyperplasies endométriales, 37 cancers de type I et 10 cancers de type II. (Tableau 9)

Tableau 9 : Variation de l'expression de miR-181a dans les tissus endométriaux (d'après He et coll., Drug Design, Development and Therapy, 2015) (86)

Tissu	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	p
Hyperplasie endométriale vs. Endomètre sain	4,073	0,027
Cancer endomètre type II vs. Cancer endomètre type I	3,668	0,032
Cancer endomètre type II vs. Hyperplasie endométriale	7,669	0,003
Cancer endomètre type II vs. Endomètre sain	31,233	0,000
Cancer endomètre type I vs. Hyperplasie endométriale	2,091	0,127
Cancer endomètre type I vs. Endomètre sain	8,515	0,000

L'équipe de He et coll. a également montré, à partir d'une analyse bioinformatique complète, que le miR-181a possédait jusqu'à présent 131 cibles validées, dont 22 étant des gènes impliqués en cancérogénèse et notamment dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (figure 14) (86).

Ces données mettent en avant le miR-181a comme potentiel bio marqueur dans le CE.

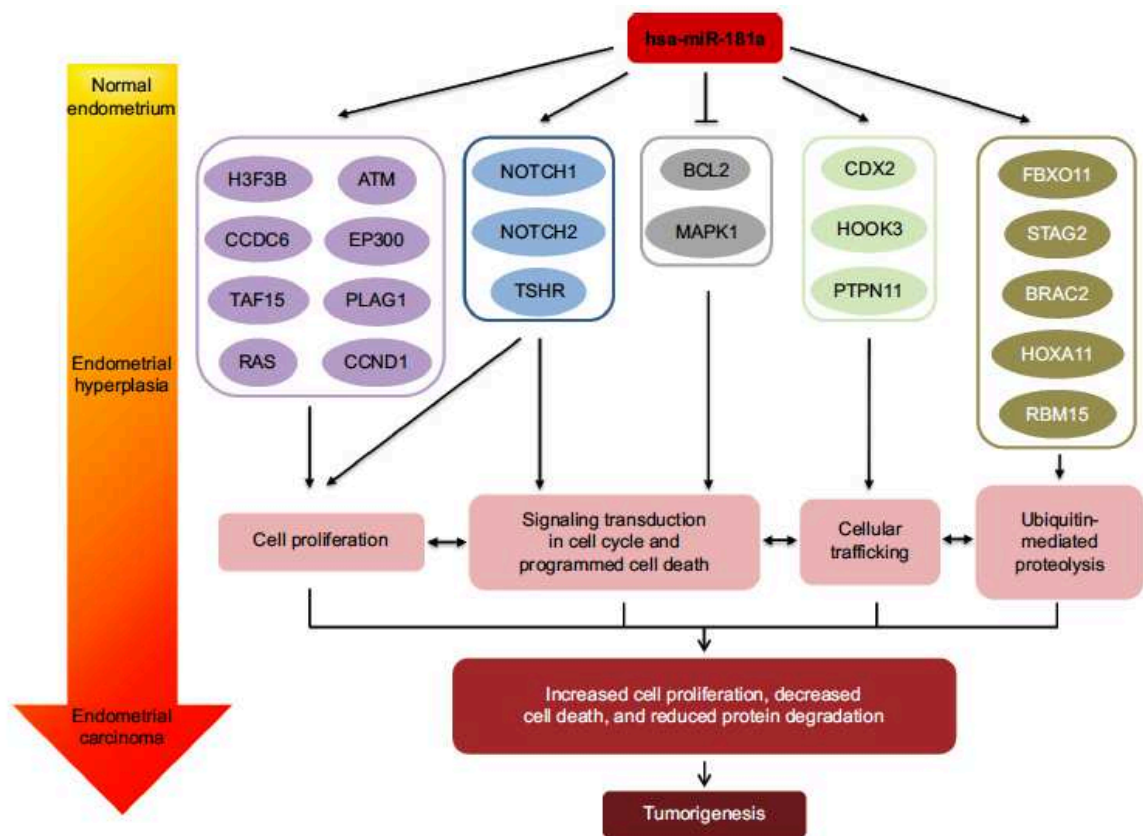


Figure 14 : Mécanisme de régulation des gènes impliqués dans la cancérogénèse par l'oncomiR-181a (d'après He et coll., Drug Design, Development and Therapy, 2015) (86)

miR 200

La sur-expression de la famille du miR-200, au sein du tissu endométrial, est associée à l'envahissement ganglionnaire et à une altération de la survie globale (7,11,84,132–134,137,139–141,145,147,149,152).

La famille du miR-200 est composée de 5 membres localisés sur deux clusters génomiques (miR-200a/b, miR-429 sur le chromosome 1, et miR-200c, miR-141 sur le chromosome 12) (157). Cette famille du miR-200 est impliquée dans la voie EMT (109,110,158) via une inhibition de deux facteurs de transcription, ZEB1 and ZEB2, régulant négativement E-cadherin. Le rôle de miR-200 en tant qu'oncomiR n'est donc pas clairement expliqué, puisqu'une augmentation de l'expression de miR-200 est donc associée à une diminution d'expression de ZEB 1-2 et donc à une augmentation d'E-cadherin avec maintien du statut épithélial. Une explication pourrait être en partie apportée par les données d'une récente revue Cochrane (159) ayant souligné la régulation de miR-200 par les récepteurs-alpha aux oestrogènes et l'oestradiol. Le miR-200 est aussi responsable d'une inhibition de PTEN, comme prouvé par le travail de transfection de Yoneyama et coll avec hyper-activation de kt et favorisant ainsi la prolifération cellulaire (152).

miR 222-3p

La surexpression du miR-222-3p est associée à l'envahissement ganglionnaire dans le CE (144). Le caractère oncogène de ce miR a été confirmé par de nombreuses autres études, puisque le miR-222-3p est également augmenté dans le cancer du poumon métastatique (160) et dans le glioblastome (161).

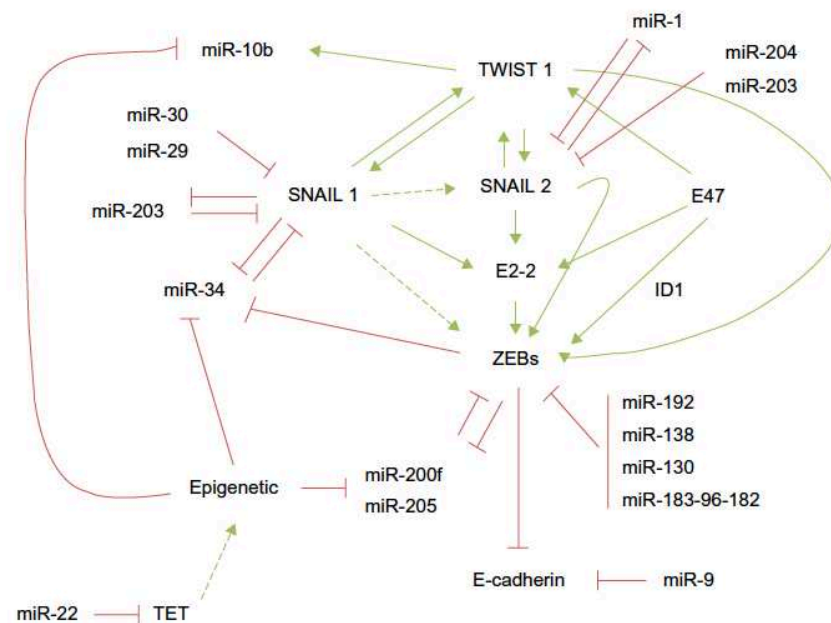
Dans une étude ayant porté sur des cellules endométriales, Liu et coll. ont montré que le miR-222-3p pouvait accentuer la prolifération et l'invasion cellulaire, et favoriser le passage de la phase G1 à la phase S. Les cibles régulées par miR-222-3p, incluant PTEN, TIMP3 (160), TRPS1 (162), CDKN1C/p57 (163) et p27kip1 (164) participent également à l'action oncogénique.

miR-10b

La sur-expression du miR-10b est selon Cohn et coll. associée à un stade avancé dans le CE (133).

D'après Han et coll (165), le miR-10b peut induire l'EMT avec augmentation de l'expression de N-cadherin et décroissance de E-cadherin. Han et coll. rapportent que le miR-10b est associé à l'agressivité du cancer du sein. Aussi, un traitement de cellules mammaires

Figure 15 : Intégration de miR-10b dans les voies cellulaires impliquées dans le contrôle de la voie de la transition épithélio-mésenchymateuse (d'après Diaz-Lopez et coll., Cancer Management and Research, 2014) (91)



II.C.8.f- micro-ARNs suppresseurs de tumeur (suppresseurs mirs) dans le cancer de l'endomètre

Une revue de la littérature a permis d'expliquer les mécanismes moléculaires associés aux principaux miARNs suppresseurs de tumeur impliqués dans le CE.

miR-152 :

miR-152 est sous-exprimé dans les tissus endométriaux tumoraux par rapport aux tissus endométriaux sains. Aussi, la sous-expression de miR-152 au sein du tissu endométrial tumoral est associée à une altération significative de la survie globale et de la survie sans récurrence (137).

Le miR-152 a fait l'objet en 2016 d'une revue de la littérature spécifique par Liu et al. (166). miR-152 est membre de la famille miR-148/152 qui inclut miR-148a, miR-148b et miR-152 dont le gène est situé sur le chromosome 17q21.32. Deux séquences matures sont obtenues à partir du miR pré mature 152 : miR-152-3p et miR-152-5p. De nombreuses publications ont mis en évidence une diminution de l'expression du miR-152 dans des cancers incluant : ovaire (167), endomètre (82) et sein (168), suggérant sa fonction de miR suppresseur de tumeur. Si des centaines de mARN cibles ont pu être proposés par une analyse bioinformatique, une quinzaine impliquée en cancérogénèse a été validée expérimentalement (Tableau 10).

Tableau 10 : ARNs messagers cibles du miR-152 (d'après Liu et coll., Oncology Letters, 2016) (166)

Cancer	Expression	Effet biologique	Gène cible
Endomètre	Sous exprimé	Inhibition croissance cellulaire	DNMT1, E2F3, MET, RICTOR
Ovaire	Sous exprimé	Réduction prolifération cellulaire	DNMT1
Sein	Sous exprimé	Inhibition prolifération cellulaire	DNMT1, IGF-1R, IRS1
Foie	Sous exprimé	Réduction prolifération cellulaire	DNMT1, Wnt1
Prostate	Sous exprimé	Réduction croissance cellulaire	DNMT1, TGF α
Poumon	Sous exprimé	Réduction prolifération cellulaire	ADAM17, FGF2
Glioblastome	Sous exprimé	Réduction prolifération cellulaire	KLF4
Estomac	Sous exprimé	Inhibition prolifération cellulaire	CD151
Gliome	Sous exprimé	Diminution de l'invasion	MMP3

miR30c

miR-30c est sous-exprimé dans le tissu endométriaux tumoraux de type I par rapport aux tissus endométriaux sains (74,130).

Son mode d'action passe notamment par l'inhibition de MTA-1 (74), BCL9 (169), TWF1, vimentin (170) et KRAS (171). Aussi, d'après une étude fonctionnelle sur lignées cellulaires de CE (Ishikawa et HEC-1B), le niveau d'expression de miR-30c est diminué en cas de traitement par E2. (74)

miR-424 :

miR-424 est sous-exprimé dans le tissu endométriaux tumoraux par rapport aux tissus endométriaux sains (133,137,147,156).

Selon une étude fonctionnelle à partir de deux lignées cellulaires de CE (HEC-1A et Ishikawa), la surexpression de miR-424 diminue la prolifération cellulaire induite par un traitement par 17 β -estradiol (E2) en inactivant la voie de signalisation PI3K/AKT médiée dans le CE par la G-protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER). De plus la transfection d'un vecteur surexprimant GPER dans une cellule endométriale cancéreuse stimulée par E2 diminue l'effet d'inhibition de miR-424 sur la croissance cellulaire (172).

miR-503 :

miR-503 est sous-exprimé dans le tissu endométriaux tumoraux par rapport aux tissus endométriaux sains. (133,137,147,151).

Les fonctions des miRNAs suppresseurs de tumeur de miR-503 sont en rapport avec son interaction avec la voie EMT. Ainsi, la surexpression de miR-503 augmente l'expression du marqueur épithélial E-cadherin et diminue l'expression des marqueurs mésenchymateux N-cadherin et vimentin, de Snail et de c-myc (173).

II.D- Ouverture sur la thérapeutique

Plusieurs revues de la littérature, dont une française récente (4,87) ont fait le point sur l'apport thérapeutique des miARNs envisagé dans de nombreux cancers dont celui de l'endomètre (144).

Ces revues rappellent que la suppression globale des miARNs n'est pas compatible avec la survie, puisque la suppression du complexe Dicer qui assure une étape clé commune de leur biosynthèse est létale (174). Toute stratégie thérapeutique fondée sur leur utilisation ne peut donc se concevoir que de façon ciblée sur un ou quelques miARNs.

Suppléer à la sous-expression d'un miARN suppresseur appelle alors une stratégie de type agoniste avec réintroduction et expression forcée de ce miARN ou d'un analogue. À l'inverse, réduire le taux d'un miARN pathologiquement surexprimé relèvera d'une stratégie de type antagoniste par des oligonucléotides complémentaires du miARN en question, d'où le nom d'« antagomir » (175) ou d'« AMO (anti-microRNA oligonucléotide) » (176) donnés à ces molécules. Plusieurs revues abordent ce problème avec des conclusions très similaires (39–41,78). Quelle que soit la stratégie utilisée, elle se heurte aux deux mêmes obstacles majeurs : la difficulté pour ces molécules très chargées négativement de pénétrer dans les cellules et leur stabilité vis à vis des nucléases qu'elles vont rencontrer aussi bien dans le sang que dans les cellules (difficultés identiques à celles rencontrées par l'utilisation des siARNs (ARNs interférents) thérapeutiques). La panoplie des modifications chimiques utilisées pour pallier ces problèmes a été détaillée par la revue de Saumet et coll. (177). Enfin, la possibilité d'introduire ces séquences oligonucléotidiques par des vecteurs de thérapie génique est elle aussi activement explorée.

III – Objectifs du travail

Les objectifs du travail sont :

- premièrement d'évaluer les profils d'expression de miARNs en fonction de deux facteurs pronostics majeurs : le statut ganglionnaire et la présence d'emboles lymphovasculaires
- deuxièmement de déterminer des seuils d'expression de ces miARNs qui pourraient servir d'aide au diagnostic et donc à la prise en charge thérapeutique des patientes présentant des CE supposés de bon pronostic.

IV - Résultats.

Détermination de profils d'expression de micro-ARNs associés à l'envahissement ganglionnaire dans le cancer de l'endomètre de stade précoce de grade 1-2

Article 1 (178) :

Identification of microRNA expression profile related to lymph node status in women with early-stage grade 1–2 endometrial cancer

Geoffroy Canlorbe, Zhe Wang, Enora Laas, Sofiane Bendifallah, Mathieu Castela, Marine Lefevre, Nathalie Chabbert-Buffet, Emile Daraï, Selim Aractingi, Céline Méhats and Marcos Ballester

Modern Pathology. 2016 Apr;29(4):391-401

L'objectif de ce travail était d'évaluer, au sein du cancer du CE de stade précoce de grade 1 – 2, si le profil d'expression de miARNs pouvait être associé au statut ganglionnaire et aider à la décision de stadification ganglionnaire chirurgicale.

Article 1.

Les profils d'expression de miARNs ont été évalués entre deux groupes de tissus tumoraux sous paraffine de CE de stade précoce de type I de grade 1-2 : un groupe avec envahissement ganglionnaire (n=9) et un groupe sans envahissement ganglionnaire (n=27), appariés selon le grade histologique (1 ou 2), l'envahissement myométrial ($<$ ou $\geq$ 50%) et la présence d'embolies lymphovasculaires.

Résultats : L'analyse après hybridation sur puce Affymetrix montre que le niveau d'expression de 12/2560 miARNs matures varie au moins d'un facteur 2 entre les groupes (avec et sans envahissement ganglionnaire). Une analyse d'enrichissement a montré que les ARNm cibles des miARNs étaient associés aux voies de signalisation impliquées dans la transformation cellulaire néoplasique, l'instabilité génomique, l'invasion néoplasique, la progression cancéreuse. Ces données ont été validées par une analyse avec RT-qPCR : les niveaux d'expression de cinq miARNs (miARN-34c-5p, -375, -184, -34c-3p, et -34b-5p) étaient significativement plus faibles dans les tissus tumoraux avec envahissement ganglionnaire que dans ceux sans envahissement ganglionnaire. Les patientes avec seuil d'expression du miARN 375 $<$ 0,30 avaient un risque significativement plus élevé d'avoir un envahissement ganglionnaire (n=8; 53,3%) que les patientes avec un seuil d'expression de miARN 375 $>$ 0,30 (n=1 ; 4,8%), $p=0,001$. Les patientes avec seuil d'expression du miARN 184 $<$ 0,30 avaient un risque significativement plus élevé d'avoir un envahissement ganglionnaire (n=6; 60,0%) que les patientes avec un seuil d'expression de miARN 184 $>$ 0,30 (n=3 ; 11,5%), $p=0,006$.

Conclusion : Il s'agit de la première étude évaluant l'expression relative de miARNs au sein de tissus tumoraux de CE de stade précoce de grade 1-2 selon le statut ganglionnaire. Ces profils d'expression de micro ARNs fournissent les bases à de nouvelles études sur la fonction des miARNs dans le CE et pourraient constituer un nouvel outil au diagnostic du statut ganglionnaire.

Identification of microRNA expression profile related to lymph node status in women with early-stage grade 1–2 endometrial cancer

Geoffroy Canlorbe^{1,2,3}, Zhe Wang¹, Enora Laas², Sofiane Bendifallah^{2,4}, Mathieu Castela¹, Marine Lefevre⁵, Nathalie Chabbert-Buffet^{1,2}, Emile Darai^{1,2,3}, Selim Aractingi¹, Céline Méhats^{6,7} and Marcos Ballester^{1,2,3,7}

¹INSERM, UMR S 938, University Pierre et Marie Curie, Paris, France; ²Department of Obstetrics and Gynaecology, Tenon University Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Pierre et Marie Curie, et Paris, Paris, France; ³Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Paris, France; ⁴INSERM UMR S 707, Epidemiology, Information Systems, Modeling, University Pierre et Marie Curie, Paris, France; ⁵Department of Pathology, Tenon University Hospital, University Pierre et Marie Curie, Paris, France and ⁶Cochin Institute, Inserm U1016, CNRS 8104, Université Paris Descartes, Paris, France

Conventional methods used for histologic classification and grading of endometrial cancer (EC) are not sufficient to predict lymph node metastases. microRNA signatures have recently been related to EC pathologic characteristics or prognosis. The aim of this study was to evaluate whether microRNA profiles of grade 1–2 endometrioid adenocarcinomas can be related to nodal status and used as a tool to adapt surgical staging in early-stage EC. microRNA expression was assessed in nine formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) EC primary tumors with positive lymph node and in 27 FFPE EC primary tumors with negative lymph node, matched for grade, stage, and lymphovascular space involvement status. A microarray analysis showed that there was more than a twofold significant difference in the expression of 12 microRNAs between the two groups. A quantitative reverse transcriptase-PCR assay was used to confirm these results: the expression levels of five microRNAs (microRNA-34c-5p, -375, -184, -34c-3p, and -34b-5p) were significantly lower in the EC primary tumor with positive lymph node compared with those with negative lymph node. A minimal *P*-value approach revealed that women with a microRNA-375-fold change < 0.30 were more likely to have positive lymph node (*n* = 8; 53.3%) compared with those with a microRNA-375-fold change > 0.30 (*n* = 1; 4.8%), *P* = 0.001. Furthermore, women with a microRNA 184-fold change < 0.30 were more likely to have positive lymph node (*n* = 6; 60.0%) compared with those with a microRNA 184-fold change > 0.30 (*n* = 3; 11.5%), *P* = 0.006. This is the first study investigating the relative expression of mature microRNA genes in early-stage grade 1–2 EC primary tumors according to the nodal status. This microRNA expression profile provides a potential basis for further study of the microRNA function in EC and could be used as a diagnostic tool for nodal status.

Modern Pathology advance online publication, 5 February 2016; doi:10.1038/modpathol.2016.30

Endometrial cancer (EC) is the most common gynecologic tumor in women in developed countries. The highest estimated incidences in 2012 are in the USA and Canada (19.1/100 000) and northern (12.9/100 000) and western Europe (15.6/100 000).^{1,2} Women are often diagnosed at an early stage (stage I of the International Federation of Gynaecology and

Obstetrics (FIGO) classification), when the disease is still confined to the uterus, representing almost 75% of the cases. The most frequently occurring histologic subtype is endometrioid adenocarcinoma, which is a hormone-receptor-positive EC, with a good prognosis.³ Women can be classified with early-stage EC at low-, intermediate-, or high-risk for recurrence by a combination of histologic criteria (ie depth of myometrial invasion and histologic type and grade).⁴

Standard treatments for early-stage EC consist of primary hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. In this specific setting, many centers in the United States perform lymph node sampling,

Correspondence: Dr G Canlorbe, MD, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France. E-mail: geoffroy.canlorbe@aphp.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 23 October 2015; revised 5 December 2015; accepted 21 December 2015; published online 5 February 2016

www.modernpathology.org

lymph node dissection, or sentinel lymph node mapping in many or most EC, showing that indications for lymph node dissections are not well established. European guidelines have recently been modified and lymphadenectomy is no longer recommended in women with low- (FIGO stage IA, grade 1 and grade 2, endometrioid adenocarcinoma), or intermediate- (FIGO stage IA, grade 3 type 1 EC; FIGO stage IB, grade 1 and grade 2, endometrioid adenocarcinoma) risk EC.⁴ However, several authors have demonstrated that such an approach may lead to under-treatment as 10% of women of low-risk and 15% of intermediate-risk EC have nodal metastases,^{5,6} rates that can be higher in the case of lymphovascular space involvement (LVSI) on the primary tumor.⁷⁻⁹

It is now well established that conventional methods used for histologic classification and grading of EC are not sufficient to predict lymph node metastases. This is probably due to considerable heterogeneity within endometrioid histologic subtypes.¹⁰ Hence, additional tools including highly sensitive and specific molecular prognostic biomarkers are needed to select the women for whom complete surgical staging should be performed in order to better adapt adjuvant therapies.

miRNAs (miRNAs) are short length (~22 nucleotides), naturally existing RNAs functioning at the post-transcriptional level either by regulating mRNA degradation or by translating repression through binding of the 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of mRNAs.¹¹ The human genome encodes

at least 1500 miRNAs, and it is estimated that more than 30% of all mRNA expression is regulated by miRNAs.¹² They have been linked to a variety of physiologic and pathologic processes, including carcinogenesis and can act as metastatic activators or suppressors.^{13,14} Recently, miRNA signatures have been related to the pathologic characteristics and prognosis of EC.¹⁵ However, there are few data about nodal status-associated miRNA regulation in EC, especially in women at low and intermediate risk. miRNAs, with their remarkable stability, can be studied in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens¹⁶ and are promising biomarkers for tumor staging.

The aim of this study was thus to evaluate whether miRNA profiles of grade 1-2 endometrioid adenocarcinomas can be related to nodal status and used as a tool to adapt surgical staging.

Materials and methods

Experimental Design

Approval for the present study was obtained from the local Medical Ethics Committee (CPP Ile-de-France V; e-4-15) and written informed consent was obtained from all women who provided the tissue samples used in this study. The experimental design for profiling the miRNA changes of nodal involvement in grade 1-2 early-stage FFPE primary EC tumor specimens is shown in Figure 1.

Thirty-six women with early-stage EC (ie women with primary tumor confined to the corpus uteri with

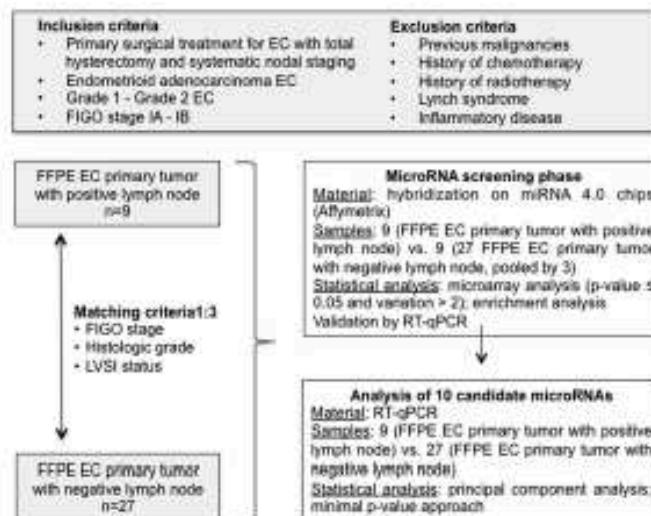


Figure 1 Flowchart describing the constitution of groups and the experimental design. EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; FIGO, international federation of gynecology and obstetrics; LVSI, lymphovascular space involvement; miRNA, microRNA; RT, reverse transcription; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction.

or without nodal involvement) who underwent primary surgical treatment (including total hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, and systematic nodal staging) between January 2003 and December 2012 in Tenon University Hospital—APHP were enrolled in the study. Nine of these women had lymph node (LN) metastases (positive LN) and met the following inclusion criteria: endometrioid adenocarcinoma, grade 1 or 2, FIGO stage I. The remaining 27 women, without LN metastases (negative LN), met the same inclusion criteria and were used as control subjects. One-to-three matching was performed according to the following three criteria: FIGO stage (IA, IB), histologic grade (grade 1, grade 2), and LVSI status (positive, negative). The exclusion criteria were as follows: previous malignancies, history of chemotherapy or radiotherapy, inflammatory disease, or Lynch syndrome (the search for a loss of expression of one of the Mismatch Repair proteins by immunohistochemistry and for tumor instability [microsatellite instability replication error repeats phenotype] were performed when EC occurred before the age 50 years or when there was a suggestive family history).

The clinical and pathologic variables of the women were extracted from maintained EC databases and included age, parity, body mass index (calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters), comorbidities (diabetes, dyslipidemia), 2009 FIGO stage, histologic type, and grade, depth of myometrial invasion, LVSI status, and time between surgery and sample analysis.

The median age was 72 years (interquartile range [IQR]: 65–78) in the negative LN group and 68 years (IQR: 64–78) in the positive group ($P=0.84$). The two groups were comparable for the FIGO stage, histologic grade, and LVSI status. Furthermore, the comorbidities (diabetes and dyslipidemia), parity, body mass index, tumor size, European Society of Medical Oncology (ESMO) risk group of recurrence, and LVSI status did not differ according to the nodal status. The median time between surgery and sample RNA extraction was 32 months (IQR: 21–79) in the negative LN group and 30 months (IQR: 15–60) in the positive group ($P=0.95$) (Table 1).

Histologic Characteristics

Histologic grade 1 is defined by 5% or less of a solid nonsquamous, nonmucinous growth pattern; histologic grade 2 by 6–50% of solid nonsquamous, nonmucinous pattern; and histologic grade 3 by more than 50% of solid nonsquamous, nonmucinous growth pattern.¹⁷ The presence of grade 3 nuclei involving more than 50% of the tumor increases the final tumor grade by 1. A tumor is considered LVSI positive when tumor emboli are found within a space clearly lined by endothelial cells on hematoxylin and eosin-stained sections.¹⁸

Table 1 Epidemiologic and histologic characterizations between women with negative or positive LN

	EC FFPE primary tumor Negative LN n = 27	EC FFPE primary tumor Positive LN n = 9	P-value
Age, median (IQR)	72 (65–78)	68 (64–78)	0.84
Diabetes n (%)	3 (11.1%)	0 (0%)	0.56
Dyslipidemia n (%)	3 (15.8%)	1 (20%)	1
Parity, median (IQR)	2 (1–3)	1 (0–3)	0.85
BMI, median (IQR)	24 (22–27)	25 (20–29)	0.92
FIGO Stage, n (%)			
IA	13 (48.1%)	4 (44.4%)	1
IB	14 (51.9%)	5 (55.6%)	
Histologic grade, n (%)			
Grade 1	9 (33.3%)	3 (33.3%)	1
Grade 2	18 (66.7%)	6 (66.7%)	
Tumor size (mm), median (IQR)	40 (25–40)	40 (25–42)	0.82
ESMO risk group, n (%)			
Low risk	13 (48.1%)	4 (44.4%)	1
Intermediate risk	14 (51.9%)	5 (55.6%)	
LVSI, n (%)			
Yes	9 (33.3%)	3 (33.3%)	1
No	18 (66.6%)	6 (66.6%)	
Time between surgery and sample analysis (months), median (IQR)	32 (21–79)	30 (15–60)	0.95

Abbreviations: BMI, body mass index; EC, endometrial cancer; ESMO, European Society for medical oncology; FFPE, formalin-fixed and paraffin-embedded; FIGO, international federation of gynecology and obstetrics; IQR, interquartile range; LN, lymph node; LVSI, lymphovascular space involvement.

RNA Extraction from FFPE Tissues

FFPE tissues were obtained from the hysterectomy specimens. FFPE tissue blocks were sectioned on a standard microtome (Leica-microsystems RM 2145) to generate successive 10 µm sections which were evaluated by a pathologist. Regions of invasive carcinoma were confirmed and marked on each slide. For each sample, marked regions from two slides were microdissected using a new, sterile blade and the dissected tissues were placed immediately into an RNase-free microcentrifuge tube.

Total RNA was extracted using the miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Briefly, a deparaffinization solution was added to the FFPE samples. The tissues were then digested with proteinase K and treated with DNase. After washing, the RNA, including the small miRNA fraction, was eluted with 20 µl distilled water. The concentrations and quality of the RNA recovered were measured using the Nanodrop 1000A spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The median ratio of 260/280 was 1.87 (interquartile range [IQR]: 1.84–1.90) and the median concentration was 415.8 ng/µl (IQR: 327.1–568.2).

Microarray Hybridization (GEO: GSE75968) and Data Analysis

To offset the high cost of an individual miRNome, the 27 specimens of negative LN status were pooled by 3 in accordance with the matching criteria. In this way the influence of individual differences among the women were limited while maintaining opportunities for exploration of possible statistical variations. Microarray analysis was conducted on 18 distinct specimens; 9 specimens with positive LN and 9 specimens with negative LN. Microarray hybridization on miRNA 4.0 chips (Affymetrix) was conducted at the genomic platform of the Institut Cochin, Paris. After validation of the RNA quality with Bioanalyzer 2100, 1 µg of total RNA was biotin labeled following the FlashTag Biotin HSR RNA labeling kit (Affymetrix).

After overnight hybridization, the miRNA 4.0 chips were washed in the Fluidic Station FS450 (Affymetrix) following a specific protocol and scanned using the GCS3000 7G. The scanned images were then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (CEL files) and metrics for Quality Control. No apparent outliers were detected. Specific miRNAs analysis was performed using Partek Flow software, version 3.0 Copyright, 2014 (Partek Inc., St Louis, MO, USA). CEL files were imported and normalized using robust multi-array averaging.¹⁹

Genes with a nominal *P*-value ≤ 0.05 were considered to be differentially expressed. Among these, genes showing a variation of 2 were retained for further analysis.

Validated Target Gene and Enrichment Analysis

To estimate the biologic effects of the differentially expressed miRNAs, lists of validated target genes were determined using currently available databases, including Tarbase and Mirtarbase. Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed on the lists using Genomatix GePS (release 2.4.0; Genomatix BH, Munich, Germany).

Validation of Candidate miRNAs with Reverse Transcription (RT) and Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

One microgram of total RNA was used in all RT reactions that were performed with the miScript II RT Kit, using the 5x miScript HiSpec Buffer method, according to the manufacturer's instructions (Qiagen) with a Thermo Hybrid PXR 0.2 Thermal Cycler. cDNA samples were stored at -20°C for further use.

miRNA expression was analyzed by real-time PCR using miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions with an initial activation step at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 30 s, and 70°C for 30 s. A final melting curve analysis was performed to verify that a single product was amplified. All steps were

performed in duplicate using a LightCycler 480 System (Roche). The results are expressed as Ct values and normalized on the calculated median Ct of each sample (ΔCt). miRNA primers were from Qiagen. Relative expression was calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). SNORD68 and RNU6 were both used as endogenous controls for data normalization.

For the results from the qRT-PCR on miRNA expression, data are expressed as means $\pm$ s.e.m. Means between two groups were compared using the Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. GraphPad Prism version 5 was used for analysis of tissue samples (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Principal Component Analysis

Principal component analysis, a dimensionality reduction technique using a linear transformation applied on multidimensional data, was used to categorize miRNA.²⁰

Principal component analysis and biplot plotting were performed using custom code in R 3.1.3 software, available online.

Optimal miRNA Fold-Change Cutoffs Correlated with Final Nodal Status

We calculate the ΔCt value by minus the Ct value of target microRNA by reference (endogenous control) microRNA. The normalized target microRNA expression level was calculated by $2^{-\Delta\text{Ct}}$. We further calculated the fold change of sample of interest to control sample by comparing their normalized target microRNA expression level.

For qualitative analysis, we calculated optimal cutoffs for each miRNA to correlate semiquantitative expression and final nodal status. The optimal fold-change (FC) cutoff was determined by a minimal *P*-value approach. This involved dichotomizing the FC level into dummy variables with a cutoff every 0.01 units of its range of values. Fisher tests comparing the number of women with or without LN metastases for every dummy variable were then calculated. The cutoff with the minimal *P*-value was chosen as the optimal cutoff for this variable.

Statistical Analysis

Unless otherwise specified, data were managed with an Excel database and analyzed using R 3.1.3 software, available online.

Results

Distinct miRNA Signatures of Type 1 EC Primary Tumors with Positive LN

To establish a miRNA profile for primary endometrial adenocarcinoma EC with positive LN, we performed

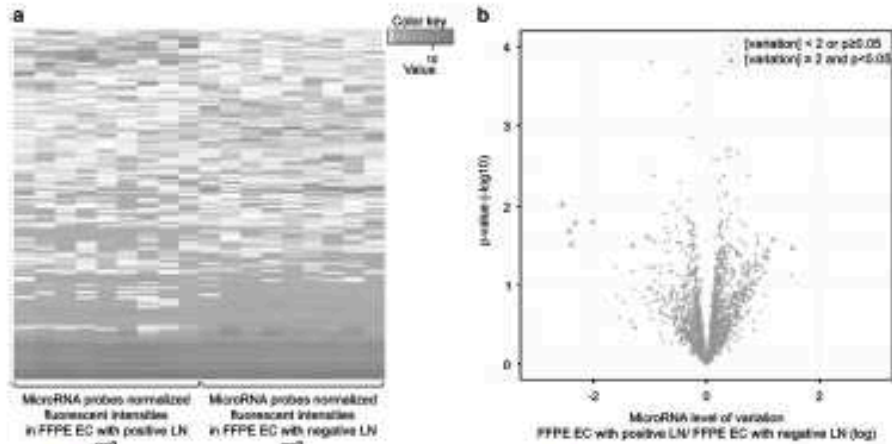


Figure 2 (a) Heat map of microRNA deregulation in positive LN vs negative LN FFPE grade 1-2 EC primary tumor specimen. One hundred and forty-two probes had consistent normalized fluorescent intensities between the two groups, negative LN vs positive LN ($P < 0.05$). (b) Volcano plot. Abscissa is the logarithmic value of the level of variation (LogRatio) and ordinate is the negative logarithm of the statistical value ($-\log(p)$) of fluorescence intensities of the hybridized probes from positive or negative LN samples. There was more than a twofold change in normalized fluorescence intensity of 12 microRNAs (blue triangles) between the positive LN vs negative LN groups ($P < 0.05$): 7 have decreased intensity (on the left) and 5 have increased intensity (on the right). EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LN, lymph node.

Table 2 List of the downregulated (fold change < -2 , P -value < 0.05) and upregulated (fold change > 2 , P -value < 0.05) microRNA between positive LN vs negative LN FFPE histologic grade 1-2 EC primary tumor specimen

Downregulated microRNAs			Upregulated microRNAs		
Name	Fold change	P-value	Name	Fold change	P-value
miR-34c-5p	-5.92	0.009	miR-129-5p	2.90	0.033
miR-375	-5.39	0.020	miR-5001-5p	2.26	0.026
miR-184	-5.24	0.031	miR-6068	2.11	0.036
miR-34c-3p	-5.07	0.017	miR-4467	2.06	0.047
miR-34b-5p	-4.04	0.016	miR-6850-5p	2.06	0.042
miR-148a-3p	-2.48	0.031			
miR-504-5p	-2.06	0.025			

Abbreviations: EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LN, lymph node.

a microarray analysis comparing endometrioid adenocarcinoma EC tumors with positive LN to those with negative LN. We focused our study on the 2560 probes containing sequences for mature miRNAs. Among them, 142 probes had consistent normalized fluorescent intensities between the two groups (positive LN vs negative LN) ($P < 0.05$) (Figure 2a). As illustrated by the volcano plot representation (Figure 2b), there was more than a twofold significant difference in the normalized fluorescence intensity of 12 of these miRNAs between the positive LN vs negative LN groups: seven miRNAs (miR-34c-5p, miR-375, miR-184, miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-148a-3p, and miR-504-5p) had a decreased expression and five

miRNAs (miR-129-5p, miR-5001-5p, miR-6068, miR-4467, and miR-6850-5p) had an increased expression in samples from the positive LN group compared with samples from the negative group (Table 2).

GO term enrichment analysis was then performed using the list of all known validated targets for the miRNAs exhibiting at least a twofold change, with a significant value ($P < 0.05$), in the EC primary tumors with positive LN. Genes related to cell transformation, genomic instability, cellular metabolic process, neoplasm invasiveness, neoplasm cell transformation, growth arrest, malignant neoplasms, cancer progression, and microsatellite instability were specifically enriched (Figure 3).

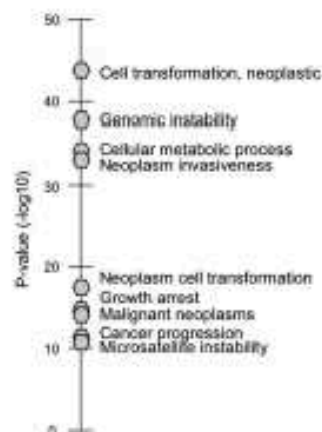


Figure 3 Enrichment analysis. Gene ontology enrichment analysis was performed (Genomax GAPS (release 2.4.0; Genomax BH, Munich, Germany)) using the list of all known validated targets for the miRNAs exhibiting at least a twofold change, with a significant value ($P < 0.05$), in the EC primary tumors with positive lymph node. EC, endometrial cancer.

Evaluation of miRNA Expression by Real-Time qRT-PCR Analysis

A qRT-PCR assay was used to confirm the expression of the miRNAs that were selected from the previous step. The expression levels of five miRNAs were significantly lower (miRNA-34c-5p, -375, -184, -34c-3p, and -34b-5p; $P = 0.006$, 0.0008 , 0.001 , and 0.001 , respectively) in the EC primary tumors with positive LN compared to those with negative LN. Two miRNAs (miR-148a-3p, miR-504-5p) and four miRNAs (miR-129-5p, miR-5001-5p, miR-6068, and miR-4467) were down- and upregulated, respectively, with no significant difference, in the EC primary tumors with positive LN compared with those with negative LN (Figure 4).

After eigenvalue decomposition of the 10 original dimensions (miR-34c-5p, miR-375, miR-184, miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-148a-3p, miR-504-5p, miR-5001-5p, miR-6068, and miR-4467), four principal components were found to be significant (with an eigenvalue > 1). These components explained 75.72% of the variance in the data (Figure 5a). The two principal components explaining the greatest data variance are presented in Table 3. The first principal component, accounting for 32.02% of the variance, was dominated by tumor-suppressor miRNAs, especially of the miR-34 family, including miR-34b-5p, miR-34c-5p, and miR-34c-3p. The second component, accounting for 24.31% of the variance, was dominated by miR-129-5p.

A biplot of the first and second components (those explaining the greatest variance) is shown in Figure 5b, demonstrating an opposition between

miRNAs that were defined by microarray as being upregulated miRNAs (miR-129-5p, miR-6068, miR-5001-5p, and miR-4467) and downregulated miRNAs (miR-34c-3p, miR-34c-5p, miR-34b-5p, miR-375, miR-504-5p, miR-184, and miR-148a-3p) in the positive LN group.

Correlation between miRNA Expression and Nodal Status in EC

Optimal cutoffs denoting the strongest correlation between quantitative expression of the miRNAs that were selected from the previous step and final LN status are summarized in Figure 6. The FC cutoffs defined were 0.30, 0.30, 0.0852, 0.09, 0.50, 1.45, and 1.75 for miR-375, miR-184, miR-34c-5p, miR-34b-5p, miR-148a-4p, miR-129-5p, and miR-4467, respectively. miR-375 and miR-184 had the most significant P -values: 0.001 and 0.006, respectively. We compared nodal status according to the cutoffs previously determined: women with EC and an miRNA-375 FC < 0.30 were more likely to have positive LN ($n = 8$; 53.3%) compared with those with an miRNA-375 FC > 0.30 ($n = 1$; 4.8%), $P = 0.001$; women with EC and an miRNA-184 FC < 0.30 were more likely to have positive LN ($n = 6$; 60.0%) compared with those with an miRNA-184 FC > 0.30 ($n = 3$; 11.5%), $P = 0.006$ (Table 4).

Discussion

Our results show that in grade 1–2 early-stage EC, women with LN metastases have different miRNA profiles compared with those without metastatic LN. Moreover, we found that final LN status can be accurately predicted using the miRNA expression level.

Nodal status in grade 1–2 early-stage EC is currently a major subject of debate. Although lymphadenectomy is no longer recommended in early-stage EC since the publication of a meta-analysis demonstrating no impact on survival, there are several discrepancies about how to manage women with early-stage/grade 1–2 EC in terms of surgical staging.²¹ The major limitation of preoperative imaging techniques,³ such as MRI and CT scan, is the poor detection rate of LN metastases.³ Moreover, a prospective multicentre study showed that 12% of women with low- to intermediate-risk EC had LN metastases that would have been overlooked if LN staging had not been performed.⁶ This partially explains the great heterogeneity of recurrence rates in women with presumed early-stage tumors. Hence, the main challenge for physicians managing women with early-stage grade 1–2 EC is when to opt for lymphadenectomy and, in the absence of data on lymph node status, when to opt for adjuvant therapy.

To address this issue, we assessed miRNA level expression in primary tumors according to LN status. According to our chip analysis, seven miRNAs were

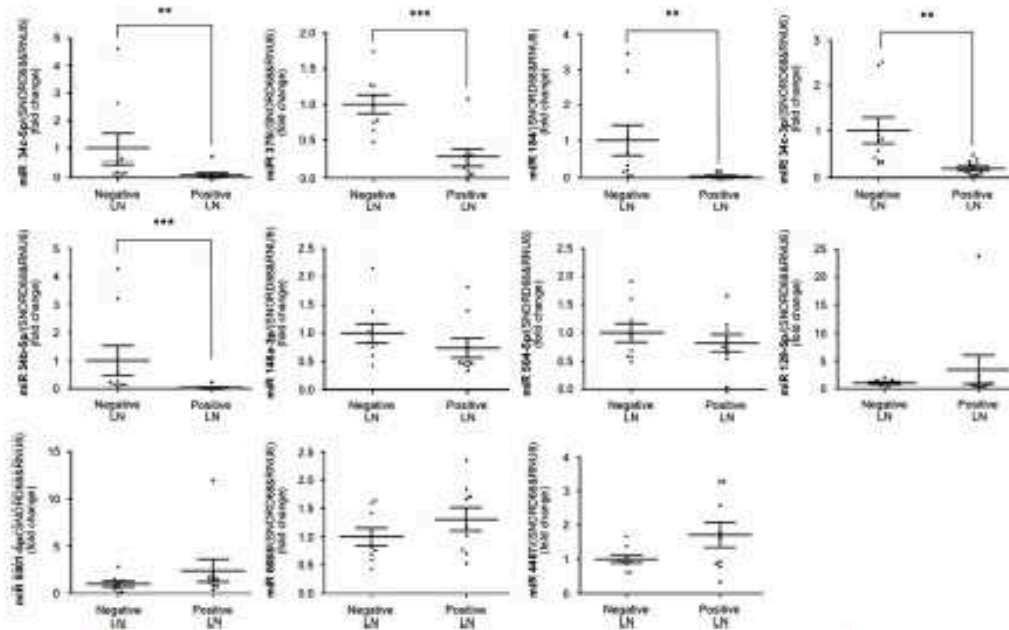


Figure 4 qRT-PCR assay. The expression levels of five microRNAs (miR-34c-5p, miR-375, miR-184, miR-34c-3p, and miR-34b-5p) were significantly lower in the grade 1-2 EC FFPE primary tumor samples with positive LN compared with those with negative LN. Mann-Whitney test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = n.s.

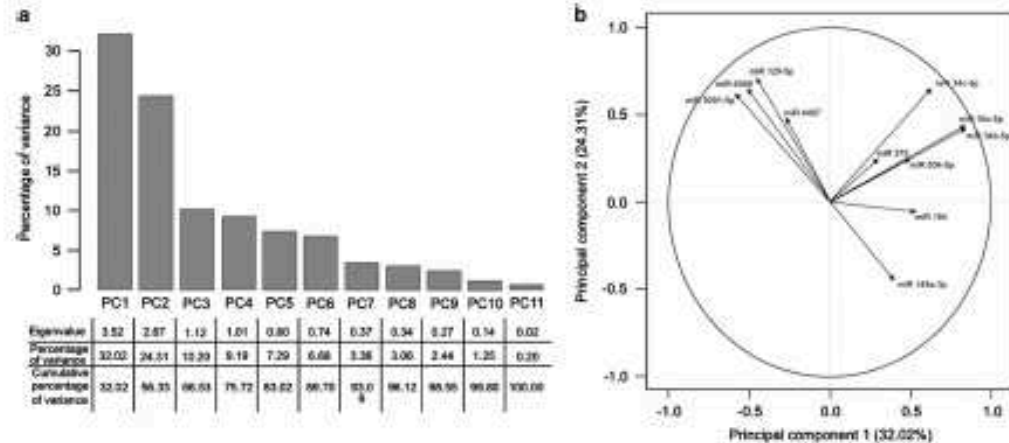


Figure 5 (a) After eigenvalue decomposition of 10 original dimensions (miR-34c-5p, miR-375, miR-184, miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-148a-3p, miR-504-5p, miR-5001-5p, miR-6068, and miR-4467), four principal components were found to be significant (with an eigenvalue > 1). These components explained 75.72% of the variance components. (b) Biplot of the first and second components. There is an opposition between microRNAs that have been defined by microarray as being upregulated (miR-129-5p, miR-6068, miR-5001-5p, and miR-4467) and downregulated (miR-34c-3p, miR-34b-5p, miR-375, miR-504-5p, miR-184, and miR-148a-3p) in the positive LN group. PC, principal component; LN, lymph node.

Table 3 Correlations between initial variables and principal components

Principal component 1			Principal component 2		
microRNA	correlation	P-value	microRNA	correlation	P-value
miR-34b-5p	0.86	5.03e-11	miR-129-5p	0.71	1.30e-06
miR-34c-5p	0.86	8.83e-11	miR-34c-3p	0.65	1.56e-05
miR-34c-3p	0.64	2.93e-05	miR-6068	0.63	3.43e-05
miR-184	0.53	8.87e-04	miR-5001-5p	0.63	3.51e-05
miR-504-5p	0.50	1.80e-03	miR-4467	0.48	2.80e-05
miR-148a-3p	0.40	1.61e-02	miR-34c-5p	0.44	6.74e-05
miR-129-5p	-0.45	5.33e-03	miR-34b-5p	0.43	8.98e-05
miR-6068	-0.51	1.57e-03	miR-148a-3p	-0.45	8.08e-05
miR-5001-5p	-0.60	1.43e-04			

The first principal component, accounting for 32.02% of the variance, was dominated by tumor-suppressor microRNAs, especially of the miR-34 family, including miR-34b-5p, miR-34c-3p, and miR-34c-5p. The second component, accounting for 24.31% of the variance, was dominated by miR-129-5p.

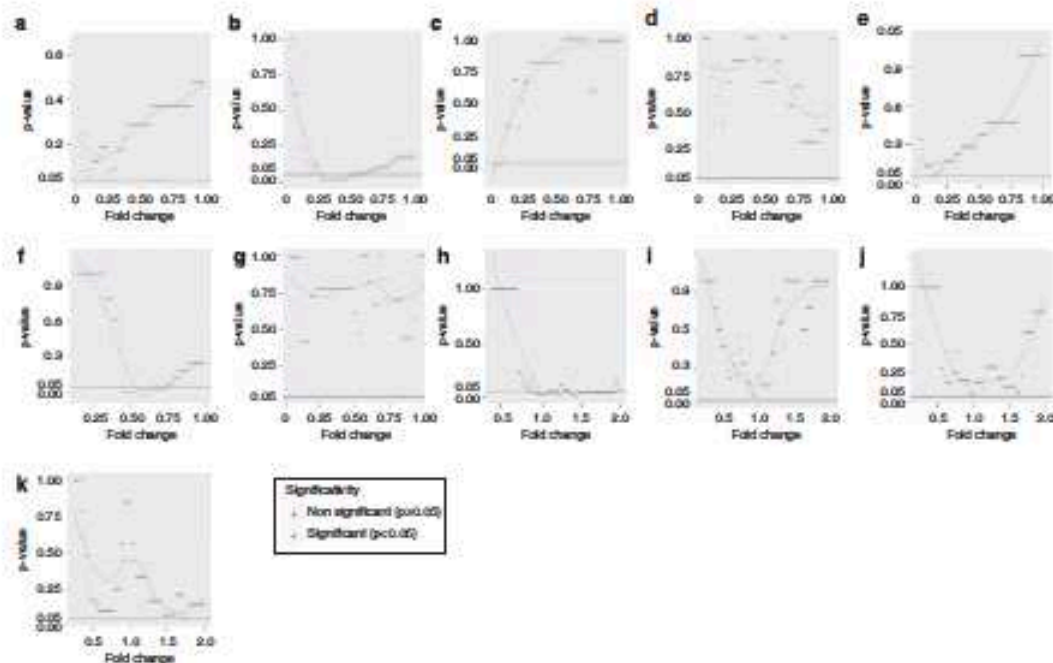


Figure 8 Optimal fold-change cutoffs denoting a correlation between microRNA expression and lymph node status in histologic grade 1-2 EC primary tumor specimens. (a) miR-34c-5p, (b) miR-375, (c) miR-184, (d) miR-34c-3p, (e) miR-34b-5p, (f) miR-148a-3p, (g) miR-504-5p, (h) miR-129-5p, (i) miR-5001-5p, (j) miR-6068, (k) miR-4467. EC, endometrial cancer.

downregulated and five upregulated more than twofold between the positive LN vs negative LN groups. Also, according to the enrichment analysis, the validated target genes for these differentially expressed miRNAs were exclusively involved in carcinogenic pathways, underlining the strength of our analysis. These results support data from the

current literature showing that miRNAs can act as tumor suppressors or oncogenes in various cancers¹³ including EC.^{22,23} Furthermore, recent evidence indicates that several miRNAs, including miR-34, regulate the metastatic process through the expression of epithelial to mesenchymal transition—transcriptions factors or epithelial to mesenchymal

Table 4 Optimal fold-change cutoffs denoting the strongest correlation between microRNA expression and LN status in histologic grade 1–2 EC primary tumor specimens

	EC FFPE primary tumor Negative LN N = 27	EC FFPE primary tumor Positive LN N = 9	P-value
<i>miR-375</i>			
FC > 0.30	20 (95.2%)	1 (4.8%)	0.001
FC < 0.30	7 (46.7%)	8 (53.3%)	
<i>miR-184</i>			
FC > 0.30	23 (88.5%)	3 (11.5%)	0.006
FC < 0.30	4 (40.0%)	6 (60.0%)	
<i>miR-34c-5p</i>			
FC > 0.0852	18 (90.0%)	2 (10.0%)	0.049
FC < 0.0852	9 (56.3%)	7 (43.7%)	
<i>miR-34b-5p</i>			
FC > 0.09	23 (85.2%)	4 (14.8%)	0.028
FC < 0.09	4 (44.4%)	5 (55.6%)	
<i>miR-148a-3p</i>			
FC > 0.50	22 (88.0%)	3 (12.0%)	0.012
FC < 0.50	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
<i>miR-129-5p</i>			
FC > 1.45	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0.013
FC < 1.45	24 (85.7%)	4 (14.3%)	
<i>miR-4487</i>			
FC > 1.75	3 (42.9%)	4 (57.1%)	0.0497
FC < 1.75	24 (82.8%)	5 (17.2%)	

Abbreviations: FC, fold change; EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LN, lymph node.

transition-activating signaling pathways (SNAIL1/SNAIL2, basic helix-loop-helix, E47, E2-2, TWIST1/TWIST2, and ZEB (ZEB1/ZEB2) families)²⁴ that act as E-cadherin repressors²⁵ and, ultimately, enhance cell migration and invasiveness in various cancers including EC.^{26–28}

After validation by RT-qPCR of miRNA selected from the previous step, we found that miR-34b-5p, miR-34c-5p, miR-34c-3p, miR-375, and miR-184 emerged as being particularly relevant to determine positive or negative LN metastatic status in women with grade 1–2 early-stage EC. Furthermore, miR-34b-5p, miR-34c-5p, miR-34c-3p, and miR-184 dominated the first principal component of the principal component analysis. This is in accordance with current literature: the miR-34 family (miR-34a, b, and c) is attracting a lot of attention since it has been found to play a key role as a tumor suppressor in several cancers.²⁹ Indeed, it is a direct target of the tumor-suppressor gene p53 inducing apoptosis, cell cycle arrest, and senescence when upregulated. It also negatively influences the viability of cancer stem cells and inhibits metastasis formation. The miR-34 family acts on apoptosis and cell cycle through the repression of many proteins involved in the regulation of these two biologic processes. In particular, the miR-34 family members bind to the 3'-UTRs of genes such as CDK4 and CDK6 (cell cycle proteins), Bcl-2 (an apoptosis regulator), SNAIL (epithelial-mesenchymal transition) and CD44 (migration and metastasis), thus repressing

their expression.²⁹ Numerous studies have shown the dysregulation of miR-34 in various types of cancers, including hepatocellular, mesothelial and colon cancer, melanomas, leukemia, nasopharyngeal cancer,³⁰ prostate cancer,³¹ neuroblastomas,³² glioblastoma³³ and breast cancer.³⁴ Yet, little research has been conducted in EC, apart from a functional study by Li *et al.*³⁵ demonstrating that miR-34c acts as a tumor suppressor in HEC-1-B cells, and that E2F3 protein may be a target of miR-34c.

In the same way, miR-184 functions as a tumor suppressor in various cancers (renal carcinoma,³⁶ glioma,^{37,38} non-small-cell lung cancer,³⁹ oral squamous cell carcinoma,⁴⁰ breast cancer⁴¹) by repressing oncogenes such as TNFAIP2,³⁷ SND1,³⁸ CDC25A, c-MYC,³⁹ and regulating the AKT/mTORC1 pathway.⁴¹ As suggested by various studies, miR-184 might be a useful diagnostic and therapeutic tool for malignant diseases.^{38,39} However, to the best of our knowledge, ours is the first study to provide data about miR-184 expression in EC.

Finally, a recent review by Yan *et al.* emphasized the emerging role of miR-375 in cancer and specified that miR-375 is frequently downregulated in multiple types of cancer, especially in hepatocarcinoma,⁴² esophagus cancer,⁴³ osteosarcoma,⁴⁴ lung cancer,⁴⁵ and acts as a tumor suppressor by repressing many critical oncogenes such as PDK1, JAK2, IGF1R,⁴⁶ AEG-1,⁴² and suppressing the PI3K/Akt pathway.⁴⁴ Furthermore, miR-375 might be used as a diagnostic and prognostic biomarker in various cancers. In this setting, reduced miR-375 expression could be a predictor of poor outcome (HR: 12.8, 95% CI: 3–49) and distant metastasis (HR: 8.7, 95% CI: 2–31) in head and neck squamous cell carcinomas.⁴⁷ Also, women with metastatic non-small-cell lung cancer had lower plasma miR-375 expression than those with non-metastatic non-small-cell lung cancer ($P < 0.05$).⁴⁸ However, miR-375 has only rarely been assessed in EC. One study found miR-375 to be associated with histologic type EC (downregulated in papillary-serous carcinoma compared with carcinosarcoma) (FC = –5.1, P -value = 3.0e–04).⁴⁸

We focused our analysis on postoperative FFPE EC primary tumors since it is known that FFPE specimens can be used for real-time PCR-based quantitative miRNA expression studies.¹⁶ This meant we could draw on the entire specimen collection of the Pathology Department containing samples taken between 2003 and 2012, and select samples to form two groups fully respecting the matching criteria. However, to provide a diagnostic tool, this analysis should be validated on preoperative samples. Unfortunately, assessing miRNA expression in preoperative biopsy samples might be difficult due to the contamination of normal endometrial or myometrial tissue. A heterogenic sample, with distinct miRNA profiles,¹³ could lead to a wrong analysis. Interestingly, two recent studies have demonstrated that circulating miRNAs have a high accuracy in diagnosing endometrioid EC ((miR-15b, –27a, and –233)⁴⁹

and (miR-9/miR-1228 and miR-9/miR-92a)³⁰). The miRNA described in our study may be preoperatively assessed in blood samples of women with grade 1–2 early-stage EC and might serve as a novel, non-invasive biomarker in the future, avoiding discrepancies in histologic type and grade between preoperative biopsies and final histology.

Some limitations of the study should be underlined. Because of the use of FFPE specimens with insufficient quality and RNA integrity, we could not assess the expression of exact targets for the miRNAs validated in this study. Future research is needed to resolve this problem.

Conclusion

In conclusion, this is the first study investigating the relative expression of mature miRNA genes in early-stage grade 1–grade 2 EC primary tumors according to the nodal status. This miRNA expression profile may provide a basis for further study of the miRNA function in endometrioid adenocarcinoma, and be used as a diagnostic tool for nodal status.

Acknowledgments

We thank Sébastien Jacques and Florent Dumont (Plateforme Genomic, INSERM U1016, Institut Cochin), Annie Cortez (Department of Pathology, Tenon University Hospital) and Michèle Oster (UMRS 938) for expert contributions.

Disclosure/conflict of interest

GC received support from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–E386.
- 2 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5–29.
- 3 Morice P, Leary A, Creutzberg C *et al.* Endometrial cancer. *Lancet Lond Engl* 2015.
- 4 Colombo N, Preti R, Landoni F *et al.* Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24 (Suppl 6):vi33–vi38.
- 5 Chi DS, Barakat RR, Palayekar MJ *et al.* The incidence of pelvic lymph node metastasis by FIGO staging for patients with adequately surgically staged endometrial adenocarcinoma of endometrioid histology. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:269–273.
- 6 Ballester M, Duherard G, Lécure F *et al.* Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: a prospective multicentre study [SENTI-ENDO]. *Lancet Oncol* 2011;12:469–476.
- 7 Guntupalli SR, Zigelboim I, Kizer NT *et al.* Lymphovascular space invasion is an independent risk factor for nodal disease and poor outcomes in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2012;124:31–35.
- 8 Bendifallah S, Cantorbe G, Arsène E *et al.* French multicenter study evaluating the risk of lymph node metastases in early-stage endometrial cancer: contribution of a risk scoring system. *Ann Surg Oncol* 2015;22:2722–2728.
- 9 Bendifallah S, Cantorbe G, Raimond E *et al.* A clue towards improving the European Society of Medical Oncology risk group classification in apparent early stage endometrial cancer? Impact of lymphovascular space invasion. *Br J Cancer* 2014;110:2640–2646.
- 10 Nugent EK, Bishop EA, Mathews CA *et al.* Do uterine risk factors or lymph node metastasis more significantly affect recurrence in patients with endometrioid adenocarcinoma? *Gynecol Oncol* 2012;125:94–98.
- 11 Guo H, Ingolia NT, Weissman JS *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835–840.
- 12 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15–20.
- 13 Farazi TA, Hoell JI, Morozov P *et al.* MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013;774:1–20.
- 14 Plummer PN, Freeman R, Taft RJ *et al.* MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 2013;73:341–352.
- 15 Tsukamoto O, Miura K, Mishima H *et al.* Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNAs in tissue and plasma. *Gynecol Oncol* 2014;132:715–721.
- 16 Lee H, Choi HJ, Kang CS *et al.* Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2012;25:1508–1515.
- 17 Querleu D, Planchamp F, Narducci F *et al.* Clinical practice guidelines for the management of patients with endometrial cancer in France: recommendations of the Institut National du Cancer and the Société Française d'Oncologie Gynécologique. *Int J Gynecol* 2011;21:945–950.
- 18 Brüt JM, Hollema H, Reesink N *et al.* Lymphovascular space involvement: an independent prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96:799–804.
- 19 Iqbal RA, Hobbs B, Collin F *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat Oxf Engl* 2003;4:249–264.
- 20 Ibrahim GM, Morgan BR, Macdonald RL. Patient phenotypes associated with outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a principal component analysis. *Stroke J Cereb Circ* 2014;45:670–676.
- 21 Frost JA, Webster KE, Bryant A *et al.* Lymphadenectomy for the management of endometrial cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;9:CD007585.
- 22 Sianou A, Galyfos G, Moragiani D *et al.* The role of microRNAs in the pathogenesis of endometrial cancer: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292:271–282.
- 23 Kontomanolis EN, Koukourakis MI. microRNA: the potential regulator of endometrial carcinogenesis. *MicroRNA* 2015;4:18–25.

- 24 Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res* 2014;6:205–216.
- 25 Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415–428.
- 26 Montserrat N, Mozas A, Llobet D et al. Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2012;43:632–643.
- 27 Liao Y, He X, Qiu H et al. Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by SHARP1 is linked to the NOTCH1 signaling pathway in metastasis of endometrial cancer. *BMC Cancer* 2014;14:487.
- 28 Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013;342:1234850.
- 29 Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget* 2014;5:872–881.
- 30 Li Y-Q, Ren X-Y, He Q-M et al. MiR-34c suppresses tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma by targeting MET. *Cell Death Dis* 2015;6:e1618.
- 31 Hagman Z, Haffadottir BS, Ansari M et al. The tumor suppressor miR-34c targets MET in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2013;109:1271–1278.
- 32 Welch C, Chen Y, Stallings RL. microRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007;26:5017–5022.
- 33 Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. *J Neurooncol* 2013;113:221–228.
- 34 Yu F, Jiao Y, Zhu Y et al. MicroRNA 34c gene down-regulation via DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells. *J Biol Chem* 2012;287:465–473.
- 35 Li F, Chen H, Huang Y et al. miR-34c plays a role of tumor suppressor in HEC-1-B cells by targeting E2F3 protein. *Oncol Rep* 2015;33:3069–3074.
- 36 Su Z, Chen D, Li Y et al. microRNA-184 functions as tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2015;9:961–966.
- 37 Cheng Z, Wang HZ, Li X et al. microRNA-184 inhibits cell proliferation and invasion, and specifically targets TNFAIP2 in Glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:27.
- 38 Emdad L, Janjic A, Alzubi MA et al. Suppression of miR-184 in malignant gliomas upregulates SND1 and promotes tumor aggressiveness. *Neuro-Oncology* 2015;17:419–429.
- 39 Lin T-C, Lin P-L, Cheng Y-W et al. microRNA-184 deregulated by the microRNA-21 promotes tumor malignancy and poor outcomes in non-small cell lung cancer via targeting CDC25A and c-Myc. *Ann Surg Oncol* 2015.
- 40 Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Rajkumar KS et al. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med* 2014;44:792–800.
- 41 Phua YW, Nguyen A, Roden DL et al. microRNA profiling of the pubertal mouse mammary gland identifies miR-184 as a candidate breast tumour suppressor gene. *Breast Cancer Res* 2015;17:83.
- 42 He X-X, Chang Y, Meng F-Y et al. microRNA-375 targets ATR-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2012;31:3357–3369.
- 43 Mayne GC, Hussey DJ, Watson DL. microRNAs and esophageal cancer—implications for pathogenesis and therapy. *Curr Pharm Des* 2013;19:1211–1226.
- 44 Shi Z-C, Chu X-R, Wu Y-G et al. microRNA-375 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting PIK3CA. *Tumour Biol* 2015;36:8579–8584.
- 45 Yu H, Jiang L, Sun C et al. Decreased circulating miR-375: a potential biomarker for patients with non-small-cell lung cancer. *Gene* 2014;534:60–65.
- 46 Yan J-W, Lin J-S, He X-X. The emerging role of miR-375 in cancer. *Int J Cancer* 2014;135:1011–1018.
- 47 Harris T, Jimenez L, Kawachi N et al. Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 2012;180:917–928.
- 48 Ratner ES, Tuck D, Richter C et al. MicroRNA signatures differentiate uterine cancer tumor subtypes. *Gynecol Oncol* 2010;118:251–257.
- 49 Wang L, Chen Y-J, Xu K et al. Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma. *PLoS One* 2014;9:e110767.
- 50 Torres A, Torres K, Pesci A et al. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer* 2013;132:1633–1645.

Détermination de profils d'expression de micro-ARNs associés à la présence d'emboles dans le cancer de l'endomètre de type I

Article 2 (179) :

Micro-RNA signature of lymphovascular space involvement in type 1 endometrial cancer

Geoffroy Canlorbe, Mathieu Castela, Sofiane Bendifallah, Zhe Wang, Marine Lefevre, Nathalie Chabbert-Buffet, Selim Aractingi, Emile Daraï, Céline Méhats et Marcos Ballester

L'objectif de ce travail était d'évaluer, au sein du CE de stade précoce de type I de grade 2, si le profil d'expression de miARNs pouvait être associé à la présence d'emboles lymphovasculaires.

Article 2.

Les profils d'expression de miARNs ont été évalués entre deux groupes de tissus tumoraux sous paraffine de CE de stade précoce de type I de grade 2 : un groupe avec présence d'emboles (n=12) et un groupe sans emboles (n=12), appariés selon l'envahissement myométrial et le statut ganglionnaire.

Résultats : L'analyse après hybridation sur puce Affymetrix a montré que le niveau d'expression de 18/2560 miARNs matures variait au moins d'un facteur 1,5 entre les groupes (avec et sans emboles lymphovasculaires). Une analyse d'enrichissement a montré que les ARNm cibles des miARNs étaient associés aux voies de signalisation impliquées dans les processus néoplasiques et métastatiques notamment. Ces données ont été validées par une analyse avec RT-qPCR : les niveaux d'expression de trois miARNs (miARN-34c-5p, -23b-5p, et -23c) étaient significativement plus faibles dans les tissus tumoraux avec emboles que dans ceux sans emboles. Les patientes avec seuil d'expression du miARN 34c-5p $< 0,15$ avaient un risque significativement plus élevé d'avoir des emboles (92,3%) que les patientes avec un seuil d'expression de miARN 34c-5p $> 0,15$ (0,0%), $p < 0,001$. Les patientes avec seuil d'expression du miARN 23b-5p $< 0,51$ avaient un risque significativement plus élevé d'avoir des emboles (90,0%) que les patientes avec un seuil d'expression de miARN 23b-5p $> 0,51$ (21,4%), $p = 0,003$.

Conclusion : Il s'agit de la première étude évaluant l'expression relative de miARNs au sein de tissus tumoraux de CE de stade précoce de grade 2 selon le statut des emboles lymphovasculaires. Ces profils d'expression de micro ARNs fournissent les bases à de nouvelles études sur la fonction des miARNs dans le CE et pourraient constituer un nouvel outil au diagnostic des emboles.

Micro-RNA signature of lymphovascular space involvement in type 1 endometrial cancer

Geoffroy Canlorbe^{1,2,3}, Mathieu Castels¹, Sofiane Bendifallah^{2,4}, Zhe Wang¹, Marine Lefevre⁵, Nathalie Chabbert-Buffet^{1,2}, Selim Aractingi^{1,6}, Emile Darai^{1,2,3}, Céline Méhats^{7*} and Marcos Ballester^{1,2,3*}

¹INSERM, UMR S 938, University Pierre and Marie Curie, ²Department of Obstetrics and Gynaecology, Tenon University Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Pierre and Marie Curie, ³Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), ⁴INSERM UMR S 707, Epidemiology, Information Systems, Modeling, University Pierre and Marie Curie, ⁵Faculté de médecine Paris 6 Descartes, ⁶Department of Dermatology, Cochin University Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, University René Descartes and ⁷INSERM U1016, CNRS 8104, Institut Cochin, University Paris Descartes, Paris, France

*These authors (CM and MB) contributed equally to this work

Summary. Objective. Lymphovascular space involvement (LVSI) is a major prognostic factor in type 1 endometrial cancer (EC). However, its use has been criticized because of poor subjectivity. MicroRNA signatures have recently been linked to EC pathologic characteristics. The aim of this study was to evaluate whether microRNA profiles of type 1 EC can be related to LVSI status and used as a tool to adapt therapy.

Study Design. MicroRNA expression was assessed by chip analysis and qRT-PCR in 12 formalin-fixed paraffin-embedded grade 2 EC specimens with positive LVSI and in 12 specimens with negative LVSI. Various statistical analyses, including enrichment analysis and a minimum p-value approach, were performed.

Results. The expression levels of microRNAs 34c-5p, -23b-5p, and 23c were significantly lower in the EC with positive LVSI compared to those with negative LVSI. Women with a microRNA-34c-5p fold change <0.15 were more likely to have positive LVSI status (92.3%) compared with those with a microRNA-34c-5p fold change >0.15 (0.0%), $p < 0.001$. Furthermore, women with a microRNA-23b-5p fold change <0.51 were more likely to have positive LVSI status (90.0%) compared with those with a microRNA-23b-5p fold change >0.51 (21.4%), $p = 0.003$.

Conclusion. This was the first study to investigate the relative expression of microRNA in type 1 EC according to LVSI status. This microRNA expression

profile may provide a basis for further study of the microRNA function in EC, and be used as a diagnostic tool for LVSI status.

Key words: Endometrial cancer, Lymphovascular space involvement, MicroRNA, MicroRNA-34c, MicroRNA-23

Introduction

Endometrial cancer (EC) is classified into two main clinicopathologic types: type 1, the much more common endometrioid adenocarcinoma (80-90%); and type 2 which comprises non-endometrioid subtypes such as serous, clear cell and undifferentiated carcinomas, as well as carcinosarcoma (10-20%) (Morice et al., 2015; Colombo et al., 2016). Currently, the surgical management of type 1 ECs depends on prognostic factors such as histologic grade, myometrial involvement, and lymphovascular space involvement (LVSI) status.

Among these factors, LVSI is considered as a major determinant of recurrence and overall survival (Bendifallah et al., 2014). The European Society of Medical Oncology (ESMO) / European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) / European Society for Radiotherapy & Oncology (ESTRO) joint committee recently recognized the adverse prognostic role of LVSI in type 1 grade 2 EC by defining a new subdivision of the intermediate risk group for recurrence to guide therapy: stage I, type 1, grade 2 ECs with positive LVSI status are now classified as being at high or intermediate

Offprint requests to: Dr. Geoffroy Canlorbe, MD, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France. e-mail: geoffroy.canlorbe@aphp.fr
DOI: 10.14870/HH-11-859

risk for recurrence, regardless of depth of myometrial invasion (Colombo et al., 2016). However, the use of LVSI as a prognostic criterion has been criticized for its subjectivity, poor reproducibility (Song et al., 2012) and is responsible for discrepancies between preoperative and actual risk-group determination based on final histology. These discrepancies are a major source of inaccurate or inadequate initial surgical staging exposing women to the risk of additional surgery or unnecessary adjuvant therapies. Thus, additional tools are needed to better assess LVSI status and thereby identify women with true high-risk disease.

MicroRNAs (miRNAs) are noncoding, ~22 nucleotide-long RNAs that regulate gene expression at the posttranscriptional level (Guo et al., 2010). Recently, miRNA signatures have been linked to the pathologic characteristics and prognosis of EC (Canlorbe et al., 2016). However, there are no data about LVSI status-associated miRNA regulation in EC.

The aim of this study was to evaluate whether miRNA profiles of presumed early-stage type 1 grade 2 endometrioid adenocarcinomas can be related to LVSI status and used as a tool to adapt surgical staging and adjuvant therapy.

Materials and methods

Many of the methods related to our patient cohort, miRNA extraction, microarray hybridization and analysis, qRT-PCR, and minimal p-value approach have been previously published (Canlorbe et al., 2016).

Experimental design

Approval for the present study was obtained from the local Medical Ethics Committee (CPP Ile-de-France V; e-4-15) and all the women had given informed written consent allowing their data or tissue to be used for medical research purposes.

The experimental design for profiling changes in miRNA according to LVSI status in endometrioid grade 2 formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) primary EC tumor specimens is shown in Fig. 1. Twenty-four women with presumed early-stage EC on preoperative imagery (i.e. women with a primary tumor confined to the corpus uteri) who underwent primary surgical treatment (including total hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy and systematic nodal staging) between January 2003 and December 2012 in Tenon University Hospital-APHP were enrolled in the study. Twelve of these women had positive LVSI status (positive LVSI) on final analysis and met the following inclusion criteria: endometrioid adenocarcinoma, grade 2, and FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stage I (regardless of nodal status according to final analysis). The remaining 12 women, with negative LVSI status (negative LVSI), met the same inclusion criteria and were used as control subjects. One-to-one matching was performed according to nodal

involvement criteria. The exclusion criteria were as follows: previous malignancies, history of chemotherapy or radiotherapy, inflammatory disease, or Lynch syndrome.

The clinical and pathologic variables of the women were extracted from maintained EC databases. Epidemiologic and histologic characterizations between women with negative or positive LVSI status are represented in Table 1.

Histologic characteristics

All postoperative pathologic analyses were performed by a dedicated gynecologic oncology pathologist and reviewed blind by a second pathologist to confirm the presence/absence of LVSI. Histologic grade 2 is defined by 6% to 50% of solid nonsquamous, nonmorular pattern. The presence of grade 3 nuclei involving more than 50% of the tumor increases the grade by one (Kurman, 2014). Therefore, histologic grade 1 defined by 5% or less of a solid nonsquamous, nonmorular growth pattern but with more than 50% of grade 3 nuclei is considered grade 2 EC. A tumor is considered LVSI positive when tumor emboli are found within a space clearly lined by endothelial cells on hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections (Briët et al., 2005).

RNA extraction from FFPE tissues, microarray hybridization (GEO: GSE75968) and data analysis

miRNA analysis according to LVSI status was done in post-operative specimen. FFPE tissues were obtained from the hysterectomy specimens. Briefly, as previously reported, 10 µm sections of pathologist confirmed regions of invasive carcinoma were microdissected. Total RNA was extracted using the miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions.

Microarray analysis was conducted on 12 distinct samples: six samples with positive LVSI (three individual specimens with nodal involvement and three pools of three different specimens without nodal involvement) and six samples with negative LVSI (three individual specimens with nodal involvement and three pools of three different specimens without nodal involvement). Microarray hybridization on miRNA 4.0 chips (Affymetrix) was conducted at the genomic platform of the Institut Cochin, Paris. Specific miRNA analysis was performed using Partek® Flow® software, version 3.0 (Partek Inc., St. Louis, MO, USA). CEL files were imported and normalized using Robust Multi-array Averaging (RMA) (Irizarry et al., 2003).

Genes with a nominal p-values ≤ 0.05 were considered to be differentially expressed. Among these, genes showing a variation of 1.5 were retained for further analysis.

To estimate the biologic effects of the differentially expressed miRNAs, lists of 3050 validated target genes

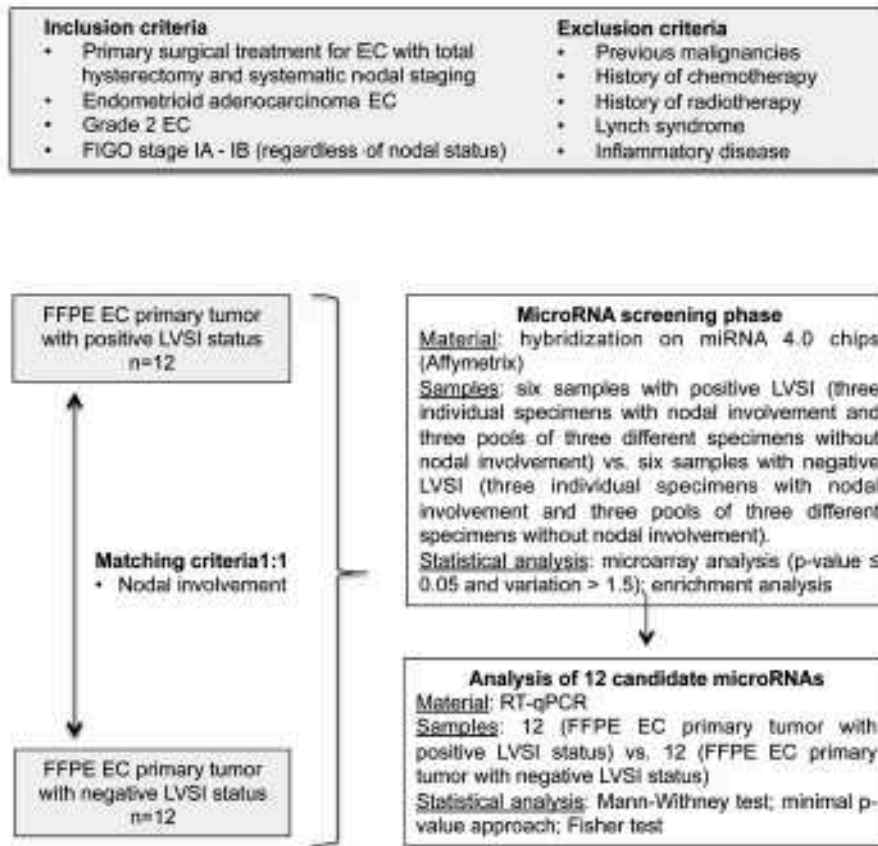


Fig. 1. Flowchart describing the constitution of groups and the experimental design. EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; LVSI, lymphovascular space involvement; RT, reverse transcription; qPCR, quantitative real time polymerase chain reaction.

Table 1. Epidemiologic and histologic characterizations between women with negative or positive LVSI status.

	EC FFPE primary tumor Negative LVSI status n=12	EC FFPE primary tumor Positive LVSI status n=12	P-value
Age (years), median (IQR)	69 (64-72)	68 (66-76)	0.85
Hypertension, n (%)	4 (33.3%)	4 (33.3%)	1
Diabetes n (%)	2 (16.7%)	0 (0%)	0.48
Parity, median (IQR)	2 (1-3)	1 (0-2)	0.13
BMI, median (IQR)	25.5 (20.75-30)	22.5 (22-28.75)	0.97
<30, n (%)	7 (70%)	8 (80%)	1
≥ 30 , n (%)	3 (30%)	2 (20%)	
FIGO Stage, n (%)			0.41
IA	8 (66.7%)	5 (41.7%)	
IB	4 (33.3%)	7 (58.3%)	
Histologic grade, n (%)			1
Grade 2	12 (100%)	12 (100%)	
Tumor size (mm), median (IQR)	40 (34-46)	35 (25-50)	0.38
Nodal involvement, n (%)			1
Yes	3 (25%)	3 (25%)	
No	9 (75%)	9 (75%)	
Time between surgery and sample analysis (months), median (IQR)	30 (10-58)	27 (15-62)	0.30

EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LVSI, lymphovascular space involvement; IQR, interquartile range; BMI, body mass index; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

were determined using currently available databases, including Tarbase[®] and Mirtarbase[®]. Gene Ontology (GO) enrichment analysis was performed on the lists using Genomatrix GePS (release 2.4.0, Genomatrix BH, Munich).

qRT-PCR validation

RT reactions were performed with the miScript[®] II RT Kit, using 1 µg of total RNA, according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). miRNA expression was analyzed by real-time PCR using miScript SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. miRNA primers were from Qiagen (Courtaboeuf, France). Relative expression was calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Both SNORD61 and RNU6 were used as endogenous controls for data normalization.

For the results from the qRT-PCR on miRNA expression data are expressed as means $\pm$ SEM. Means between two groups were compared using the Mann Whitney test. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. GraphPad Prism version 5 was used for analysis of tissue samples (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Table 2. List of the downregulated (fold-change < 1.5 , p -value < 0.05) and upregulated (fold-change > 1.5 , p -value < 0.05) microRNA between positive LVSI status vs. negative LVSI status FFPE early stage grade 2 EC primary tumor specimen.

Name	Fold Change	P-Value
Downregulated microRNAs		
miR-940-5p	-7.44	0.018
miR-6511a-3p	-2.47	0.006
miR-335-5p	-1.99	0.022
miR-6080	-1.88	0.007
miR-23b-5p	-1.74	0.039
miR-23c	-1.71	0.011
miR-4274	-1.65	0.005
miR-660-5p	-1.63	0.046
miR-3187-5p	-1.61	0.037
miR-3131	-1.59	0.038
miR-5189-5p	-1.55	0.046
miR-502-5p	-1.55	0.034
miR-4731-5p	-1.53	0.007
Upregulated microRNAs		
miR-575	2.30	0.042
miR-7975	1.86	0.006
miR-6780-5p	1.68	0.026
miR-5681a	1.64	0.027
miR-7-1-3p	1.64	0.042

LVSI, lymphovascular space involvement; EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded.

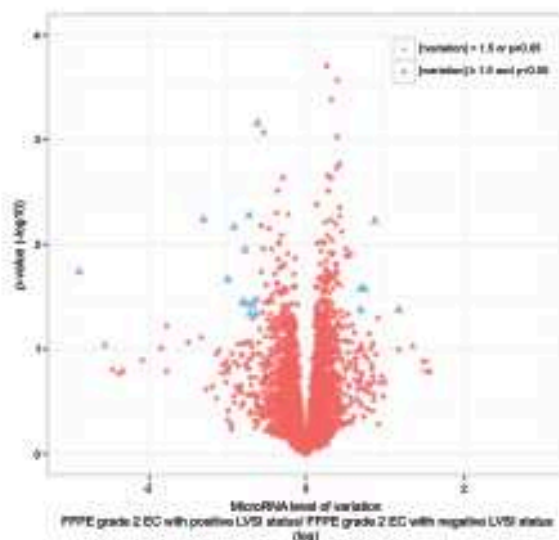


Fig. 2. Volcano plot. Abscissa is the logarithmic value of the level of variation (LogRatio) and ordinate is the negative logarithm of the statistical value ($-\log(p)$) of fluorescence intensities of the hybridized probes from positive or negative LVSI status samples. There was more than a 1.5-fold change in normalized fluorescence intensity of 18 microRNAs (blue triangle) between the positive LVSI status vs. negative LVSI status groups ($p < 0.05$): 13 decreased in intensity (on the left) and 5 increased in intensity (on the right). EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LVSI, lymphovascular space involvement.

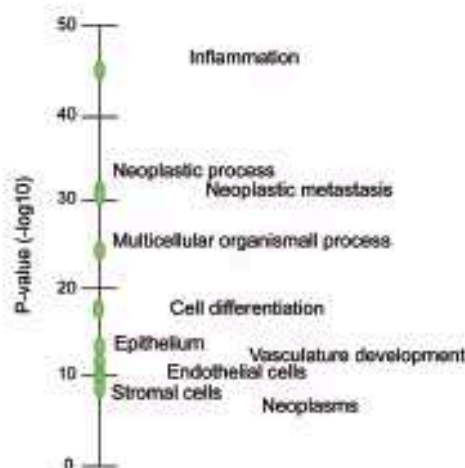


Fig. 3. Enrichment analysis. Gene ontology enrichment analysis was performed (Genomatrix GePS (release 2.4.0, Genomatrix BH, Munich)) using the list of all known validated targets for the miRNAs exhibiting at least a 1.5-fold change, with significant value ($p < 0.05$), in the early stage grade 2 EC primary tumors with positive LVSI status.

Optimal miRNA fold-change cut-offs correlated with LVSI status

For qualitative analysis, we calculated optimal cut-offs for each miRNA to correlate semi-quantitative expression and LVSI status. The optimal fold-change cut-off was determined by a minimum p-value approach.

Statistical analysis

Unless otherwise specified, data were managed with an Excel database and analysed using R 3.1.3 software, available online.

Results

Distinct miRNA signatures of grade 2 EC primary tumors with positive LVSI status

We focused our study on the 2,560 probes containing sequences for mature miRNAs. Among them, 93 had consistent normalized fluorescent intensities between the two groups (positive LVSI vs. negative LVSI) ($p < 0.05$). As illustrated by the volcano plot representation (Fig. 2), there was more than a 1.5-fold change significant difference in the normalized fluorescence intensity of 18 of these miRNAs between the positive and the negative LVSI groups: 13 miRNAs (miR-34c-5p, miR-6511a-3p, miR-335-5p, miR-6080, miR-23b-5p, miR-23c, miR-4274, miR-660-5p, miR-3187-5p, miR-3131, miR-5189-5p, miR-502-5p, and miR-4731-5p) had a decreased expression and five miRNAs (miR-575, miR-7975, miR-6760-5p, miR-5681a, and miR-7-1-3p) had an increased expression in samples from the positive LVSI group compared to samples from the negative group (Table 2).

GO term enrichment analysis was then performed using the list of all known validated targets for the miRNAs exhibiting at least a 1.5-fold change, with significant value ($p < 0.05$), in the EC primary tumors with positive LVSI. Genes involved in the neoplastic process, neoplastic metastasis, vasculature development, and neoplasms were specifically enriched (Fig. 3).

Evaluation of miRNA expression by real time qRT-PCR analysis

A qRT-PCR assay was used to confirm the expression of the miRNAs that had been selected from the previous step. The expression levels of three miRNAs were significantly lower (miR-34c-5p, miR-23b-5p, and miR-23c; $p < 0.0001$, 0.006, and 0.046, respectively) in the EC primary tumors with positive LVSI compared to those with negative LVSI. miR-660 was downregulated, with no significant difference ($p = 0.08$), in the EC primary tumors with positive LVSI compared to those with negative LVSI (Fig. 4).

Correlation between miRNA expression and LVSI status grade 2 EC

Optimal cut-offs denoting the strongest correlation between quantitative expression of the miRNAs that had been selected from the previous step and LVSI status are summarized in Fig. 5. The fold-change cut-offs defined were 0.10, 0.51, 1.1, and 1.2 for miR-34c-5p, miR-23b-5p, miR-23c, and miR-660, respectively. miR-34c-5p and miR-23b-5p had the most significant p-values: < 0.001 and 0.003, respectively. We compared LVSI status according to the cut-offs previously determined: women with grade 2 EC and a miRNA-34c-5p fold-change < 0.15 were more likely to have positive LVSI status ($n = 12$; 92.3%) compared with those with an miRNA-34c-5p fold-change > 0.15 ($n = 0$; 0.0%), $p < 0.001$; women with grade 2 EC and an miRNA-23b-5p fold-change < 0.51 were more likely to have positive LVSI status ($n = 9$; 90.0%) compared with those with a miRNA-23b-5p fold-change > 0.51 ($n = 3$; 21.4%), $p = 0.003$ (Table 3).

Discussion

Our results show that in endometrioid grade 2 EC, women with positive LVSI status have different miRNA profiles from those with negative LVSI status. Moreover, we found that final LVSI status can be accurately assessed using miRNA expression levels.

Table 3. Optimal fold change cut-offs denoting the strongest correlation between micro RNA expression and LVSI status in early stage grade 2 EC FFPE primary tumor specimens.

		EC FFPE primary tumor Negative LVSI status N=12	EC FFPE primary tumor Positive LVSI status N=12	p-value
miR-34c-5p	FC<0.15	1 (7.7 %)	12 (92.3 %)	<0.001
	FC>0.15	11 (100 %)	0 (0 %)	
miR-23b-5p	FC<0.51	1 (10 %)	9 (90 %)	0.003
	FC>0.51	11 (78.6 %)	3 (21.4 %)	
miR-23c	FC<1.1	7 (58.8 %)	12 (83.2 %)	0.037
	FC>1.1	5 (100 %)	0 (0 %)	
miR-660	FC<1.2	6 (33.3 %)	12 (86.7 %)	0.014
	FC>1.2	6 (100 %)	0 (0 %)	

EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LVSI, lymphovascular space involvement; FC, fold-change.

The crucial issue in managing patients with EC is to determine the risk group of recurrence on preoperative biopsy and MRI findings to adapt the surgical strategy. Previous studies have shown that discrepancies existing between pre- and postoperative grade mainly for grade I EC and that LVSI status is very rarely assessed on biopsy (Frumovitz et al., 2004). This is of major importance as the presence of LVSI is considered the first step in metastatic spread and is a predictor of nodal involvement, recurrence risk, and overall survival (Briët et al., 2005; Guntupalli et al., 2012), especially for early-stage type I EC (O'Brien et al., 2009). According to our chip analysis, 13 miRNAs were downregulated and five upregulated more than 1.5-fold between the positive and the negative LVSI groups. Also, according to the enrichment analysis, the validated target genes for these differentially expressed miRNAs were almost exclusively involved in carcinogenic pathways, underlining the strength of our analysis. Our results are in agreement with those of previous studies showing that miRNAs can act as tumor suppressors or oncogenes in various cancers (Farazi et al., 2013) including EC

(Kontomanolis and Koukourakis, 2015; Sianou et al., 2015). Furthermore, recent evidence indicates that several miRNAs, including miR-34, regulate the metastatic process through the expression of epithelial to mesenchymal transition (EMT) - transcription factors (TFs) or EMT-activating signalling pathways (SNAIL1/SNAIL2, basic helix-loop-helix (bHLH), E47, E2-2, TWIST1/TWIST2, and ZEB (ZEB1/ZEB2) families) (Díaz-López et al., 2014) that act as E-cadherin repressors (Peinado et al., 2007) and, ultimately, enhance cell migration and invasiveness in various cancers including EC (Montserrat et al., 2012).

After validation by qRT-PCR of the miRNAs, we found that miR-34c-5p, miR-23b-5p, and miR-23c emerged as being particularly relevant in determining LVSI status. The miR-34 family has been found to play a key role as a tumor suppressor (Agostini and Knight, 2014). It is a direct target of the tumor suppressor gene p53 and acts on apoptosis and cell cycle through the repression of many proteins involved in the regulation of these two biologic processes. This is totally in agreement with the recent molecular classification of EC which

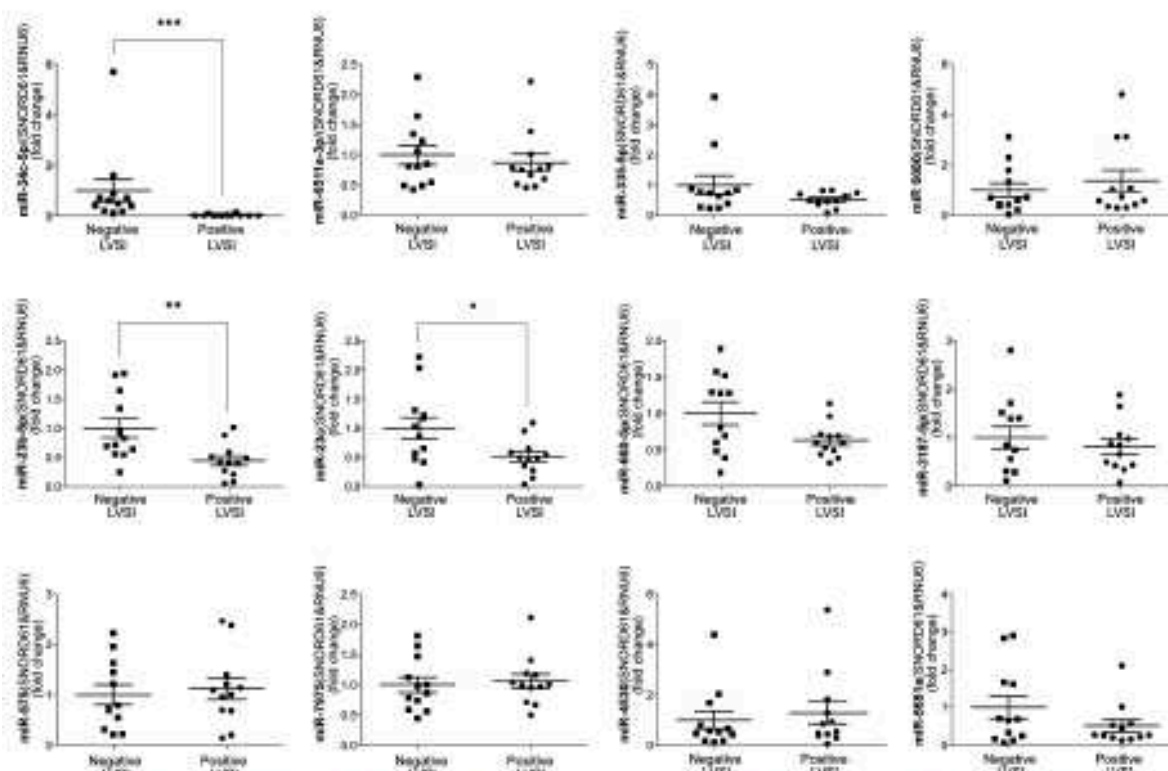


Fig. 4. qRT-PCR assay. The expression levels of 8 miRNAs (miR-34c-5p, miR-23b-5p, and miR-34c) were significantly lower in the early stage grade 2 EC FFPE primary tumor samples with positive LVSI status compared to those with negative LVSI status. Mann-Whitney test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; mean $\pm$ SEM. EC, endometrial cancer; FFPE, formalin fixed paraffin-embedded; LVSI, lymphovascular space involvement.

considers the p53 mutation to be an accurate prognostic marker in EC (Morice et al., 2015). In particular, the miR-34 family members bind to the 3'-UTRs of genes such as CDK4 and CDK6 (cell cycle proteins), Bcl-2 (an apoptosis regulator), SNAIL (epithelial mesenchymal transition) and CD44 (migration and metastasis), thus repressing their expression (Agostini and Knight, 2014). miR-34c regulates the blood tumor barrier permeability via myc-associated zinc-finger protein (MAZ)-mediated expression changes of zonula-occluden-1 (ZO-1), occludin, and claudin-5 (Zhao et al., 2015a,b). Yet little research has been conducted in EC, apart from a recent study by Canlorbe et al. (2016) who showed that the downregulation of miR-34c-5p was associated with nodal involvement in early-stage grade1-2 EC. Furthermore, a functional study by Li et al. demonstrated that miR-34c acts as a tumor suppressor in HEC-1-B cells (Li et al., 2015).

According to a recent review by Donadelli et al., miR-23b is dysregulated in tumors compared with normal tissues (Donadelli et al., 2014). Furthermore, the authors report that miR-23b is comprised in the miRNA signature of various tumors including endometrial carcinosarcoma (Castilla et al., 2011), uterine sarcomas

and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors (Kowalewska et al., 2013). Pellegrino et al. demonstrated that miR-23b was involved in cytoskeletal remodelling through the enhancement of cell-cell interactions, reduction of cell motility and invasion during cancer progression (Pellegrino et al., 2013). Furthermore, miR-23b has been known to act as a suppressor of EMT by targeting HMGA2 (Liu et al., 2016), snail and zeb1 transcription factors (Campos-Viguri et al., 2015), ATG12 (Wang et al., 2013), Zeb-1 (Majid et al., 2013) and Akt (Majid et al., 2012). Once again, there has been little research conducted in EC, apart from a study by Castilla et al. who analyzed the miRNA signatures associated with EMT in human carcinosarcomas (Castilla et al., 2011). They demonstrated that a loss of epithelial characteristics, including cadherin switching and the acquisition of a mesenchymal phenotype, was accompanied by changes in the miRNA expression profile and the upregulation of all the E-cadherin repressors analyzed. In particular, miR-23b was downregulated in the mesenchymal part of the endometrial carcinosarcomas (Castilla et al., 2011). Finally, the expression of miR-23b has been studied in cervical cancer cell lines by Campos-Viguri et al. who

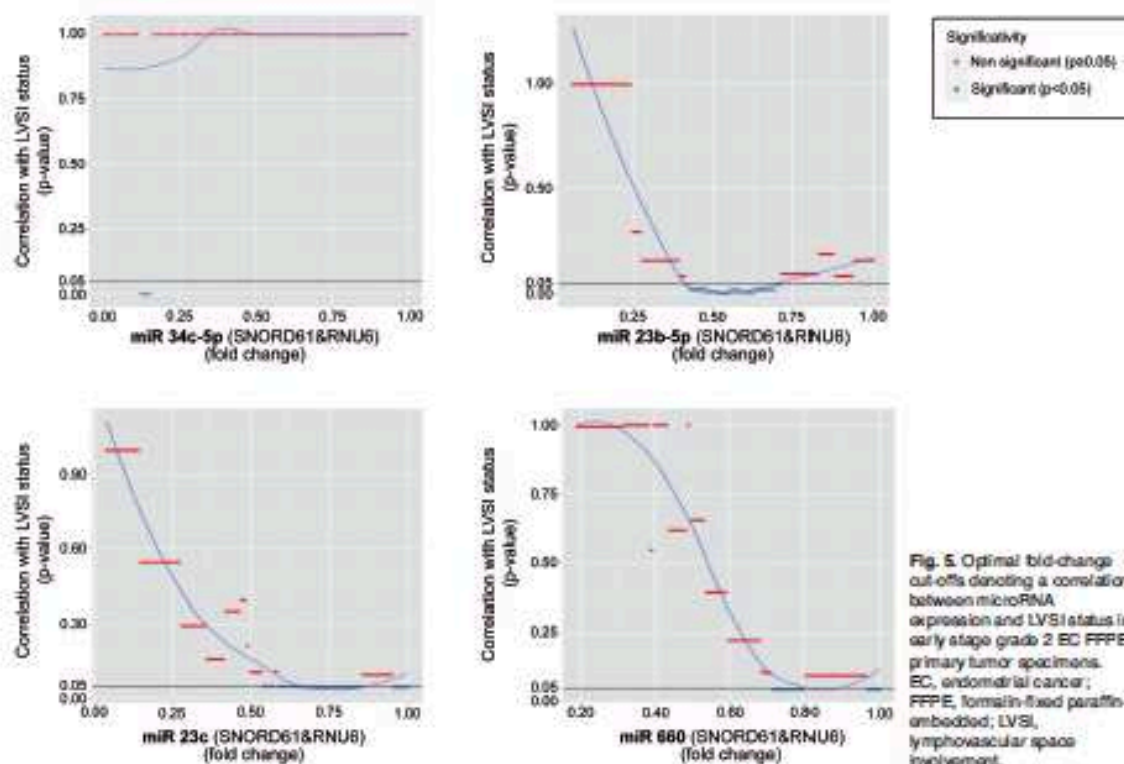


Fig. 5. Optimal fold-change cut-offs denoting a correlation between microRNA expression and LVSI status in early stage grade 2 EC FFPE primary tumor specimens. EC, endometrial cancer; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; LVSI, lymphovascular space involvement.

reported that this microRNA may influence the expression of uPa, c-Met and Zeb1 (Campos-Viguri et al., 2015).

Pathologic tools have been developed to evaluate LVSI status in EC. Jiang et al. analyzed the expression of the oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in 186 women with endometrioid EC and reported that the triple negative phenotype was associated with positive LVSI (Jiang et al., 2012). Moreover, Tomica et al. showed that a loss of both ER and PR in EC cell nuclei was correlated with positive LVSI (Tomica et al., 2014). Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Protein 8 (TNFAIP8) (Liu et al., 2014), hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1) (Zhao et al., 2015a,b), HAAA+ (ATPases associated with various cellular activities) nuclear coregulator cancer-associated (ANCCA) protein expression in EC has been found to be correlated to positive LVSI ($p=0.011$). Furthermore, ploidy, S-phase fraction (Song et al., 2012), p53 expression (Osmanoglu et al., 2005), CRP 1846C>T genetic polymorphism (Kito et al., 2015) correlate with positive LVSI status. Recently, an increased infiltration of CD163(+) tumour-associated macrophages (Kubler et al., 2014) and the CD8 and CD4 cell counts, regulatory T cell (Treg) count, and Treg/CD8 and Treg/CD4 ratios were significantly higher in EC patients with positive LVSI than in those with negative LVSI (Yamagami, 2011). Despite potential relevance, all these analyses were performed on uterine specimens and need to be validated on preoperative samples. An answer could be provided by the ongoing PIPENDO (Pipeline Prospective ENDometrioid carcinoma) study which aims to define the optimal panel of prognostic biomarkers in EC (Visser et al., 2015). Despite a potential relevance, all these analyses were performed on uterine specimens and need to be validated on preoperative samples. An alternative assessment of LVSI status could be provided preoperatively by transvaginal colour Doppler ultrasound (Alcázar et al., 2002), 18F-FDG PET/CT (Kitajima et al., 2015) or MRI. Indeed, various studies have demonstrated that peritumoral enhancement (Fuji et al., 2015), SUVmax (Lee et al., 2011), a tumor volume ratio greater than or equal to 25% (Nougaret et al., 2015) are correlated with LVSI. However, an external validation of these data is required due to the risk of intra- and inter-observer variability. Furthermore, most of these results are from individual analysis and further studies are needed to confirm their clinical value.

Some limitations of the study should be underlined. First, the retrospective nature of the study cannot exclude all bias. Second, myometrial involvement, an independent predictor of LVSI status, was not strictly identical between LVSI-positive and negative grade 2 EC groups. Also, we cannot distinguish cases with superficial and deep myometrial invasion that may lead to an analysis bias. Third, to provide a diagnostic tool, this analysis should be validated on preoperative samples. Unfortunately, assessing miRNA expression in

preoperative biopsy samples might be difficult due to the contamination of normal endometrial or myometrial tissue. A heterogenic sample, with distinct miRNA profiles could lead to a wrong analysis. Two recent studies have demonstrated that circulating miRNAs have a high accuracy in diagnosing endometrioid EC (Torres et al., 2013; Wang et al., 2014). The miRNA described in our study may be preoperatively assessed in blood samples of women with type 1 grade 2 EC and might serve as a novel, non-invasive biomarker in the future. Further study should validate on novel, large series of patients the diagnosis performance of candidate miRNAs proposed.

Conclusion

In conclusion, this is the first study investigating the relative expression of mature miRNA genes in type 1 grade 2 EC primary tumors according to the LVSI status. This miRNA expression profile may provide a basis for further study of the miRNA function in endometrioid adenocarcinoma, and be used as a diagnostic tool for LVSI status.

Acknowledgements. We thank Sébastien Jacques and Florent Dumont (Plateforme Génomique, INSERM U1016, Institut Cochin), Annie Cortez (AC) (Department of Pathology, Tenon University Hospital) and Michèle Oster (UMRS 938) for expert contributions.

Disclosure/conflict of interest. Geoffroy Canlorbe received support from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). The authors declare no conflict of interest.

References

- Agostini M. and Knight RA. (2014). miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget* 5, 872-881.
- Alcázar J.L., Galán M.J., Jurado M. and López-García G. (2002). Intratumoral blood flow analysis in endometrial carcinoma: correlation with tumor characteristics and risk for recurrence. *Gynecol. Oncol.* 84, 258-262.
- Bendallallah S., Canlorbe G., Raimond E., Hudry D., Coutant C., Graesslin O., Touboul C., Huguet F., Cortez A., Deraf E. and Ballester M. (2014). A due towards improving the European Society of Medical Oncology risk group classification in apparent early stage endometrial cancer? Impact of lymphovascular space invasion. *Br. J. Cancer* 110, 2640-2646.
- Briët J.M., Hübner H., Roelink N., Aalders J.G., Mourits M.J., ten Hoor K.A., Pras E., Boezen H.M., van der Zee A.G. and Nijman H.W. (2005). Lymphovascular space involvement: an independent prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 96, 799-804.
- Campos-Viguri G.E., Jiménez-Wenosa H., Peralta-Zaragoza O., Torres-Altamirano G., Soto-Flores D.G., Hernández-Sotelo D., Alarcón-Romero Ldel C., Jiménez-López M.A., Illades-Aguilar B. and Fernández-Tilapa G. (2015). miR-23b as a potential tumor suppressor and its regulation by DNA methylation in cervical cancer. *Infect. Agent. Cancer* 10, 42.
- Canlorbe G., Wang Z., Laas E., Bendallallah S., Castola M., Lefebvre M.,

- Chabbert-Buffet N., Darai E., Aractingi S., Mihats C. and Ballastat M. (2016). Identification of microRNA expression profile related to lymph node status in women with early-stage grade 1-2 endometrial cancer. *Mod. Pathol.* 29, 391-401.
- Castilla M.A., Moreno-Bueno G., Romero-Pérez L., Van De Vijver K., Bascuía M., López-García M.A., Prat J., Mafias-Gulu X., Cano A., Oliva E. and Palacios J. (2011). Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J. Pathol.* 223, 72-80.
- Colombo N., Creutzberg C., Amant F., Bosse T., González-Martín A., Ledermann J., Marth C., Nout R., Querleu D., Mirza M.R. and Sessa C. (2016). ESMO-ESGO-ESTRO Endometrial Consensus Conference Working Group. (2016). ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Int. J. Gynecol. Cancer. Off. J. Int. Gynecol. Cancer. Soc.* 26, 2-30.
- Díaz-López A., Moreno-Bueno G. and Cano A. (2014). Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag. Res.* 6, 205-216.
- Donadelli M., Dando I., Forini C. and Palmieri M. (2014). Regulation of miR-23b expression and its dual role on ROS production and tumour development. *Cancer Lett.* 28, 349, 107-113.
- Farazi T.A., Hodli J.J., Morozov P. and Tsuchi T. (2013). MicroRNAs in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 774, 1-20.
- Frumovitz M., Singh D.K., Meyer L., Smith D.H., Wertheim L., Resnik E. and Bodurka D.C. (2004). Predictors of final histology in patients with endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 95, 463-468.
- Fuji S., Kido A., Baba T., Fujimoto K., Daido S., Matsumura N., Koriishi I. and Togashi K. I. (2015). Subendometrial enhancement and peritumoral enhancement for assessing endometrial cancer on dynamic contrast enhanced MR imaging. *Eur. J. Radiol.* 84, 581-589.
- Gantupalli S.R., Zigelboim I., Kizir N.T., Zhang Q., Powell M.A., Thaker P.H., Goodfellow P.J. and Mutch D.G. (2012). Lymphovascular space invasion is an independent risk factor for nodal disease and poor outcomes in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 124, 31-35.
- Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S. and Bartel D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Itzany R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K.J., Schaff U. and Speed T.P. (2003). Exploration, normalization, and summarization of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat. Oxf. Engl.* 4, 249-264.
- Jiang X.F., Tang Q.L., Shen X.M., Li H.G., Chen L.H., Wang X.Y., Luo X., Lin Z.Q. and Jiang G.Y. (2012). Tumor-associated macrophages, epidermal growth factor receptor correlated with the triple negative phenotype in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 208, 730-735.
- Kitajima K., Suenaga Y., Ueno Y., Maeda T., Ebina Y., Yamada H., Okunaga T., Kubo K., Sofue K., Kanda T., Tamaki Y. and Sugimura K.I. (2015). Preoperative risk stratification using metabolic parameters of (18) F-FDG PET/CT in patients with endometrial cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 42, 1268-1275.
- Kito M., Motoyama S., Fujita K., Miura M., Nanjo H., Sato N., Makino K., Sugawara T., Kato A., Tamura D., Takahashi K., Kumazawa Y., Sato W., Miura H., Shimasawa H., Sato A., Kumagai J. and Terada Y. (2015). CRP 1846C>T genetic polymorphism is associated with lymph node metastasis and/or severe lymphatic invasion in endometrial cancer. *Tohoku. J. Exp. Med.* 237, 25-30.
- Kontomanolis E.N. and Koukourakis M.J. (2015). MicroRNA: The potential regulator of endometrial carcinogenesis. *MicroRNA Shāriqah. United Arab. Emir.* 4, 18-25.
- Kowalewska M., Bakula-Zalewska E., Chodłinska M., Goryca K., Nasierowska-Guttmejer A., Danska-Bidzinska A. and Bidzinski M. (2013). microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. *Tumour Biol.* 34, 2153-2160.
- Köbler K., Ayub T.H., Weber S.K., Zivanovic O., Abramian A., Koyen-Palk M.D., Maltmann M.R., Kaiser C., Serpe N.B., Kuhn W. and Rudowski C. (2014). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* 135, 178-183.
- Kurman R.J. (2014). WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. International Agency for Research on Cancer. Lyon, p 307.
- Lee H.J., Ahn B.C., Hong C.M., Song B.I., Kim H.W., Kang S., Jeong S.Y., Lee S.W. and Lee J. (2011). Preoperative risk stratification using (18) F-FDG PET/CT in women with endometrial cancer. *Nucl. Med. Biol.* 50, 204-213.
- Li F., Chen H., Huang Y., Zhang Q., Xue J., Liu Z. and Zheng F. (2015). miR-34c plays a role of tumor suppressor in HEC-1-B cells by targeting E2F3 protein. *Oncol. Rep.* 33, 3059-3074.
- Liu T., Gao H., Yang M., Zhao T., Liu Y. and Lou G. (2014). Correlation of TNF-α overexpression with the proliferation, metastasis, and disease-free survival in endometrial cancer. *Tumour Biol.* 35, 5805-5814.
- Liu H., Wang X., Liu S., Li H., Yuan X., Feng B., Bai H., Zhao B., Chu Y. and Li H. (2016). Effects and mechanism of miR-23b on glucose-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 70, 149-160.
- Majid S., Dar A.A., Sahni S., Dang G., Chang I., Greene K., Tanaka Y., Dahiya R. and Yamamura S. (2013). MicroRNA-23b functions as a tumor suppressor by regulating Zeb1 in bladder cancer. *PLoS One* 8, e67688.
- Majid S., Dar A.A., Sahni S., Arora S., Shahryar V., Zaman M.S., Chang I., Yamamura S., Tanaka Y., Dang G. and Dahiya R. (2012). miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer. Res.* 72, 6435-6446.
- Montserrat N., Mozas A., Lobat D., Ddoet X., Pena C., de Harros A.G., Mafias-Gulu X. and Prat J. (2012). Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum. Pathol.* 43, 632-643.
- Morice P., Leary A., Creutzberg C., Abu-Rustum N. and Darai E. (2015). Endometrial cancer. *Lancet.* 387, 1094-1108.
- Nougaret S., Reinhold C., Alsharif S.S., Addley H., Arceneau J., Molinari N., Gulu B. and Sala E. (2015). Endometrial cancer: Combined MR volumetry and diffusion-weighted imaging for assessment of myometrial and lymphovascular invasion and tumor grade. *Radiology* 276, 797-808.
- O'Brien D.J., Flannelly G., Mooney E.E. and Foley M. (2009). Lymphovascular space involvement in early stage well-differentiated endometrial cancer is associated with increased mortality. *Int. J. Obstet. Gynaecol.* 116, 991-994.
- Osmansoglu M.A., Kadoglu S., Osmansoglu S., Bozkaya H., Reis A. and Tekelioğlu Y. (2005). The relationship between mutant p53

- gene, DNA contents and conventional clinicopathological prognostic variables in cases with endometrial carcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 26, 64-70.
- Peinado H., Olmeda D. and Cano A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415-428.
- Perlegino L., Krell J., Roca-Alonso L., Slobbing J. and Castellano L. (2013). MicroRNA-23b regulates cellular architecture and impairs mitogenic and invasive phenotypes during cancer progression. *Bioarchitecture* 3, 119-124.
- Sarou A., Galyfos G., Moragiani D., Andronidas P., Kapanos G., Baka S. and Kouskouni E. (2015). The role of microRNAs in the pathogenesis of endometrial cancer: a systematic review. *Arch. Gynecol. Obstet.* 292, 271-282.
- Song T., Lee J.W., Choi C.H., Kim T.J., Bae D.S., Sung C.O., Song S.Y. and Kim B.G. (2012). Piddly and S-phase fraction are correlated with lymphovascular space invasion that is predictive of outcomes in endometrial cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 17, 590-597.
- Tomfoer D., Ramić S., Dandić D., Knezović F., Kolak T., Balja M.P., Alvir I., Mamić I. and Puljić M. (2014). A correlation between the expression of estrogen receptors and progesterone receptors in cancer cells and in the myometrium and prognostic factors in endometrial cancer. *Coll. Antropol.* 38, 129-134.
- Torres A., Torres K., Pesci A., Ceccaroni M., Paszkowski T., Casandini P., Zamboni G. and Madziewski R. (2013). Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 132, 1633-1645.
- Visser N.C., Bulten J., van der Wurff A.A., Boss E.A., Broekhorst C.M., Folten H.W., Haartsen J.E., van Hark H.A., de Kruit L.M., Kinkhamer P.J., Pijman B.M., Snijders M.P., Vandenput I., Vos M.C., de Wit P.E., van de Pol-Franse L.V., Massuger L.F. and Pijnenborg J.M. (2015). Pipeline Prospective ENDOmetrial carcinoma (PIFENDO) study: pre-operative recognition of high risk endometrial carcinoma: a multicentre prospective cohort study. *BMC Cancer* 15, 487.
- Wang L., Chen Y.J., Xu K., Xu H., Shen X.Z. and Tu R.Q. (2014). Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma. *PLoS One* 9, e10767.
- Wang P., Zhang J., Zhang L., Zhu Z., Fan J., Chen L., Zhuang L., Luo J., Chen H., Liu L., Chen Z. and Meng Z. (2013). MicroRNA 23b regulates autophagy associated with radioresistance of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 145, 1133-1143.
- Yamagami W., Susumu N., Tanaka H., Hirasawa A., Banno K., Suzuki N., Tsuda H., Tsukazaki K. and Aoki D. (2011). Immunofluorescence detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 21, 1628-1634.
- Zhao L., Wang P., Liu Y., Ma J. and Xue Y. (2015a). miR-34c regulates the permeability of blood-tumor barrier via MAZ-mediated expression changes of ZO-1, occludin, and claudin-5. *J. Cell. Physiol.* 230, 716-731.
- Zhao J., Liu T., Yu G. and Wang J. (2015b). Overexpression of HABP1 correlated with clinicopathological characteristics and unfavorable prognosis in endometrial cancer. *Tumour Biol.* 36, 1299-1306.

Accepted December 21, 2016

V - Synthèse des résultats et Discussion

V - Synthèse des résultats et Discussion

Les résultats des études déjà publiées sur les miARNs impliqués dans la carcinogenèse endométriale sont issues de populations essentiellement hétérogènes, regroupant plusieurs types histologiques, avec des résultats parfois contradictoires montrant à quel point ce processus est complexe et diversifié. Les CE regroupent des formes variées sur le plan histologique (endométriïde, séreux, cellules claires) avec des voies moléculaires de carcinogénèse différentes. Comme pour d'autres cancers, croissance tumorale et progression sont conditionnées par les altérations des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs qui surviennent dans ce processus multi-étapes et induisent un déséquilibre entre prolifération et apoptose. Nous avons exploré une partie des aspects de la carcinogenèse endométriale des types I histologiques supposés de bon pronostic en évaluant les profils d'expression de miARNs en fonction de deux facteurs pronostics majeurs : le statut ganglionnaire et la présence d'embolies lymphovasculaires. Nous avons également cherché à déterminer des seuils d'expression de ces miARNs qui pourraient servir d'aide au diagnostic et à la prise en charge thérapeutique. En effet, l'une des difficultés cruciales dans la prise en charge des patientes présentant un CE est que la stadification chirurgicale, notamment l'indication de lymphadénectomie, dépend de plusieurs informations préopératoires : l'estimation de l'invasion myométriale et de l'envahissement ganglionnaire à l'IRM, le grade et le type histologiques définis sur la biopsie endométriale et la présence d'embolies lymphovasculaires très souvent sous-estimée en pré opératoire. Or la pertinence de l'IRM n'est pas optimale que ce soit pour l'évaluation du statut ganglionnaire directement ou bien de l'envahissement myométrial (180). En effet, pour le stade IA présumé en IRM, le diagnostic histologique est en accord dans 73 % des cas, et un stade IB ou II sont observés dans respectivement 19,2 et 7,8 % des cas. Pour le stade IB présumé en IRM, le diagnostic histologique est en accord dans 74 % des cas, mais un stade IA est retrouvé dans 18,5% des cas, un stade II dans 3,7 % des cas et un stade IIIA (atteinte de la séreuse utérine) dans 3,7 % des cas. La détermination anatomopathologique pré opératoire du type et du grade histologiques présente également une discordance avec l'analyse anatomopathologique définitive évaluée entre 27% et 30% selon les études (181–183). L'examen histologique en extemporané a été proposé par certaines équipes pour rattraper l'imprécision de l'IRM préopératoire, mais Frumovitz et coll (182) ont souligné la persistance de discordances atteignant 27 % des cas entre l'évaluation préopératoire, tant concernant l'histologie (type histologique et grade) que l'infiltration myométriale appréciée par l'IRM et les données de l'examen histologique en extemporané et

en histologie définitive. Le statut des embolies est également à l'origine de discordances majeures entre le diagnostic pré opératoire et le statut définitif. A ce jour, plusieurs auteurs ont corrélé le statut des embolies aux données de l'imagerie (IRM et TEP-TDM) (9,190–197) mais toutes ces données doivent être confirmées par des études ultérieures portant sur des effectifs plus importants.

Les études ayant traité de la relation entre miARN et facteurs pronostiques dans le CE ne se focalisaient pas spécifiquement sur les bas et moyen risque ESMO et ne tentaient pas d'apporter une réponse à une problématique clinique donnée. Les études ayant abordé la corrélation entre l'expression des miARNs et le statut ganglionnaire dans le CE (tableau 7 (10, 11, 80, 86, 129, 132, 133, 137, 143, 144, 148)) étaient souvent hétérogènes, comportant l'association de plusieurs types histologiques et grades, avec des données issues d'analyses secondaires. Une seule étude a étudié la corrélation entre l'expression des miARNs et les embolies dans le CE en montrant que l'expression des miR-10b*, miR-29b, et miR-455-5p étaient significativement plus basse ($p = 0,048$, $p = 0,013$, et $p = 0,032$, respectivement) dans les échantillons avec embolies (137). Cependant, cette étude considérait uniquement des types histologiques séreux déjà considérés comme à haut risque quel que soit le statut des embolies et donc pour lesquels la stadification chirurgicale est déjà bien établie. Selon nos analyses au sein de cancers de l'endomètre de types histologiques I de grade 1 ou 2, les miR-23b-5p, -23c, -34c-5p, -34c-3p, -34b-5p, -184, et -375 ont des profils d'expression diminués en cas de statut ganglionnaire positif et/ou d'embolies positifs. Parmi ces miARNs, une diminution du miR-34c-5p est associée à la fois au statut ganglionnaire positif et à la présence d'embolies lymphovasculaires. Ce résultat est novateur dans le CE et n'avait été rapporté qu'une fois dans la littérature par Hiroki et al. en 2010 (137) : l'expression du miR-34c-5p était diminuée d'un facteur 6,17 au sein des tissus endométriaux tumoraux de type séreux par rapport à un tissu endométrial sain, $p=0,014$. Cette donnée vient conforter les connaissances concernant la famille du miR-34 (miR-34a, b et c) qui semble jouer le rôle de miARN suppresseur de tumeur dans de nombreux cancers (198). En effet, il s'agit d'une cible directe de p53, le gène suppresseur de tumeur entraînant l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la senescence quand il est surexprimé. Il régule également négativement la viabilité des cellules souches cancéreuses et inhibe la formation des métastases. La famille du miR-34 agit également sur l'apoptose et le cycle cellulaire à travers la répression de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de ces deux processus. En particulier, les membres de la famille du miR-34 se lient à la région 3'-UTRS de gènes tels que CDK4 et CDK6 (protéine du cycle cellulaire), Bcl-2 (un régulateur de l'apoptose), SNAIL (transition épithélio-mésenchymateuse) et CD44

(migration et métastase), limitant ainsi leur expression (198). De nombreuses études ont mis en évidence la dysrégulation du miR-34 dans plusieurs cancers tels le mélanome, les cancers hépatocellulaires, mésothéliaux, coliques, nasopharyngés, la leucémie (199), le cancer de la prostate (200), le neuroblastome (201), le glioblastome (202), et le cancer du sein (203). A ce jour, peu d'études ont concerné son rôle dans le CE, excepté une étude fonctionnelle de Li et coll. démontrant que le miR-34c agit en tant que miR suppresseur de tumeur dans les cellules HEC-1b et que E2F3 et qu'une de ses cibles, E2F3, serait une de cibles du miR-34c (142).

Les facteurs d'hétérogénéité des seuils d'expression de miARNs décrits dans la littérature sont nombreux. Le manque de reproductibilité peut être lié notamment aux différences de tissu étudié (épithélial strict ou contaminé par du tissu conjonctif), de gène de ménage choisi, de l'exclusion ou non des pré-miARNs, de technique de détection utilisée (caractéristique chimique des amorces, stratégie dans la transcription inverse (universelle ou bien spécifique), de mode de détection des amplicons (Sybr-green ou sonde interne marquée spécifique)).

Ainsi, dans notre travail, nous avons validé nos données issues de puce par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) avec le miScript II RT kit (Qiagen) et le miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). Les étapes de transcription reverse et de PCR sont illustrées dans la figure 16 extraite du guide d'utilisation fourni par Qiagen.

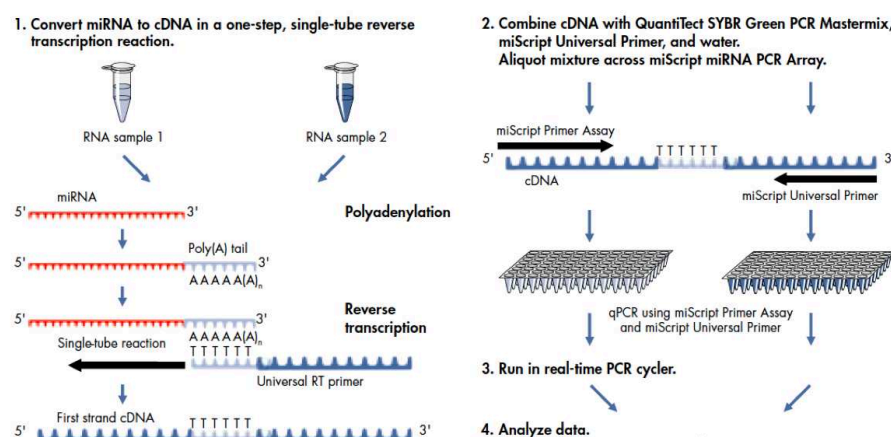


Figure 16 : Etapes de transcription inverse puis de réaction en chaîne par polymérase avec le miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). La première étape de transcription inverse commence par l'ajout d'une queue poly-A en 3' du miARN permettant la fixation d'une amorce universelle à ce niveau puis l'étape de transcription inverse. Les étapes de réaction en chaîne par polymérase nécessitent l'utilisation d'une amorce universelle et d'une amorce spécifique du miARN.

Il existe cependant actuellement sur le marché de très nombreux kits permettant la qPCR fournis notamment par Exiqon, Quanta BioSciences, Qiagen, et Life Technologies dont les performances ne sont pas équivalentes. Mestdagh et al. ont comparé en 2014 les performances en qPCR de ces 4 principaux kits concernant la précision, la reproductibilité, la sensibilité et la spécificité (204). La figure 17 issue de cette publication met bien en évidence la supériorité du kit de Qiagen concernant la sensibilité et celle de Exiqon concernant la reproductibilité et la spécificité.

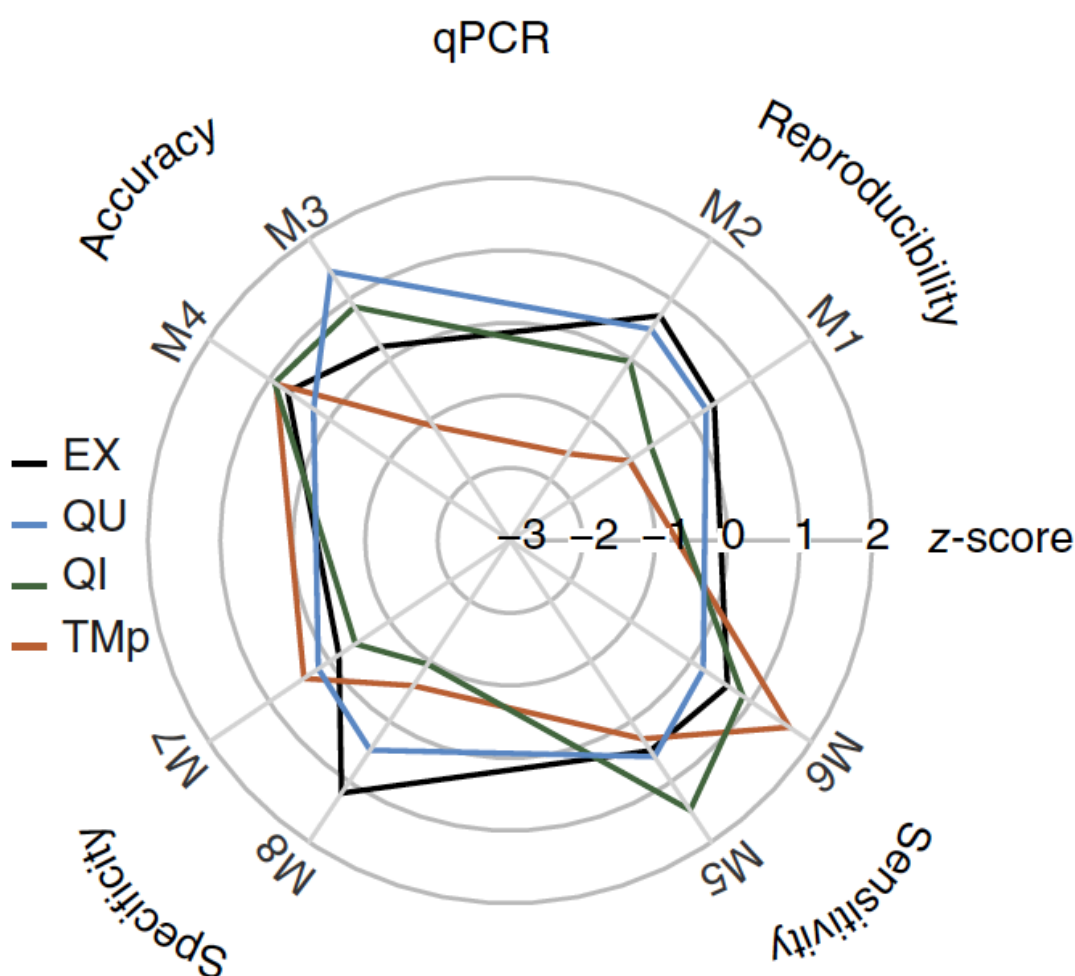


Figure 17 : Diagramme en étoile présentant les performances (Z-score) des différents kits de RT-qPCR EX : miRCury (Exiqon) ; QU : qScript (Quanta BioSciences) ; QI : miScript (Qiagen) ; TMp : TaqMan Cards preAmp (Life Technologies). Les Z-scores sont représentés, en fonction des 4 kits, pour 8 mesures : M1 : reproductibilité, M2 : réaction de titrage ; M3 : précision ; M4 : précision à faible concentration d'ARN ; M5 : sensibilité ; M6 : sensibilité à faible concentration d'ARN ; M7 : spécificité concernant l'ARN du virus MS2 ; M8 : test de réactivité croisée. (d'après Mestdagh et coll., Nat Methods, 2014) (204)

Dans nos deux études, nous avons choisi de normaliser l'expression des miARNs tissulaires avec la moyenne géométrique de SNORD 68 et RNU6 (178) ou de SNORD 61 et RNU6 (179). Nous avons choisi ces miARNs comme contrôle endogène car ils ne présentaient pas de variation d'expression entre les différents tissus d'après les données de notre puce. Il n'existe cependant à ce jour aucun consensus concernant l'utilisation des gènes de ménage comme contrôle interne endogène lors de l'évaluation de l'expression des miARNs. Les gènes de ménage sont classiquement choisis parmi un panel de 12 ARNs non codants (RNU48, RNU44, U75, RNU6B, U6, U54, RNU38B, U18, U49, miR- 26b, miR-92a and miR-16) décrits comme stables dans les tissus ou du moins utilisés dans les études portant sur le CE (149,205). Leur expression présente tout de même d'importantes variabilités selon certains auteurs (10) et pourrait être source d'erreurs d'interprétation et de non reproductibilité des résultats selon les types histologiques concernés. Certains kits conseillent également l'utilisation de certains ARNs endogènes de contrôle avec leurs réactifs (hsa-let-7a par Applied Biosystems) (132). L'utilisation d'une moyenne géométrique de plusieurs contrôles endogènes est également un moyen de limiter les erreurs d'interprétation liées à la variabilité d'un des contrôles. Le tableau 11 présente les ARNs de ménage utilisés par 23 études ayant traité de l'expression des miARNs dans le CE (11,74,80,81,86,129,130,132,133,135,137,139–141,143–145,147–149,151–153). Dans 14 études, un seul gène de ménage était utilisé comme contrôle interne. Le RNU6, le RNU6B, le RNU44 et le let-7a étaient utilisés comme contrôle interne unique par respectivement 6, 4, 3 et 1 études. Parmi ces 14 études, une seule s'est assurée de la stabilité de son gène de ménage dans les tissus étudiés (le let-7a) en le comparant à titre systématique par rapport à un autre gène de ménage (le RNU6) (132). Dans 3 études, deux gènes de ménage étaient utilisés comme contrôle interne : RNU44 avec RNU 48 (145), RNU48 avec RNU6 (81) et RNU38B avec RNU49 (130). Dans 3 études, trois gènes de ménage étaient utilisés comme contrôle interne : RNU48-RNU44-U75 (80).

Une façon alternative de présenter les résultats serait de travailler sur des rapports de concentrations de miARNs selon des situations physiologiques ou pathologiques. Cette technique de calcul et d'interprétation des résultats n'a cependant pas été retenue par les articles sélectionnés dans notre revue de la littérature.

Tableau 11 : ARNs de ménage utilisés par 23 études ayant traité de l'expression des micro-ARNs dans le cancer de l'endomètre

Référence étude	Matériel	Kit(marque) pour extraction ARN	Kit (marque) pour RT	Kit (marque) pour PCRq	miR de ménage
Li et coll., 2016 (143)	Paraffine	Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA)	cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)	U6
Yoneyama, et coll., 2015 (152)	Frais	ISOGEN reagent (Wako, Osaka, Japan)	PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time; Takara-bio, Ohtsu, Japan)	THUNDER-BIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Tokyo, Japan).	-
He et coll., 2015 (86)	Paraffine	miRNeasy FFPE kit	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)	Bio-Rad Real-time PCR System and Syber green PCR mix. (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)	U6
Kong et coll., 2014 (74)	-	TRIzol reagent (Invitrogen, USA)	PrimeScript™ RT reagent Kit (TakaRa, Dalian, China).	SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit (TakaRa, Dalian, China)	U6
Jurcevic et coll., 2014 (139)	Paraffine	Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit optimized for FFPE samples (Ambion, Foster City, CA, USA)	Universal cDNA synthesis kit (Exiqon, Denmark)	miRCURY LNA™ Universal real time microRNA polymerase chain reaction system, Ready to use Human Panel I and II (Exiqon)	Genes de contrôle fournis par GeNorm et NormFinder,
Liu et coll., 2014 (144)	-80°C	TRIzolH RNA Isolation Reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit.	TaqMan Universal PCR Master Mix	--
Xu et coll., 2013 (151)	-80°C	mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA)	M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)	SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, Otsu, Japan)	U6

Torres et coll., 2013 (11)	Paraffine -80°C	RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues (Ambion)	Reverse transcription (RT) was performed using TaqManVR MicroRNA Reverse Transcription Kit and specific primers (Applied Biosystems).	TaqManVR MicroRNA Assays and TaqManVR 2 _ Universal polymerase chain reaction PCR Master Mix, No AmpEraseVR UNG (Applied Biosystems)	RNU48 RNU44 U75
Bao et coll., 2013 (129)	-80°C	Tri-reagent (Molecular Research Center; Cincinnati, OH)	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit	SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)	U6B
Dong et coll., 2013 (135)	Paraffine	TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)	TaqMan Gene Expression Assay.	RNU44
Zhang et coll., 2013 (80)	Paraffine	RNeasy FFPE kit (Qiagen, Crawley, UK)	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	TaqMan Human MicroRNA A + B Cards Set version 3.0	U44 U48 U6
Zhai et coll., 2013 (153)	Paraffine	Trizol (Life Technologies, CA, USA)	cDNA synthesis kit	Taqman 2x universal PCR master mix	RNU44
Torres et coll., 2012 (148)	Paraffine -80°C	mirVANATM miRNA Isolation Kit (Ambion) Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues (Ambion)	RT Master	TaqManW MicroRNA Assay (Applied Bios stems),	RNU48, RNU44 U75
Lee et coll., 2012 (141)	Paraffine	Total Nucleic Acid Extraction Kit (Ambion, Texas, USA)	MicroRNA TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	TaqMan MicroRNA Assays in triplicate. (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	RNU6b
Karaayvaz et coll., 2012 (140)	Paraffine	TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad CA, USA).	High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, CA, USA)	TaqMan Gene Expression Assay	RNU6B
Snowdon et	Paraffine	Total Nucleic Acid Isolation	TaqMan MicroRNA Reverse	-	U6 small

coll., 2011 (147)		Kit for FFPE tissues (Applied Biosystems/Ambion, Austin TX, USA)	Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City CA, USA)		nuclear RNA
Cohn et coll., 2010 (133)	Paraffine	Recover All kit (Ambion, Austin, TX)	(Applied Biosystems, Foster City, CA)	TaqMan miRNA assays, (Applied Biosystems, Foster City, CA)	RNU44
Ratner et coll., 2010 (145)	Paraffine -80°C	mirVana RNA isolation kit (Ambion, Austin, TX)	TaqMan MiRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)	Asuragen TLDA assay	RNU44 RNU48
Hiroki et coll., 2010 (137)	-80°C	miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)	Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	RNU6B
Chung et coll., 2009 (132)	-80°C	TRIzol total RNA isolation reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)	TaqMan1 MicroRNA Reverse Transcription Kit et TaqMan1 Human MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA)	TaqMan1 Universal PCR Master Mix and TaqMan1 Human MicroRNA Assays (Applied Biosystems).	hsa-let-7a
Huang et coll., 2009 (81)	-		Taq Man MicroRNA Assay Applied Biosystems		RNU48 U6
Wu et coll., 2009 (149)	-80°C	Trizol reagent (Invitrogen, Carslbad, California, USA)	mirVana qRT-PCR (Invitrogen)	SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)	U6 small nuclear RNA
Boren et coll., 2008 (130)	-80°C	mirVana microRNA isolation kit (Ambion, Austin TX)	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems, Foster City, CA)	TaqMan Universal PCR Master Mix–No AmpErase UNG (Applied Biosystems)	RNU-38B RNU-49

Ce biais de normalisation pourrait être contourné par l'utilisation de techniques alternatives à la q-PCR. Bartels et col. (44) ont notamment décrit la technique de « locked nucleic acids » (LNA - acides nucléiques « verrouillés ») et ses avantages. Les LNA contiennent au moins un monomère LNA, c'est-à-dire un analogue d'acide nucléique dans lequel l'atome d'oxygène en 2' et l'atome de carbone en 4' du ribose sont « verrouillés » par un pont méthylène (206). Chaque monomère de LNA incorporé augmente le T_m du duplex d'acides nucléiques de 2 à 10 °C (207). Ainsi, en ajustant le nombre de monomères de LNA incorporés dans une sonde de capture, toutes les sondes d'une même expérience peuvent être normalisées au niveau de la valeur de leur T_m malgré la faible longueur des miARN. De nombreuses associations avec des pathologies ont ainsi été découvertes par cette technique. Les arrays utilisant des billes, telles que les arrays FlexmiR Luminex®, permettent également la quantification simultanée de plusieurs centaines de miRNA (208). Des sondes d'acides nucléiques verrouillés (LNA®, Exiqon) sont couplées à des microsphères de polystyrène carboxylée qui contiennent des mélanges variables de deux colorants fluorescents, permettant l'identification de chaque microsphère (jusqu'à 100) par un cytomètre en flux, car chaque microsphère a ainsi une couleur unique. Chaque microsphère est couplée à une molécule de LNA qui est spécifique pour un miARN ; les sondes permettent la différenciation entre des miARN d'une même famille. L'ARN total est extrait de l'échantillon, biotinylé, puis hybridé avec les microsphères. Les microsphères sont lavées, incubées avec la phycoérythrine-streptavidine et analysées par un analyseur Luminex®. L'analyseur peut identifier à la fois la fluorescence spécifique d'une microsphère et mesurer l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine-streptavidine, ce qui permet à l'utilisateur de mettre en évidence les miARN présents dans l'échantillon. Cet essai permet également d'obtenir des résultats quantitatifs, si une courbe de calibrage est réalisée en utilisant des matériels de calibrage appropriés tels que des oligonucléotides synthétiques. Pour l'instant, à notre connaissance, cette technique n'a pas ou peu été utilisée dans le CE.

La technique du Nanostring (245), qui rencontre également un succès croissant pour la détection et la quantification de molécules d'ADN ou d'ARN extraites en quantité limitante, pourrait apporter plus de sensibilité et de reproductibilité aux mesures des miARNs dans le CE. Le principe du Nanostring repose sur deux étapes clés. En amont, deux sondes (sonde de capture et sonde « rapporteur ») sont conçues spécifiquement pour chaque cible d'intérêt. La sonde de capture est couplée à une biotine et sera utilisée pour immobiliser les molécules d'intérêt sur un support dédié au comptage. La sonde « rapporteur » est spécifique de la molécule d'intérêt et contient une succession de 6 fluorochromes de 4 couleurs différentes,

dont l'arrangement définit un code-barres qui sera propre à chaque molécule d'intérêt. La première étape consiste en l'hybridation des sondes préalablement conçues sur l'échantillon à tester. La deuxième étape consiste à aligner et à immobiliser les complexes sonde-cible sur une lame dédiée puis à les faire lire par un système optique identifiant les codes couleurs. L'intérêt principal est que la détection est directe et ne nécessite pas d'amplification linéaire (puce) ou exponentielle (PCR). Selon l'analyse de la littérature, la technique du Nanostring a déjà été utilisée pour doser des miARNs dans des lignées cellulaires de CE (246) ou dans des tissus sous paraffine de cancer autre que de l'endomètre (247). Aucune des études rapportées dans ce travail n'a utilisé cette technique.

On peut enfin citer la PCR numérique pour détecter et quantifier de façon reproductible les molécules d'ARNs en faible quantité dans un échantillon. Cette technique permet d'une part d'obtenir une quantification absolue sans avoir besoin de préparer une courbe standard et d'autre part d'avoir une sensibilité 1000 fois supérieure à la q-PCR. Le principe de la PCR numérique est de multiplier le nombre de bio-réacteurs disponibles, ainsi, un échantillon sera partitionné en des milliers de compartiments distincts. Ensuite chaque compartiment sera considéré comme autant de réacteurs indépendants. En fin de PCR, on obtiendra autant de réactions montrant oui ou non une amplification (autant de 0 et de 1), renvoyant à un système binaire. L'application de la Loi de Poisson permettra ensuite d'estimer très finement la quantité initiale de cibles présentes dans l'échantillon de départ. A notre connaissance, cette technique a pu être utilisée sur du tissu endométriosique (248), ou des produits de curetage endométrial (249) pour rechercher des mutations liées au CE. La PCR numérique a également été décrite pour doser des miARNs dans des tissus cancéreux cutanés (250) ou neurologiques (251) notamment, mais pas au sein de tissu endométrial.

La détection de miARNs circulants est une piste d'avenir à visée diagnostique et pronostique concernant les cancers gynécologiques (209) dont le CE (8,10,11,148,210). Une revue récente sur les miARNs circulants dans les cancers gynécologiques a été publiée par Zavesky et al. (209). Elle y rapporte que la présence de miARN dans les fluides corporels a longtemps été considérée comme impossible en raison notamment de la présence d'ARNases dans le sang (211). Trois études ont cependant établi en 2008 que les miARNs endogènes extracellulaires pouvaient être retrouvés avec un niveau d'expression variant entre des sujets sains et des sujets avec cancer (106,212,213). Par la suite, les miARNs ont été retrouvés dans divers fluides corporels tels que le plasma, le liquide amniotique, l'urine, le liquide péritonéal, le liquide pleural, la salive, le lait maternel, le liquide céphalo-spinal (214–216). La stabilité

extra-cellulaire de ces miARNs est expliquée en partie par leur protection au sein d'une vésicule émise par la cellule. La figure 18 (209) illustre les différentes formes possibles de miARNs extracellulaires au sein de vésicules issues d'un phénomène d'apoptose ou de sécrétion. A noter qu'il existe également très probablement des miARNs extra-vésiculaires mais préservés au sein de la protéine AGO. A ce jour, le rôle fonctionnel exact de ces miARNs circulants n'est pas connu.

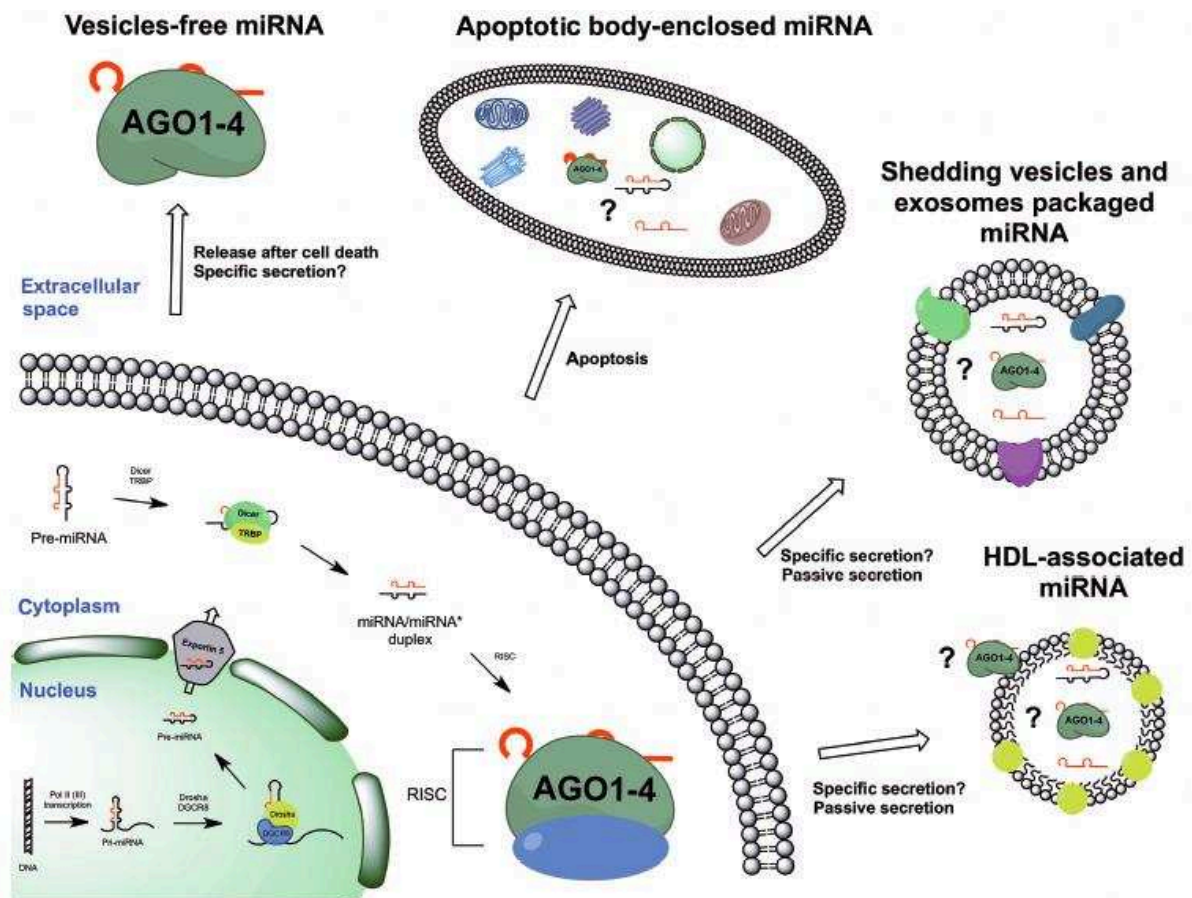


Figure 18 : Origine intracellulaire et extracellulaire des micro-ARNs (d'après Zavesky et coll., Neoplasma, 2015) (209)

A notre connaissance, cinq études ont pour l'instant traité de la relation entre miARNs plasmatiques/sériques et CE (8,10,11,148,210). Une synthèse des données de ces études est rapportée dans le tableau 12.

Les auteurs de ces 5 études concluent que les miARNs mis en évidence pourraient servir de test diagnostique non invasif. Wang et coll. concluent notamment que l'analyse de l'expression du miR-27a en association avec l'expression du CA-125 permet de distinguer les patientes saines des patientes présentant un adénocarcinome endométriote avec une aire sous la courbe de 0,894 (95% CI, 0,807-0,980; sensibilité = 0,78, spécificité= 0,97) (210). Jia et coll. concluent que l'étude du niveau d'expression sérique d'un panel de 4 miARNs (miR-222, -223, -186 et -204) permet de distinguer les patientes présentant un adénocarcinome endométriote des patientes saines avec une aire sous la courbe de 0,927 (95% CI, 0,85-1,00 ; sensibilité=91,7%, spécificité=87,5%). Toujours selon Jia et al, la performance diagnostique de ces 4 miARNs est également bien supérieure à celle du marqueur sérique CA 125 qui présente une aire sous la courbe de 0,673 (95% CI, 0.525-0.821) (8). Ces résultats semblent à première vue très encourageants mais ne sont malheureusement pas reproductibles entre les différentes études. Parmi les 5 études sus-citées ayant comparé l'expression de miARNs circulants (4 plasmatiques et 1 sérique) chez des patientes présentant un CE par rapport à des patientes saines, 18 miARNs (miR-15b, -27a, -92a, -99a, -100, -135b, -141, -143, -186, -199b, -200a, -203, -204, -205, -222, -223, -449a, -1228, -1290) ont une expression augmentée dans le groupe de patientes ayant un cancer et 9 miARNs (miR-9, -21, -30a-3p, -301b, -1179, -3145-5p, -4502, -4638-3p, -4665-5p) ont une expression diminuée dans le groupe de patientes ayant un cancer. Et parmi ces 27 miARNs, uniquement le miARN-223 a été décrits par deux auteurs (8,210), alors que tous les autres n'ont été décrits qu'une seule fois. Cette non reproductibilité des résultats peut être expliquée par deux raisons : l'hétérogénéité des patientes concernées d'une part et la diversité des techniques de détections utilisée d'autre part. Les 5 études comparaient des patientes supposées en bonne santé avec des patientes présentant un CE de type endométriote. Or les dernières données de la littérature ont bien démontré qu'au sein d'un même type histologique (ici : endométriote), il pouvait exister plusieurs variétés de types moléculaires avec notamment des mutations de gènes tels que PTEN, K-ras, β -caténine ou une instabilité des microsatellites (12) à l'origine d'altération de la synthèse des miARNs. Comme nous l'avons soulevé dans les paragraphes précédents concernant le dosage des miARNs dans les tissus solides, il n'existe également pas de consensus concernant les techniques de mesure et de comparaison des niveaux d'expression de miARNs au niveau plasmatique ou sérique. Des panels de miARNs hautement exprimés

dans le plasma, tels que miR-93, miR-26b, miR-192, miR-103a, miR-142-3p, miR-92a, miR-638, miR-16 et miR-451 ont été proposés comme miARNs de ménage (213,217–219). Ainsi Torres et al, en 2012, ont normalisé leurs résultats bruts avec 5 des 9 miARNs proposés ci-dessus miR-93, miR-26b, miR-192, miR-103a, miR-142-3p (148). La même équipe a également proposé de normaliser l'expression des miARNs d'intérêt à celle d'oligonucléotides de synthèses de *Caenorhabditis elegans* ajoutés au produit d'extraction des ARNs : cel-miR-39, cel-miR-54 et cel-miR-238 (11,148). Wang et al ont également réalisé la normalisation des miARNs étudiés à partir de cel-miR-39 (210). Jia et al. et Tsukamoto et al. ont réalisé, quand à eux, une détermination de la concentration absolue des miARNs à l'aide de courbes de calibrations développées avec des miARNs synthétiques de concentration connue (10^{-6} fM/l) (8,10).

Tableau 12 : Relation entre micro-ARNs plasmatiques/sériques et cancer de l'endomètre

Référence étude	Matériel	Cas	Témoins	miR augmenté (cas vs. Témoin)	miR diminué (cas vs. Témoin)
Jia et coll., 2013 (8)	Sérum	33 patientes avec un adénocarcinome endométrioïde	42 patientes saines appariées sur l'âge	miR-222, miR- 223, miR-186 and miR-204	-
Torres et coll., 2013 (11)	Plasma	34 patientes avec un adénocarcinome endométrioïde	14 patientes saines	miR-92a, miR- 141, miR-200a, miR-203, miR- 449a, miR-1228 and miR-1290	miR-9 et miR- 301b
Torres et coll., 2012 (148)	Plasma	48 patientes avec un adénocarcinome endométrioïde	14 patientes saines	miR-99a, miR- 100 et miR-199b	-
Tsukamoto et coll., 2014 (10)	Plasma	12 patientes avec adénocarcinome endométrioïde	12 patientes saines	miR-135b, miR- 205	miR-30a-3p, miR-21
Wang et coll., 2014 (210)	Plasma	40 patientes avec adénocarcinome endométrioïde	53 patientes saines	miR-27a, miR- 15b, miR-143, miR-223	miR-1179, miR- 4638-3p, miR- 4665-5p, miR- 3145-5p, miR- 4502

VI – Conclusion et Perspective

VI – Conclusion et perspective

La mise en évidence au sein du CE de profils d'expression de miARNs associés à des facteurs pronostiques majeurs tels que le statut ganglionnaire et la présence d'emboles vient compléter l'approche anatomopathologique et apporter des arguments en faveur de la nécessité d'une classification moléculaire de ces cancers. Nous avons ainsi pu mettre en évidence au sein des cancers de l'endomètre supposés de bon pronostic qu'une sous-expression de miARNs suppresseurs de tumeurs, tels que miR-23b-5p, -23c, 34c-5p connus pour être impliqués dans la voie de l'EMT d'autres cancers, était associée à la présence d'emboles ou à un envahissement ganglionnaire. Nous avons également pu déterminer pour chacun des ces miARNs un seuil d'expression corrélé de façon significative à ces facteurs de mauvais pronostic. La poursuite de ces travaux nous permet d'espérer pouvoir sélectionner une population à risque et mieux orienter la stratégie thérapeutique avec notamment l'amélioration de l'indication d'exploration ganglionnaire chirurgicale.

L'analyse de miARNs plasmatiques semble une bonne perspective de recherche sous condition d'une homogénéisation des techniques de recueil et d'analyse des données. Cette thèse a ainsi permis d'établir une collaboration étroite entre l'UMRS 938, l'Institut Cochin et l'UMR 8126 aboutissant à la naissance du Projet de Recherche Translationnel (PRT-K16-158) GYNOMIR sur la place des miARNs plasmatiques comme nouveaux biomarqueurs dans les cancers gynécologiques (cancer l'endomètre et de l'ovaire). Ce projet prospectif multicentrique (18 équipes) recevra un financement de 575 KE par la DGOS et l'INCa sur une durée de 36 mois. Il est prévu d'inclure 200 patientes avec CE et 200 patientes avec un cancer de l'ovaire sur une période de 18 mois. La première partie du projet consistera à valider par RT-qPCR le rôle pronostique et diagnostique de miARNs candidats décrits par les investigateurs principaux dans des publications récentes. La deuxième partie du projet consistera à déterminer par séquençage à haut débit de nouveaux miARNs pouvant servir de biomarqueurs pronostiques. La troisième partie du projet consistera à valider une technique physique rapide et sensible de détection et dosage des miARNs plasmatiques (pRCA-FRET) afin d'exporter à la pratique clinique les résultats issus des deux premières parties du projet. L'ensemble de ce projet permettra de mieux cibler les patientes à mauvais pronostic et d'adapter en conséquence les traitements adjuvants.

VII - Références.

VII - Références Bibliographiques.

1. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, et al. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc.* 2016 Jan;26(1):2–30.
2. Querleu D, Planchamp F, Narducci F, Morice P, Joly F, Genestie C, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with endometrial cancer in France: recommendations of the Institut National du Cancer and the Société Française d'Oncologie Gynécologique. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc.* 2011 Jul;21(5):945–50.
3. Ballester M, Dubernard G, Lécuru F, Heitz D, Mathevet P, Marret H, et al. Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: a prospective multicentre study (SENTI-ENDO). *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):469–76.
4. Jeanteur P. [miRNAs and cancer]. *Bull Cancer (Paris).* 2010 Nov;97(11):1231–9.
5. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010 Aug 12;466(7308):835–40.
6. Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, Lu Z. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2011 Nov 20;412(23-24):2167–73.
7. Lee TS, Jeon HW, Kim YB, Kim YA, Kim MA, Kang SB. Aberrant microRNA expression in endometrial carcinoma using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *PloS One.* 2013;8(12):e81421.
8. Jia W, Wu Y, Zhang Q, Gao G, Zhang C, Xiang Y. Identification of four serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential non-invasive biomarkers for endometrioid endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2013 Jul;6(1):261–7.
9. Liu T, Gao H, Yang M, Zhao T, Liu Y, Lou G. Correlation of TNFAIP8 overexpression with the proliferation, metastasis, and disease-free survival in endometrial cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014 Jun;35(6):5805–14.
10. Tsukamoto O, Miura K, Mishima H, Abe S, Kaneuchi M, Higashijima A, et al. Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNAs in tissue and plasma. *Gynecol Oncol.* 2014 Mar;132(3):715–21.
11. Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P, et al. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2013 Apr 1;132(7):1633–45.

12. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Lancet Lond Engl*. 2015 Sep 4;
13. Semple D. Endometrial cancer. *Br J Hosp Med*. 1997 Apr 19;57(6):260–2.
14. Creutzberg CL, van Putten WLJ, Wárlám-Rodenhuis CC, van den Bergh ACM, de Winter KAJ, Koper PCM, et al. Outcome of high-risk stage IC, grade 3, compared with stage I endometrial carcinoma patients: the Postoperative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Apr 1;22(7):1234–41.
15. Purdie DM, Green AC. Epidemiology of endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2001 Jun;15(3):341–54.
16. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Feb;108(3-5):221–9.
17. Albertini A-F, Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Pathology of endometrioid carcinoma. *Bull Cancer (Paris)*. 2012 Jan;99(1):7–12.
18. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Jun 7;92(11):924–30.
19. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3113–22.
20. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, et al. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1998 Dec;4(12):3005–10.
21. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):725–30.
22. Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol*. 1998 Oct;29(10):1160–4.
23. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2000 Sep;6(9):3607–13.
24. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2304–10.
25. Colas C, Coulet F, Svrcek M, Collura A, Fléjou J-F, Duval A, et al. Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res*. 2012;113:121–66.

26. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene*. 1998 Nov 5;17(18):2413–7.
27. Maxwell GL, Risinger JI, Alvarez AA, Barrett JC, Berchuck A. Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol*. 2001 Mar;97(3):417–22.
28. Semczuk A, Schneider-Stock R, Berbec H, Marzec B, Jakowicki JA, Roessner A. K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett*. 2001 Mar 26;164(2):207–12.
29. Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, et al. Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res*. 1993 Apr 15;53(8):1906–10.
30. Ikeda T, Yoshinaga K, Suzuki A, Sakurada A, Ohmori H, Horii A. Anticorresponding mutations of the KRAS and PTEN genes in human endometrial cancer. *Oncol Rep*. 2000 Jun;7(3):567–70.
31. Lagarda H, Catasus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol*. 2001 Feb;193(2):193–9.
32. Bullions LC, Levine AJ. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol*. 1998 Jan;10(1):81–7.
33. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C, Sarrió D, Cassia R, García-Rostán G, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene*. 2002 Nov 14;21(52):7981–90.
34. Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 1999 Dec;21(12):1021–30.
35. Schlosshauer PW, Ellenson LH, Soslow RA. Beta-catenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2002 Oct;15(10):1032–7.
36. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I. beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2001 Jan;84(2):209–17.
37. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
38. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228–34.
39. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1131–8.
40. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev*

Genet. 2009 Oct;10(10):704–14.

- 41. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2009 Dec 1;27(34):5848–56.**
- 42. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009 Jan 23;136(2):215–33.**
- 43. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. Adv Exp Med Biol. 2013;774:1–20.**
- 44. Bartels CL, Tsongalis GJ. [MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer]. Ann Biol Clin (Paris). 2010 Jun;68(3):263–72.**
- 45. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2005 Jan 14;120(1):15–20.**
- 46. http. <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>.**
- 47. Heywood SM, Kennedy DS, Bester AJ. Separation of specific initiation factors involved in the translation of myosin and myoglobin messenger RNAs and the isolation of a new RNA involved in translation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Jun;71(6):2428–31.**
- 48. Bester AJ, Kennedy DS, Heywood SM. Two classes of translational control RNA: their role in the regulation of protein synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Apr;72(4):1523–7.**
- 49. Heywood SM. tcrRNA as a naturally occurring antisense RNA in eukaryotes. Nucleic Acids Res. 1986 Aug 26;14(16):6771–2.**
- 50. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993 Dec 3;75(5):843–54.**
- 51. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(Database issue):D154–8.**
- 52. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001 Oct 26;294(5543):853–8.**
- 53. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science. 2001 Oct 26;294(5543):858–62.**
- 54. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science. 2001 Oct 26;294(5543):862–4.**
- 55. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34(Database issue):D140–4.**

56. Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, et al. A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. *Annu Rev Genet.* 2015;49:213–42.
57. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA N Y N.* 2003 Mar;9(3):277–9.
58. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004 Oct 13;23(20):4051–60.
59. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097–101.
60. Lee Y, Han J, Yeom K-H, Jin H, Kim VN. Drosha in primary microRNA processing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:51–7.
61. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):235–40.
62. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):95–8.
63. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
64. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002 Sep 2;21(17):4663–70.
65. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102–14.
66. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:167–79.
67. Klinge CM. miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Dec 15;418 Pt 3:273–97.
68. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 2006 Aug 15;20(16):2202–7.
69. Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod.* 2010 Apr;82(4):791–801.
70. Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, et al. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell.* 2009 Oct 23;36(2):340–7.

71. Klinge CM. miRNAs and estrogen action. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2012 May;23(5):223–33.
72. Castellano L, Giamas G, Jacob J, Coombes RC, Lucchesi W, Thiruchelvam P, et al. The estrogen receptor- α -induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 15;106(37):15732–7.
73. Panda H, Chuang T-D, Luo X, Chegini N. Endometrial miR-181a and miR-98 expression is altered during transition from normal into cancerous state and target PGR, PGRMC1, CYP19A1, DDX3X, and TIMP3. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jul;97(7):E1316–26.
74. Kong X, Xu X, Yan Y, Guo F, Li J, Hu Y, et al. Estrogen regulates the tumour suppressor MiRNA-30c and its target gene, MTA-1, in endometrial cancer. *PloS One*. 2014;9(3):e90810.
75. Zhang R, He Y, Zhang X, Xing B, Sheng Y, Lu H, et al. Estrogen receptor-regulated microRNAs contribute to the BCL2/BAX imbalance in endometrial adenocarcinoma and precancerous lesions. *Cancer Lett*. 2012 Jan 28;314(2):155–65.
76. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9136–41.
77. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999–3004.
78. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259–69.
79. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*. 2011 Jul;91(3):827–87.
80. Zhang X, Dong Y, Ti H, Zhao J, Wang Y, Li T, et al. Down-regulation of miR-145 and miR-143 might be associated with DNA methyltransferase 3B overexpression and worse prognosis in endometrioid carcinomas. *Hum Pathol*. 2013 Nov;44(11):2571–80.
81. Huang Y-W, Liu JC, Deatherage DE, Luo J, Mutch DG, Goodfellow PJ, et al. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2009 Dec 1;69(23):9038–46.
82. Tsuruta T, Kozaki K-I, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, et al. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2011 Oct 15;71(20):6450–62.
83. Pavicic W, Perkiö E, Kaur S, Peltomäki P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med Camb Mass*. 2011;17(7-8):726–35.

84. Bai J-X, Yan B, Zhao Z-N, Xiao X, Qin W-W, Zhang R, et al. Tamoxifen represses miR-200 microRNAs and promotes epithelial-to-mesenchymal transition by up-regulating c-Myc in endometrial carcinoma cell lines. *Endocrinology*. 2013 Feb;154(2):635–45.
85. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92–105.
86. He S, Zeng S, Zhou Z-W, He Z-X, Zhou S-F. Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: a bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:1103–75.
87. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Oct;10(5):543–50.
88. Colas E, Pedrola N, Devis L, Ertekin T, Campoy I, Martínez E, et al. The EMT signaling pathways in endometrial carcinoma. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2012 Oct;14(10):715–20.
89. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 2013 Feb;13(2):97–110.
90. Makker A, Goel MM. Tumor progression, metastasis, and modulators of epithelial-mesenchymal transition in endometrioid endometrial carcinoma: an update. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Feb;23(2):R85–111.
91. Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*. 2014;6:205–16.
92. Liu Y-N, Yin JJ, Abou-Kheir W, Hynes PG, Casey OM, Fang L, et al. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene*. 2013 Jan 17;32(3):296–306.
93. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):247–56.
94. Chen D, Sun Y, Wei Y, Zhang P, Rezaeian AH, Teruya-Feldstein J, et al. LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat Med*. 2012 Oct;18(10):1511–7.
95. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007 Oct 11;449(7163):682–8.
96. Ru P, Steele R, Newhall P, Phillips NJ, Toth K, Ray RB. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling. *Mol Cancer Ther*. 2012 May;11(5):1166–73.
97. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*.

2010 Jul 1;127(1):118–26.

98. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim J, Provot S, Werb Z. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol.* 2013 Feb;15(2):201–13.
99. Wu Q, Lu Z, Li H, Lu J, Guo L, Ge Q. Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:597145.
100. Kumarswamy R, Mudduluru G, Ceppi P, Muppala S, Kozlowski M, Niklinski J, et al. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2012 May 1;130(9):2044–53.
101. Siemens H, Jackstadt R, Hüntten S, Kaller M, Menssen A, Götz U, et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle Georget Tex.* 2011 Dec 15;10(24):4256–71.
102. Kim NH, Kim HS, Li X-Y, Lee I, Choi H-S, Kang SE, et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2011 Oct 31;195(3):417–33.
103. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med.* 2011 Feb;17(2):211–5.
104. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1195–207.
105. Díaz-Martín J, Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Castilla MÁ, Rosa-Rosa JM, Cano A, et al. A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. *J Pathol.* 2014 Feb;232(3):319–29.
106. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 29;105(30):10513–8.
107. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PloS One.* 2011 Mar 17;6(3):e17745.
108. Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon Y-J, Volinia S, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med.* 2011 May 9;208(5):875–83.
109. Park S-M, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008 Apr 1;22(7):894–907.
110. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by

- targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):593–601.
111. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008 Jun;9(6):582–9.
 112. Korpai M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celià-Terrassa T, et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med.* 2011 Aug 7;17(9):1101–8.
 113. Zhang Z, Zhang B, Li W, Fu L, Fu L, Zhu Z, et al. Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells. *Genes Cancer.* 2011 Aug;2(8):782–91.
 114. Saini S, Majid S, Yamamura S, Tabatabai L, Suh SO, Shahryari V, et al. Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2011 Aug 15;17(16):5287–98.
 115. Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, Inoue N, Machida H, Nakayama T, et al. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Transl Med.* 2011 Mar 22;9:30.
 116. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell.* 2007 Dec 14;131(6):1109–23.
 117. Yun J, Frankenberger CA, Kuo W-L, Boelens MC, Eves EM, Cheng N, et al. Signalling pathway for RKIP and Let-7 regulates and predicts metastatic breast cancer. *EMBO J.* 2011 Aug 26;30(21):4500–14.
 118. Romero-Pérez L, Castilla MÁ, López-García MÁ, Díaz-Martín J, Biscuola M, Ramiro-Fuentes S, et al. Molecular events in endometrial carcinosarcomas and the role of high mobility group AT-hook 2 in endometrial carcinogenesis. *Hum Pathol.* 2013 Feb;44(2):244–54.
 119. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 13;102(50):18081–6.
 120. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7065–70.
 121. Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon LA, Zorio E, Medina P, Espana F, et al. Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem.* 2012;19(15):2406–13.
 122. Li S, Zhang J, Wan X. Role of miRNAs in endometrial cancer. *Histol Histopathol.* 2015 May;30(5):539–48.
 123. Kontomanolis EN, Koukourakis MI. MicroRNA: The Potential Regulator of Endometrial Carcinogenesis. *MicroRNA Shāriqah United Arab Emir.* 2015;4(1):18–

124. Sianou A, Galyfos G, Moragianni D, Andromidas P, Kaparos G, Baka S, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis of endometrial cancer: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2015 Aug;292(2):271–82.
125. Xue L-C, Xu Z-W, Wang K-H, Wang N, Zhang X-X, Wang S. Regulatory network of microRNAs, target genes, transcription factors and host genes in endometrial cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2015;16(2):475–83.
126. Kanekura K, Nishi H, Isaka K, Kuroda M. MicroRNA and gynecologic cancers. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016 Jun;42(6):612–7.
127. Chen Y, Song Y-X, Wang Z-N. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. *Mol Cancer*. 2013 May 19;12:43.
128. Aprelikova O, Palla J, Hibler B, Yu X, Greer YE, Yi M, et al. Silencing of miR-148a in cancer-associated fibroblasts results in WNT10B-mediated stimulation of tumor cell motility. *Oncogene*. 2013 Jul 4;32(27):3246–53.
129. Bao W, Wang H-H, Tian F-J, He X-Y, Qiu M-T, Wang J-Y, et al. A TrkB-STAT3-miR-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2013 Dec 9;12:155.
130. Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2008 Aug;110(2):206–15.
131. Choi CH, Park Y-A, Choi J-J, Song T, Song SY, Lee Y-Y, et al. Angiotensin II type I receptor and miR-155 in endometrial cancers: synergistic antiproliferative effects of anti-miR-155 and losartan on endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2012 Jul;126(1):124–31.
132. Chung TKH, Cheung T-H, Huen N-Y, Wong KWY, Lo KWK, Yim S-F, et al. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *Int J Cancer*. 2009 Mar 15;124(6):1358–65.
133. Cohn DE, Fabbri M, Valeri N, Alder H, Ivanov I, Liu C-G, et al. Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Jun;202(6):656.e1–8.
134. Devor EJ, Hovey AM, Goodheart MJ, Ramachandran S, Leslie KK. microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. *Oncol Rep*. 2011 Oct;26(4):995–1002.
135. Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, et al. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*. 2013 Jul 4;32(27):3286–95.
136. Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Sudo S, Sakuragi N. MicroRNA-106b modulates

- epithelial-mesenchymal transition by targeting TWIST1 in invasive endometrial cancer cell lines. *Mol Carcinog*. 2014 May;53(5):349–59.
137. Hiroki E, Akahira J-I, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci*. 2010 Jan;101(1):241–9.
 138. Jiang L, Meng W, Zeng J, Hu H, Lu L. MiR-34c oligonucleotide enhances chemosensitivity of Ishikawa cell to cisplatin by inducing apoptosis. *Cell Biol Int*. 2013 Jun;37(6):577–83.
 139. Jurcevic S, Olsson B, Klinga-Levan K. MicroRNA expression in human endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):88.
 140. Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, Shroyer KR, Ju J. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PloS One*. 2012;7(4):e35158.
 141. Lee H, Choi HJ, Kang CS, Lee HJ, Lee WS, Park CS. Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2012 Nov;25(11):1508–15.
 142. Li F, Chen H, Huang Y, Zhang Q, Xue J, Liu Z, et al. miR-34c plays a role of tumor suppressor in HEC-1-B cells by targeting E2F3 protein. *Oncol Rep*. 2015 Jun;33(6):3069–74.
 143. Li Y, Zhang Z, Zhang X, Lin Y, Luo T, Xiao Z, et al. A dual PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitor miR-99a suppresses endometrial carcinoma. *Am J Transl Res*. 2016;8(2):719–31.
 144. Liu B, Che Q, Qiu H, Bao W, Chen X, Lu W, et al. Elevated MiR-222-3p promotes proliferation and invasion of endometrial carcinoma via targeting ER α . *PloS One*. 2014;9(1):e87563.
 145. Ratner ES, Tuck D, Richter C, Nallur S, Patel RM, Schultz V, et al. MicroRNA signatures differentiate uterine cancer tumor subtypes. *Gynecol Oncol*. 2010 Sep;118(3):251–7.
 146. Schirmer U, Doberstein K, Rupp A-K, Bretz NP, Wuttig D, Kiefel H, et al. Role of miR-34a as a suppressor of L1CAM in endometrial carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Jan 30;5(2):462–72.
 147. Snowdon J, Zhang X, Childs T, Tron VA, Feilotter H. The microRNA-200 family is upregulated in endometrial carcinoma. *PloS One*. 2011;6(8):e22828.
 148. Torres A, Torres K, Pesci A, Ceccaroni M, Paszkowski T, Cassandrini P, et al. Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2012 Aug 24;12:369.
 149. Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in

- endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2009 Feb;18(1):50–5.
150. Xiong H, Li Q, Liu S, Wang F, Xiong Z, Chen J, et al. Integrated microRNA and mRNA transcriptome sequencing reveals the potential roles of miRNAs in stage I endometrioid endometrial carcinoma. *PloS One*. 2014;9(10):e110163.
 151. Xu Y-Y, Wu H-J, Ma H-D, Xu L-P, Huo Y, Yin L-R. MicroRNA-503 suppresses proliferation and cell-cycle progression of endometrioid endometrial cancer by negatively regulating cyclin D1. *FEBS J*. 2013 Aug;280(16):3768–79.
 152. Yoneyama K, Ishibashi O, Kawase R, Kurose K, Takeshita T. miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma. *Anticancer Res*. 2015 Mar;35(3):1401–10.
 153. Zhai H, Karaayvaz M, Dong P, Sakuragi N, Ju J. Prognostic significance of miR-194 in endometrial cancer. *Biomark Res*. 2013;1.
 154. Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Hamada J, Sudo S, Ju J, et al. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer*. 2011 Aug 18;10:99.
 155. Huang Y-W, Kuo C-T, Chen J-H, Goodfellow PJ, Huang TH-M, Rader JS, et al. Hypermethylation of miR-203 in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2014 May;133(2):340–5.
 156. Li Q, Qiu X-M, Li Q-H, Wang X-Y, Li L, Xu M, et al. MicroRNA-424 may function as a tumor suppressor in endometrial carcinoma cells by targeting E2F7. *Oncol Rep*. 2015 May;33(5):2354–60.
 157. Korpai M, Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biol*. 2008 Sep;5(3):115–9.
 158. Korpai M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*. 2008 May 30;283(22):14910–4.
 159. Cochrane DR, Cittelly DM, Richer JK. Steroid receptors and microRNAs: relationships revealed. *Steroids*. 2011 Jan;76(1-2):1–10.
 160. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh S-S, Ngankee A, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*. 2009 Dec 8;16(6):498–509.
 161. Zhang C, Zhang J, Hao J, Shi Z, Wang Y, Han L, et al. High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *J Transl Med*. 2012 Jun 8;10:119.
 162. Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim H-J, O'Brien C, et al. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in

- breast cancer. *Sci Signal*. 2011 Jun 14;4(177):ra41.
163. Sun K, Wang W, Zeng J, Wu C, Lei S, Li G. MicroRNA-221 inhibits CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*. 2011 Mar;32(3):375–84.
 164. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23716–24.
 165. Han X, Yan S, Weijie Z, Feng W, Liuxing W, Mengquan L, et al. Critical role of miR-10b in transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Ther*. 2014 Feb;21(2):60–7.
 166. Liu X, Li J, Qin F, Dai S. miR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncol Lett*. 2016 Jun;11(6):3911–6.
 167. Xiang Y, Ma N, Wang D, Zhang Y, Zhou J, Wu G, et al. MiR-152 and miR-185 co-contribute to ovarian cancer cells cisplatin sensitivity by targeting DNMT1 directly: a novel epigenetic therapy independent of decitabine. *Oncogene*. 2014 Jan 16;33(3):378–86.
 168. Xu Q, Jiang Y, Yin Y, Li Q, He J, Jing Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J Mol Cell Biol*. 2013 Feb;5(1):3–13.
 169. Jia W, Eneh JO, Ratnaparkhe S, Altman MK, Murph MM. MicroRNA-30c-2* expressed in ovarian cancer cells suppresses growth factor-induced cellular proliferation and downregulates the oncogene BCL9. *Mol Cancer Res MCR*. 2011 Dec;9(12):1732–45.
 170. Bockhorn J, Yee K, Chang Y-F, Prat A, Huo D, Nwachukwu C, et al. MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jan;137(2):373–82.
 171. Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andrés R, Márquez-Rodas I, Osorio A, et al. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *PloS One*. 2012;7(6):e38847.
 172. Zhang H, Wang X, Chen Z, Wang W. MicroRNA-424 suppresses estradiol-induced cell proliferation via targeting GPER in endometrial cancer cells. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 2015 Nov 30;61(7):96–101.
 173. Guo X, Zhang J, Pang J, He S, Li G, Chong Y, et al. MicroRNA-503 represses epithelial-mesenchymal transition and inhibits metastasis of osteosarcoma by targeting c-myb. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016 Jul;37(7):9181–7.
 174. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003 Nov;35(3):215–7.

175. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature*. 2005 Dec 1;438(7068):685–9.
176. Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther*. 2006 Mar;13(6):496–502.
177. Saumet. Saumet A, Vetter G, Cougot N, Bouttier M, Rage F, Arar K, et al. “MicroRNA-associated therapies”. In: Ying SY (ed). *Current Research and Perspectives in microRNAs (miRNA)*. Springer Biomedical and Life Sciences 2008, p395-429.
178. Canlorbe G, Wang Z, Laas E, Bendifallah S, Castela M, Lefevre M, et al. Identification of microRNA expression profile related to lymph node status in women with early-stage grade 1-2 endometrial cancer. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2016 Feb 5;
179. Canlorbe G, Castela M, Bendifallah S, Wang Z, Lefevre M, Chabbert-Buffet N, et al. Micro-RNA signature of lymphovascular space involvement in type 1 endometrial cancer. *Histol Histopathol*. 2017 Sep;32(9):941–50.
180. Chi DS, Barakat RR, Palayekar MJ, Levine DA, Sonoda Y, Alektiar K, et al. The incidence of pelvic lymph node metastasis by FIGO staging for patients with adequately surgically staged endometrial adenocarcinoma of endometrioid histology. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. 2008 Apr;18(2):269–73.
181. Phelippeau J, Canlorbe G, Bendifallah S, Naoura I, Lefevre M, Ballester M, et al. Preoperative diagnosis of tumor grade and type in endometrial cancer by pipelle sampling and hysteroscopy: Results of a French study. *Surg Oncol*. 2016 Dec;25(4):370–7.
182. Frumovitz M, Singh DK, Meyer L, Smith DH, Wertheim I, Resnik E, et al. Predictors of final histology in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2004 Dec;95(3):463–8.
183. Eltabbakh GH, Shamonki J, Mount SL. Surgical stage, final grade, and survival of women with endometrial carcinoma whose preoperative endometrial biopsy shows well-differentiated tumors. *Gynecol Oncol*. 2005 Nov;99(2):309–12.
184. Fujii S, Kido A, Baba T, Fujimoto K, Daido S, Matsumura N, et al. Subendometrial enhancement and peritumoral enhancement for assessing endometrial cancer on dynamic contrast enhanced MR imaging. *Eur J Radiol*. 2015 Apr;84(4):581–9.
185. Lee HJ, Ahn B-C, Hong CM, Song BI, Kim HW, Kang S, et al. Preoperative risk stratification using (18)F-FDG PET/CT in women with endometrial cancer. *Nukl Nucl Med*. 2011;50(5):204–13.
186. Nougaret S, Reinhold C, Alsharif SS, Addley H, Arceneau J, Molinari N, et al. Endometrial Cancer: Combined MR Volumetry and Diffusion-weighted Imaging for Assessment of Myometrial and Lymphovascular Invasion and Tumor Grade. *Radiology*. 2015 Sep;276(3):797–808.

187. Thomassin-Naggara I, Cuenod C-A, Balvay D. Reproducibility of dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 2013 Nov;269(2):620–1.
188. Kitajima K, Suenaga Y, Ueno Y, Maeda T, Ebina Y, Yamada H, et al. Preoperative risk stratification using metabolic parameters of (18)F-FDG PET/CT in patients with endometrial cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Jul;42(8):1268–75.
189. Alcázar JL, Galán MJ, Jurado M, López-García G. Intratumoral blood flow analysis in endometrial carcinoma: correlation with tumor characteristics and risk for recurrence. *Gynecol Oncol*. 2002 Feb;84(2):258–62.
190. Song T, Lee J-W, Choi CH, Kim T-J, Bae D-S, Sung CO, et al. Ploidy and S-phase fraction are correlated with lymphovascular space invasion that is predictive of outcomes in endometrial cancer. *Int J Clin Oncol*. 2012 Dec;17(6):590–7.
191. Jiang X, Tang Q, Shen X, Li H, Chen L, Wang X, et al. Tumor-associated macrophages, epidermal growth factor receptor correlated with the triple negative phenotype in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2012 Dec 15;208(12):730–5.
192. Tomica D, Ramić S, Danolić D, Knezević F, Kolak T, Balja MP, et al. A correlation between the expression of estrogen receptors and progesterone receptors in cancer cells and in the myometrium and prognostic factors in endometrial cancer. *Coll Antropol*. 2014 Mar;38(1):129–34.
193. Zhao J, Liu T, Yu G, Wang J. Overexpression of HABP1 correlated with clinicopathological characteristics and unfavorable prognosis in endometrial cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015 Feb;36(2):1299–306.
194. Osmanağaoğlu MA, Kadioğlu S, Osmanağaoğlu S, Bozkaya H, Reis A, Tekelioğlu Y. The relationship between mutant p53 gene, DNA contents and conventional clinicopathological prognostic variables in cases with endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005;26(1):64–70.
195. Kito M, Motoyama S, Fujita K, Miura M, Nanjo H, Sato N, et al. CRP 1846C>T Genetic Polymorphism Is Associated with Lymph Node Metastasis and/or Severe Lymphatic Invasion in Endometrial Cancer. *Tohoku J Exp Med*. 2015;237(1):25–30.
196. Kübler K, Ayub TH, Weber SK, Zivanovic O, Abramian A, Keyver-Paik M-D, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2014 Nov;135(2):176–83.
197. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, Hirasawa A, Banno K, Suzuki N, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. 2011 Dec;21(9):1628–34.
198. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014 Feb 28;5(4):872–81.
199. Li Y-Q, Ren X-Y, He Q-M, Xu Y-F, Tang X-R, Sun Y, et al. MiR-34c suppresses tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma by targeting MET. *Cell*

Death Dis. 2015;6:e1618.

200. Hagman Z, Haflidadottir BS, Ansari M, Persson M, Bjartell A, Edsjö A, et al. The tumour suppressor miR-34c targets MET in prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2013 Sep 3;109(5):1271–8.
201. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2007 Jul 26;26(34):5017–22.
202. Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. *J Neurooncol*. 2013 Jun;113(2):221–8.
203. Yu F, Jiao Y, Zhu Y, Wang Y, Zhu J, Cui X, et al. MicroRNA 34c gene down-regulation via DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2012 Jan 2;287(1):465–73.
204. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreasen D, Bernard N, Chen C, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):809–15.
205. Lee J-W, Park Y-A, Choi J-J, Lee YY, Kim C-J, Choi C, et al. The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2011 Jan;120(1):56–62.
206. Petersen M, Nielsen CB, Nielsen KE, Jensen GA, Bondensgaard K, Singh SK, et al. The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit JMR*. 2000 Feb;13(1):44–53.
207. Válóczy A, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*. 2004 Dec 14;32(22):e175.
208. Luminex. Luminex. FlexmiRTM MicroRNA Human Panel instructions. <http://www.luminexcorp.com/> (Accessed September 2008).
209. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, Langmeierova L, Weinberger V, Minar L, et al. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: Emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. *Neoplasma*. 2015;62(4):509–20.
210. Wang L, Chen Y-J, Xu K, Xu H, Shen X-Z, Tu R-Q. Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma. *PloS One*. 2014;9(10):e110767.
211. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol*. 2010 Sep;3(5):478–81.
212. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997–1006.
213. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al.

- Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008 May;141(5):672–5.
214. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*. 2010 Mar 1;1(1):7.
215. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733–41.
216. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5473–7.
217. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999 Sep;5(9):2297–303.
218. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 2009 Jan;112(1):55–9.
219. Profiling. Profiling of microRNA in Blood, Serum/Plasma. <http://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/microRNA-serum-plasma-guidelines.pdf>.
220. Olivier Graesslin. Etude de l'expression des matrix-métalloprotéases (MMP-2, -7 et -9), des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1 et -2), des facteurs apoptotiques (P53 et Bcl-2) et des récepteurs hormonaux (RE et RP) dans les cancers et les hyperplasies de l'endomètre par comparaison à l'endomètre sain. Etude de la ploïdie et recherche des anomalies cytogénétiques par FISH. Evaluation de l'implication de ces facteurs dans le processus de carcinogenèse endométriale et de leur intérêt pronostic.. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. <NNT : 2008PA066310>. <tel-00811965>
221. Milne SA, Jabbour HN. Prostaglandin (PG) F(2alpha) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2alpha) in epithelial cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr;88(4):1825-32
222. von Rango U, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Hum Reprod*. 1998 Nov;13(11):3177-89.
223. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983 Feb;15(1):10-7.
224. Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. *Adv Anat Pathol*. 2002 May;9(3):145-84.
225. Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol*. 2000 Mar;76(3):287-

226. Gonthier C, Piel B, Touboul C, Walker F, Cortez A, Luton D, Daraï E, Koskas M. Cancer Incidence in Patients with Atypical Endometrial Hyperplasia Managed by Primary Hysterectomy or Fertility-sparing Treatment. *Anticancer Res.* 2015 Dec;35(12):6799-804.
227. Touboul C, Piel B, Koskas M, Gonthier C, Ballester M, Cortez A, Daraï E. Factors predictive of endometrial carcinoma in patients with atypical endometrial hyperplasia on preoperative histology. *Anticancer Res.* 2014 Oct;34(10):5671-6.
228. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92(11):924-30.
229. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 10;24(29):4783-91.
230. Baloglu H, Cannizzaro LA, Jones J, Koss LG. Atypical endometrial hyperplasia shares genomic abnormalities with endometrioid carcinoma by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol.* 2001 Jun;32(6):615-22.
231. Chang YS, Huang HD, Yeh KT, Chang JG. Identification of novel mutations in endometrial cancer patients by whole-exome sequencing. *Int J Oncol.* 2017 May;50(5):1778-1784. doi: 10.3892/ijo.2017.3919.
232. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013 May 2;497(7447):67-73.
233. Goldsby RE, Lawrence NA, Hays LE, Olmsted EA, Chen X, Singh M, et al. Defective DNA polymerase-delta proofreading causes cancer susceptibility in mice. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):638–9.
234. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1227–36.
235. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet.* 2013 Feb;45(2):136–44.
236. Espinosa I, Lee C-H, D'Angelo E, Palacios J, Prat J. Undifferentiated and Dedifferentiated Endometrial Carcinomas With POLE Exonuclease Domain Mutations Have a Favorable Prognosis. *Am J Surg Pathol.* 2017 Aug;41(8):1121–8.
237. Hussein YR, Weigelt B, Levine DA, Schoolmeester JK, Dao LN, Balzer BL, et al. Clinicopathological analysis of endometrial carcinomas harboring somatic POLE exonuclease domain mutations. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2015

Apr;28(4):505–14.

238. Billingsley CC, Cohn DE, Mutch DG, Hade EM, Goodfellow PJ. Prognostic Significance of POLE Exonuclease Domain Mutations in High-Grade Endometrioid Endometrial Cancer on Survival and Recurrence: A Subanalysis. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc.* 2016 Jun;26(5):933–8.
239. Church DN, Briggs SEW, Palles C, Domingo E, Kearsley SJ, Grimes JM, et al. DNA polymerase ϵ and δ exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum Mol Genet.* 2013 Jul 15;22(14):2820–8.
240. Meng B, Hoang LN, McIntyre JB, Duggan MA, Nelson GS, Lee C-H, et al. POLE exonuclease domain mutation predicts long progression-free survival in grade 3 endometrioid carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol.* 2014 Jul;134(1):15–9.
241. Church DN, Stelloo E, Nout RA, Valtcheva N, Depreeuw J, Haar N ter, et al. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Jan;107(1):402.
245. (<https://www.nanostring.com>)
246. Ioffe YJ, Chiappinelli KB, Mutch DG, Zigelboim I, Goodfellow PJ. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) pseudogene expression in endometrial cancer: a conserved regulatory mechanism important in tumorigenesis? *Gynecol Oncol.* 2012 Feb;124(2):340–6.
247. Low YS, Blöcker C, McPherson JR, Tang SA, Cheng YY, Wong JYS, et al. A formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)-based prognostic signature to predict metastasis in clinically low risk stage I/II microsatellite stable colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2017 Sep 10;403:13–20.
248. Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noë M, Horlings HM, et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med.* 2017 11;376(19):1835–48.
249. Nair N, Camacho-Vanegas O, Rykunov D, Dashkoff M, Camacho SC, Schumacher CA, et al. Genomic Analysis of Uterine Lavage Fluid Detects Early Endometrial Cancers and Reveals a Prevalent Landscape of Driver Mutations in Women without Histopathologic Evidence of Cancer: A Prospective Cross-Sectional Study. *PLoS Med.* 2016 Dec;13(12):e1002206.
250. Wandler A, Riber-Hansen R, Hager H, Hamilton-Dutoit SJ, Schmidt H, Nielsen BS, et al. Quantification of microRNA-21 and microRNA-125b in melanoma tissue. *Melanoma Res.* 2017 Oct;27(5):417–28.
251. Ames HM, Yuan M, Vizcaino MA, Yu W, Rodriguez FJ. MicroRNA profiling of low-grade glial and glioneuronal tumors shows an independent role for cluster 14q32.31 member miR-487b. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2017 Feb;30(2):204–16.
252. Saunders PT. Does estrogen receptor beta play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Jul;16 (5) : 222–7 .