



Analyse de la valeur pronostique de l'expression immunohistochimique de VIPR2 dans une série rétrospective de 59 léïomyosarcomes utérins

Magali Philip

► To cite this version:

Magali Philip. Analyse de la valeur pronostique de l'expression immunohistochimique de VIPR2 dans une série rétrospective de 59 léïomyosarcomes utérins. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02091237

HAL Id: dumas-02091237

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02091237>

Submitted on 5 Apr 2019

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.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2018

N° 3119

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE
Discipline : Anatomie et cytologie pathologique

Présentée et soutenue publiquement

Le 10 Octobre 2018

par

Magali PHILIP

Née le 19 novembre 1987 à Montpellier (34)

Titre de la thèse

**Analyse de la valeur pronostique de l'expression immunohistochimique de
VIPR2 dans une série rétrospective de 59 léiomyosarcomes utérins**

Jury

Madame le Professeur Béatrice VERGIER

Présidente

Monsieur le Professeur Denis QUERLEU

Rapporteur

Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO

Juge

Madame le Docteur Marion MARTY

Juge

Monsieur le Docteur Eberhard STOECKLE

Juge

Madame le Docteur Sabrina CROCE

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

A notre président,

Madame le Professeur Béatrice VERGIER

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Service d'Anatomie Pathologie,

Hôpital Haut-Lévêque CHU Bordeaux.

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. J'ai eu la chance de travailler à vos côtés et je vous remercie sincèrement pour la bienveillance et l'enseignement que vous m'avez apporté pendant mon internat, ainsi que pour votre dévouement envers les internes et leur formation. Vous m'avez fait partager votre engagement pour cette spécialité. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et de ma plus grande estime.

A notre rapporteur et juge,

Monsieur le Professeur Denis QUERLEU

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Service de Chirurgie

Centre de Lutte Contre le Cancer, Institut Bergonié, Bordeaux.

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être le rapporteur de cette thèse et de juger ce travail, vous en remercie grandement. Votre expérience de chirurgien nous sera très précieuse. Veuillez recevoir le témoignage de tout mon respect et de toute ma reconnaissance.

A notre juge,

Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO
Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Service de Biologie des Tumeurs-Tumorotheque,
CHU Haut Lévêque, Bordeaux

Vous me faites un grand honneur en acceptant de faire partie de ce jury de thèse, et de nous apporter votre expertise. Je vous en remercie vivement. Veuillez recevoir le témoignage de tout mon respect et de toute ma reconnaissance.

A notre juge,

Madame le Docteur Marion MARTY
Praticien Hospitalier
Service d'Anatomie Pathologie,
Hôpital Haut-Lévêque, CHU Bordeaux.

Je te remercie de me faire l'honneur de juger ce travail. J'ai beaucoup appris à tes côtés au cours de mon semestre à Haut-Lévêque grâce à tes grandes qualités de pédagogue. Merci pour ces nombreuses sessions de lectures de lames improvisées. Tu as été une formidable chef toujours très disponible pour tes internes. Je te prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A notre juge,

Monsieur le Docteur Eberhard STOECKLE

Praticien Hospitalier,

Service de Chirurgie Oncologique,

Centre de Lutte Contre le Cancer, Institut Bergonié, Bordeaux.

Vous me faites un grand honneur en acceptant de faire partie de ce jury de thèse. Je vous en remercie vivement. Votre expérience dans ce domaine nous sera précieuse. Veuillez recevoir le témoignage de tout mon respect et de toute ma reconnaissance.

A notre directrice,

Madame le Docteur Sabrina CROCE

Praticien Hospitalier,

Service d'Anatomie Pathologie,

Centre de Lutte Contre le Cancer, Institut Bergonié, Bordeaux.

Je te remercie de m'avoir fait confiance en me proposant ce travail et de m'avoir accompagnée pendant son élaboration. Tu as été une directrice merveilleuse, par ta disponibilité, tes relectures scrupuleuses et surtout ta patience, tu as su te montrer à l'écoute de mes questions. Nous avons partagé des moments d'attente et de déception, mais tu m'as toujours fait confiance. Je suis vraiment très heureuse de présenter notre travail ce jour, même si ce n'est pas du Jane Austen et fière du chemin accompli grâce à toi et ton enseignement. Je tiens à te témoigner mon profond respect et toute mon amitié.

A ceux qui ont participé à ce projet :

A Madame Véronique Brouste, pour vos précieux conseils en statistiques et votre disponibilité, vous avez pris à de nombreuses reprises le temps de corriger et de répondre à mes nombreuses questions, je vous en remercie grandement.

A Valérie Velasco, pour ton aide précieuse sur cette thèse, pour les IHC et les TMA, tes conseils, ta disponibilité, merci infiniment.

Au service de santé publique du CHU Felix Guyon, pour m'avoir guidé, aidé à de nombreuses reprises, et pour avoir pris le temps de répondre à mes questions.

A mes proches :

A mes parents, qui ont toujours été là pour moi. Merci pour tout, car il en a fallu du courage pour me supporter pendant toutes ces années. Je suis fière d'être votre fille, merci de m'avoir aidé à arriver jusque-là, et de m'avoir soutenue dans tous mes choix, même les plus difficiles.

A Piboulet, qui a été d'un soutien sans faille et avec qui il est toujours facile et agréable de discuter. Merci pour ton humour, ta bonne humeur et pour avoir pris le temps de perfectionner my british. A toi le tour maintenant.

A Huguette, pour les nombreuses fois où tu t'es occupée de nous, pour tes expressions que j'adore et ta tendresse. Merci d'être une grand-mère formidable, toujours présente et attentionnée.

A Alice, merci pour ta gentillesse, ton affection et tous ces chouettes étés passés en Lozère en ta compagnie.

A Raymonde, merci infiniment pour ta bienveillance et ton affection.

A mes oncles, tantes et cousins : Thierry et Frédérique, Bruno, Isabelle, Hugo, Clément, Théo, Romain, merci pour ces nombreux et très chouettes repas de familles en votre compagnie.

A Jib's évidemment, merci pour le soutien et l'amour que tu m'apportes tous les jours. Durant ces années on a déménagé souvent mais je me sens toujours à la maison quand tu es à mes côtés. Merci d'être toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments et de me redonner du courage quand il le faut.

A ma belle-famille : Dominique et Yann, Julien et Maud, Ana-aël et Jean-Charles, Anouk, Zélie et le futur neveu/nièce, pour leur adorable accueil et leur gentillesse, malgré mon allergie au Kouign-Amann.

Aux Claudettes bien sûr : Mélanie, Evie, Laurine, pour m'avoir permis de partager à vos côtés, les moments les plus importants de nos vies, des chagrins de la cour de récré aux mariages et naissances. 25 ans que l'on bronze sur les flaques, et vous êtes toujours là ! Sans oublier Kévin, Florent et Florian, Alice, Line et Maxime. Merci

A Joanne et Camille : jamais dans le même pays ou hémisphère mais toujours présentes.

A mes amis de fac, à ceux que la vie ou l'ECN a également emportés plus ou moins loin, je suis heureuse que vous ayez trouvé votre voie et de retrouver régulièrement la tribu (toujours plus grande).

A Lucile, Julia, Mathieu, Bruno, et aux nombreuses parties de coïncidences. Merci pour tous ces moments passés entre Bordeaux et la Réunion, je suis vraiment heureuse d'avoir passé ces années d'internat à vos côtés.

Aux bordelais, Elodie (Lolo), Bastien, Charlotte et Sylvain (sans oublier Matilda), merci pour votre accueil et toutes ces (très) bonnes soirées durant ces 2ans. Vous nous manquez.

Aux copains d'internat, Delphine, Laure Mathilde et Robin, Elodie et Jean-Eric, pour avoir partagé avec moi l'arrivée à la Réunion, cette première année d'internat et ces nombreuses randonnées.

A Pauline et Toni, pour leur amitié et les bons moments partagés.

A mes co-internes anapaths, je suis très heureuse d'avoir pu faire votre connaissance, et d'avoir eu la chance de travailler avec vous. Merci infiniment pour votre gentillesse et votre si bon accueil à bordeaux.

Aux CCA, PH, PU-PH qui m'ont transmis leur savoir au cours de mes études. Merci pour votre patience pendant les séances de correction et pour votre enseignement.

Un grand merci à tout le personnel du service d'anatomo-pathologie du CHU Felix Guyon qui de mon tout premier stage aux derniers de mon internat m'a toujours chaleureusement accueilli. Aux Dr Carla Fernandez et Dr Zoubida Laleg, pour m'avoir initié à l'anapath. Vous formez une merveilleuse équipe et je suis ravie de prolonger encore un peu cette aventure avec vous.

Pour ceux qui manquent

A Marcel, pour le nombre incalculable de pizzas imaginaires que tu as accepté de m'acheter, pour ta joie de vivre, et tous ces merveilleux souvenirs d'enfance en ta compagnie. Tu as été un grand père extraordinaire. Merci pour tout

A Emile, pour ton infinie tendresse, ton affection et ta bonne humeur.

A Henri, que j'aurais aimé mieux connaître

A Alice, pour tous ces très bons moments passés en ta compagnie en Haute Loire

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	9
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	11
1 INTRODUCTION	12
1.1 Rappel anatomique et histologique	12
1.2 Epidémiologie des cancers utérins	13
1.3 Description morphologique et immunohistochimique	16
1.3.1 <i>Formes histologiques des léiomyosarcomes</i>	16
1.3.2 <i>Critères histologiques diagnostiques</i>	17
1.3.3 <i>Profil immunohistochimique</i>	17
1.4 Évolution clinique et facteurs pronostiques	18
1.4.1 <i>Présentation clinique</i>	18
1.4.2 <i>Facteurs de risques</i>	18
1.4.3 <i>Prise en charge thérapeutique</i>	18
1.4.4 <i>Facteurs pronostiques cliniques</i>	20
1.4.5 <i>L'immunohistochimie : de nouvelles pistes ?</i>	22
1.5 Génomique des ULMS	25
1.5.1 <i>Sarcomagénèse des ULMS</i>	26
1.5.2 <i>Altérations fréquentes</i>	27
1.6 VIPR2/VPAC2	30
1.6.1 <i>VIPR2 et ULMS</i>	31
1.7 Objectifs de l'étude	32
2 MATERIEL ET METHODES	33
2.1 Sélection des cas	33
2.2 Recueil des données	33
2.3 Etude morphologique	33
2.4 Réalisation des « Tissue-MicroArrays » (TMA)	34
2.5 Protocole immunohistochimique	35
2.6 Scores immunohistochimiques	36
2.7 Extraction de l'ADN	38
2.8 Etude cytogénétique : profil génomique par hybridation génomique comparative micro-array (CGH)	38

2.9	Analyses statistiques	39
3	RESULTATS	41
3.1	Données clinico-histologiques	41
3.1.1	<i>Caractéristiques cliniques de la cohorte</i>	41
3.1.2	<i>Caractéristiques morphologiques de la cohorte</i>	43
3.2	Données immunohistochimiques et génomiques	45
3.2.1	<i>Immunohistochimies RE, RP, p16 et P53</i>	45
3.2.2	<i>Index génomique</i>	47
3.2.3	<i>l'expression immunohistochimique du VIPR2</i>	48
3.3	Analyses de survie	50
3.3.1	<i>Analyses des paramètres clinico-histologiques</i>	51
3.3.2	<i>Analyses des paramètres immunohistochimiques et génomiques</i>	52
3.3.3	<i>Expression de VIPR2</i>	53
3.3.4	<i>Analyses multivariées</i>	58
3.3.5	<i>Pour aller plus loin</i>	60
4	DISCUSSION	61
4.1	Message principal	62
4.1.1	<i>Comparaison avec la littérature</i>	63
4.1.2	<i>Forces et faiblesses :</i>	64
4.2	Messages secondaires	67
4.2.1	<i>Choix du score</i>	67
4.2.2	<i>Autres facteurs pronostiques</i>	67
4.3	Applications cliniques :	68
4.4	Conclusion :	68
	BIBLIOGRAPHIE	69
	ANNEXES	78
	Annexe 1 : Classification OMS des tumeurs du corps utérin	78
	Annexe 2 : Stadification FIGO 2009	79
	Annexe 3 : Critères histologiques de Stanford	79
	Annexe 4 : Vérification des hypothèses de la proportionnalité des risques relatifs par le test de Schoenfeld	80
	Annexe 5 : Courbes de survies des paramètres clinico-histologiques	81
	Annexe 6 : Courbes de survies des paramètres immunohistochimiques et génomiques ...	82
	Annexe 7 : Profil CGH du chromosome 7q des cas de la cohorte	83
	SERMENT D'HIPPOCRATE	84

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AC : Adenylate cyclase
CBNPC : Cancer bronchique non à petites cellules
CGH : Hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization)
CHU : Centre hospitalier universitaire
ESS : Sarcome du stroma endométrial (Endometrial stroma Sarcoma)
EULMS : Léiomyosarcome extra utérins (Extra Uterine Leiomyosarcoma)
FIGO : Fédération internationale de gynécologie et obstétrique (international Federation of Gynecology and Obstetrics)
HES : Coloration hématoxyline éosine safran
HR : Rapport de risque (Hazard ratio)
GHRH : hormone de libération de l'hormone de croissance (growth hormone-releasing hormone)
IC : indice de confiance
IM : index mitotique
LM : Léiomyome
LMS : Léiomyosarcome
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OS: Survie globale (Overall Survival)
PACAP: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PECome : Tumeur épithélioïde périvasculaire (Perivascular epithelioid cell tumor)
PFS : Survie sans progression (Progression Free Survival)
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RE : Récepteur aux Estrogènes
RP : Récepteur à la Progestérone
STUMP : Tumeur musculaire lisse à potentiel de malignité incertain (Smooth Muscle Tumors of Uncertain Malignant Potential)
SU : Sarcome Utérin
TCN: Nécrose tumorale (Tumoral Cell Necrosis)
TMA: « Tissue-MicroArrays »
TMI : Tumeur Myofibroblastique Inflammatoire
ULMS: Léiomyosarcome Utérin (Uterine Leiomyosarcoma)
UTROSCT : Tumeurs utérines ressemblant aux tumeurs ovariennes des cordons sexuels (Uterine Tumour Resembling Ovarian Sex Cord Tumour)
VIP : peptide intestinal vasoactif (vasoactive intestinal peptide)
VIPR1/VPAC1: Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1
VIPR2/VPAC2: Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 2

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Corps utérin et annexes	12
Figure 2 : Histologie du myomètre (Coloration HES, grossissement x20)	13
Figure 3 : Organigramme des tumeurs mésoenchymateuses utérines.	15
Figure 4 : Nombre médian de mutations somatiques et de copies de gène non équilibrées, pour 6 différents types histologiques de sarcomes.	25
Figure 5 : Gène et protéine VIPR2.	30
Figure 6 : Organisation des blocs de TMA et photo d'une lame de TMA.	35
Figure 7: Description de la cohorte en fonction du stade tumoral et du nombre de métastases présentées.....	41
Figure 8 : Aspects microscopiques des différents pattern histologiques de la cohorte.....	44
Figure 9 : Photo des immunomarquages p16 et p53 de la cohorte.	46
Figure 10 : Exemple de profil génomique par CGH.....	47
Figure 11 : Photos de l'immunomarquage avec l'anticorps anti-VIPR2.....	49
Figure 12 : Nuage de point : OS des patientes en fonction du Hscore.	54
Figure 13 : Histogramme : répartition de l'OS selon le Score-S.....	54
Figure 14 : Courbes de survies de l'expression immunohistochimique de VIPR2.	56
Figure 15 : Données descriptives de l'expression de VIPR2 pour le tissu tumoral et le myomètre (n=32)	57
Figure 16 : Courbes de survies de l'expression immunohistochimique de VIPR2 par rapport au myomètre.....	58
Figure 17 : Augmentation du cAMP intracellulaire par activation des récepteurs VIP/PACAP62	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux gènes mutés dans les ULMS	27
Tableau 2 : Gains chromosomiques récurrents dans les ULMS	28
Tableau 3 : Pertes chromosomiques récurrentes dans les ULMS.....	28
Tableau 4 : Principaux gènes présentant des pertes ou délétion du nombre de copies sur une série de 27 ULMS.....	29
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour l'étude immunohistochimique.	35
Tableau 6 : Score-S	37
Tableau 7 : Score immunohistochimique de l'anticorps anti-p16	37
Tableau 8 : Score immunohistochimique de l'expression de la protéine p53.....	37
Tableau 9 : Score immunohistochimique utilisés pour évaluer l'expression des récepteurs hormonaux.	38
Tableau 10 : Caractéristiques macroscopiques et histologiques des ULMS de la cohorte.....	43
Tableau 11 : Caractéristiques immunohistochimiques des ULMS de la cohorte.	45
Tableau 12 : Répartition des patientes (n=58) en fonction du GI avec un seuil à 35.	47
Tableau 13 : Test de corrélation entre le Hscore pour différent paliers et le score-S.....	48
Tableau 14 : Expression immunohistochimique du VIPR2 de la cohorte (n=59).....	48
Tableau 15 : Corrélation entre les caractéristiques clinico-histologiques et l'expression de VIPR2 évaluée avec le score-S.....	50
Tableau 16 : Analyses univariées des différents paramètre cliniques et histologiques pour l'OS et la PFS.....	51
Tableau 17 : Analyse multivariée en OS des données clinico-histologiques	52
Tableau 18 : Analyse multivariée en PFS des données clinico-histologiques	52
Tableau 19 : Analyses univariées des différents paramètre immunohistochimiques et génomique pour l'OS et la PFS.	53
Tableau 20 : Analyses univariées en OS et PFS de l'expression de VIPR2	55
Tableau 21 : Analyses univariées pour l'OS et la PFS de l'expression de VIPR2 de la tumeur par rapport au myomètre	58
Tableau 22 : Analyse multivariée en OS effectuée avec les 2 scores d'évaluation du VIPR2 (n=53)	59
Tableau 23 : Analyses multivariées en PFS (n=53)	60
Tableau 24 : Répartition des tumeurs en fonction de leur profil génomique et immunohistochimique.	60

1 INTRODUCTION

1.1 RAPPEL ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE

Le tractus génital féminin comporte les trompes, l'utérus et le vagin (**Figure 1**).

L'utérus est un organe creux, en forme de poire, composé de deux segments anatomiques distinct, le corps et le col.

Le corps utérin comporte trois tuniques :

- **L'endomètre**, tapissant la cavité utérine, est constitué d'un épithélium cylindrique simple comportant des cellules ciliées et des cellules sécrétrices. Il forme des glandes réparties au sein du stroma endométrial ou chorion cytogène.
- **Le myomètre**, formé de long faisceaux musculaires lisses entrecroisés ; Ils sont organisés en couches circulaires et longitudinales mal individualisées (**Figure 2**).
- **La séreuse**, recouvrant la partie externe de l'utérus.

Figure 1 : Corps utérin et annexes

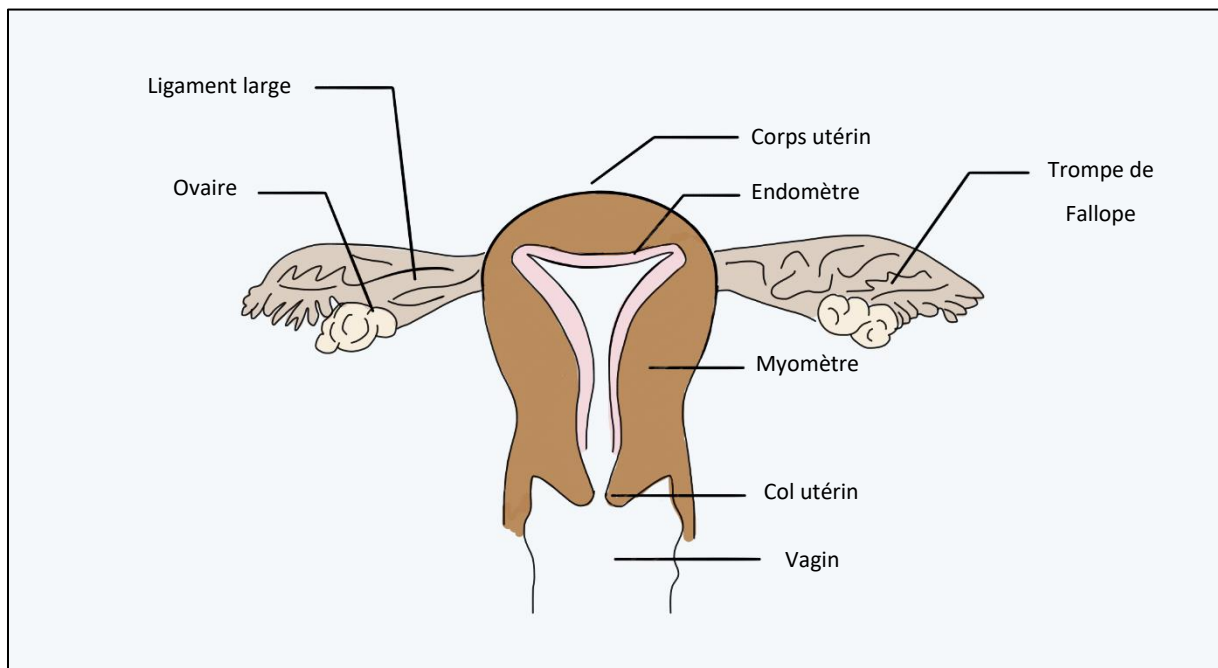
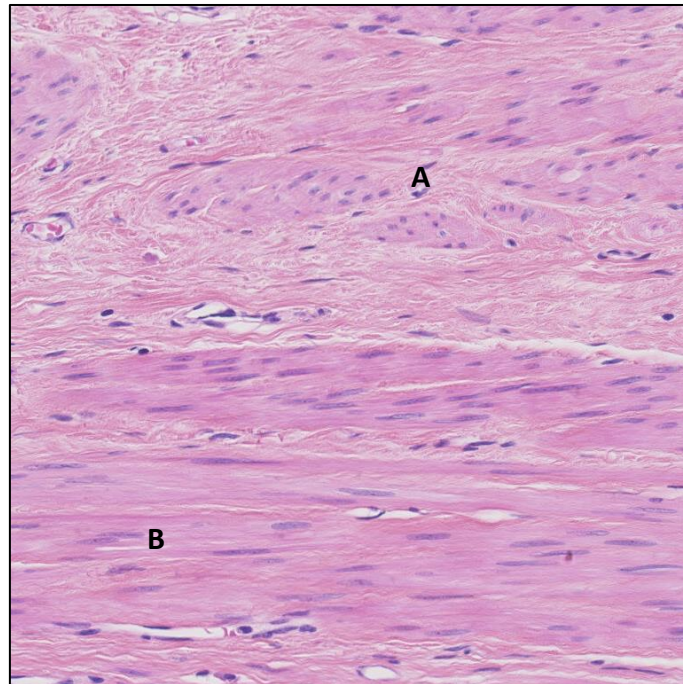


Schéma du corps l'utérin en coupe frontale (image inspirée de l'atlas d'histologie fonctionnelle de Wheeler ¹)

Figure 2 : Histologie du myomètre (Coloration HES, grossissement x20)



Fibres musculaires en coupe transversale zone A et en coupe longitudinale zone B.

1.2 EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS UTERINS

D'après les données de l'institut de veille sanitaire, le cancer du corps de l'utérus, tous types confondus, se situe au 4ème rang des cancers de la femme, avec 7275 nouveaux cas et 2025 décès en 2012 ². Il s'agit dans la majorité des cas d'adénocarcinomes.

En effet, il existe différents types de cancers utérins. Dans la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs du corps utérin, les tumeurs primitives utérines sont divisées en trois catégories selon leurs origines embryologiques ³ (ANNEXE 1) :

- Les tumeurs épithéliales (les carcinomes et leurs précurseurs),
- Les tumeurs mésenchymateuses (les sarcomes et leurs précurseurs)
- Les tumeurs d'origine mixte épithéliales et mésenchymateuses.

Les sarcomes utérins (SU), tous types confondus, sont des maladies rares. Selon la littérature ils représentent 1% de l'ensemble des tumeurs gynécologiques et 3% à 9% des tumeurs malignes utérines ^{4,5}.

Ils comprennent les sarcomes du stroma endométrial (ESS) de bas grade et de haut grade⁶, le léiomyosarcome utérin (ULMS) et les sarcomes indifférenciés.

Il existe également d'autres tumeurs mésenchymateuses plus rares (**cf Figure 3**), telles que :

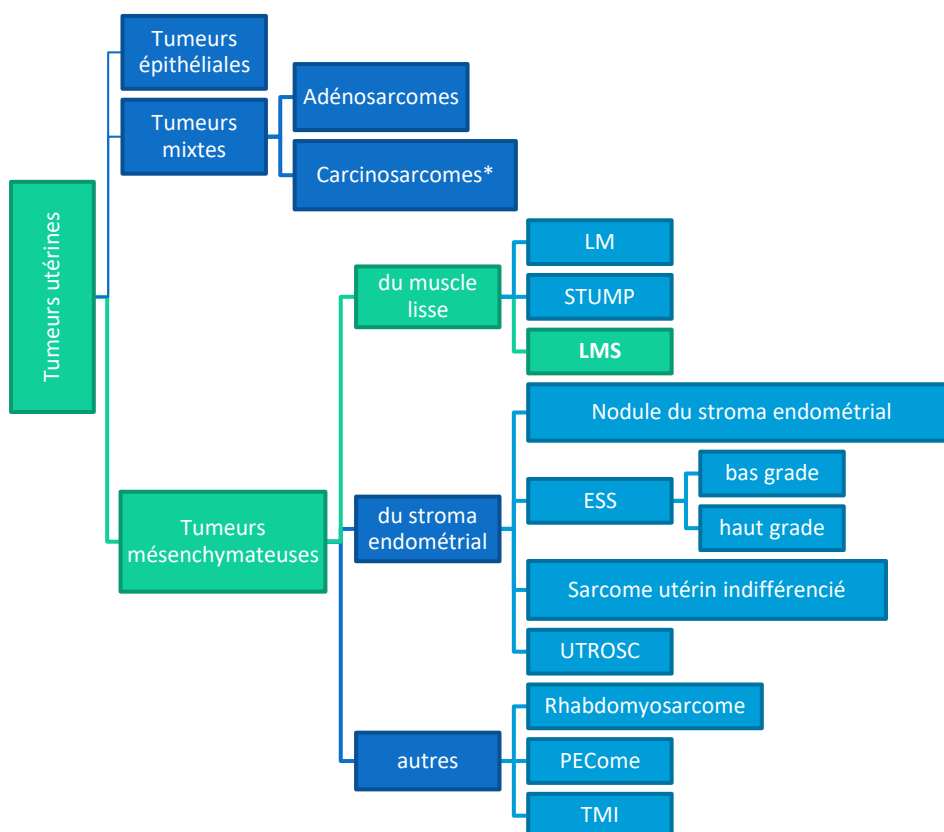
- les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires⁷ (TMI),
- les tumeurs utérines ressemblant aux tumeurs ovariennes des cordons sexuels (UTROSCT)^{8,9}, à potentiel de malignité variable
- les rhabdomyosarcomes¹⁰,
- les sarcomes alvéolaires des parties molles de pronostic péjoratif ¹¹,
- les tumeurs épithélioïdes périvasculaires (PEComes) bénignes, à potentiel de malignité incertain et malignes ^{12,13}.

Parmi les tumeurs mésenchymateuses du corps utérin, les tumeurs musculaires lisses sont les plus fréquentes, elles se définissent comme une prolifération de cellules présentant une différenciation musculaire lisse.

Elles comprennent :

- Les tumeur bénignes, léiomyomes (LM) et leurs variants dont les plus fréquents sont le LM cellulaire, LM à cellules bizarres et le LM mitotiquement actif.
- Les tumeurs à potentiel de malignité incertain (STUMP)
- Les tumeur malignes, léiomyosarcomes (LMS)

Figure 3 : Organigramme des tumeurs mésoenchymateuses utérines.



**Les carcinosarcomes sont désormais considérés comme des tumeurs épithéliales avec une transition épithélio-mésoenchymateuse.*

Le ULMS est une tumeur rare avec une incidence de 0,3 - 0,4/100000 femmes par an ^{14,15}, il représente 1 à 2% des tumeurs malignes utérines ¹⁶. Il est cependant le sarcome utérin le plus fréquent, composant 57 à 60% des sarcomes utérins, contre 20% pour l'ESS ¹⁷.

1.3 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Les ULMS se présentent majoritairement sous forme de masse isolée, avec un diamètre moyen de 10 cm, souvent intra muraux. Les contours peuvent être aussi bien réguliers (infiltration de type « pushing ») ou irréguliers et infiltrants. À la coupe, ils apparaissent rose ou gris pâle, leur texture est molle, charnue, avec des remaniements hémorragiques et nécrotiques ¹⁸.

Microscopiquement, les léiomyosarcomes (LMS) sont définis par l'OMS comme des tumeurs musculaires lisses, elles sont classées en différents sous-types, basés sur les caractéristiques cellulaires et du stroma intercellulaire ³.

1.3.1 Formes histologiques des léiomyosarcomes

Il est décrit dans la littérature trois principaux sous-type de LMS.

Le LMS à cellules fusiformes est le sous type le plus fréquent, conventionnel. Il est formé de cellules fusiformes ou pléomorphes présentant un cytoplasme éosinophile abondant et s'agencant en faisceaux entrelacés et désorganisés, se coupant à angle droit. Certaines de ces tumeurs peuvent présenter des cellules multinucléées ou de type ostéoclastique ¹⁹.

Le LMS épithélioïde est défini selon l'OMS, par la présence de cellules rondes ou polygonales qui ont une apparence histologique de cellules épithéliales, avec un cytoplasme abondant éosinophile ou plus rarement un cytoplasme clair. Ces cellules peuvent s'agencer parfois en cordons ou en nids. Pour porter le diagnostic de LMS épithélioïde, la tumeur doit comporter au moins 50% de cellules à différenciation épithélioïde ¹⁸.

Le LMS myxoïde se distingue des deux autres sous-types par un abondant stroma myxoïde souligné par la coloration Bleu Alcian et une faible cellularité entraînant un index mitotique (IM) plus faible. Les cellules tumorales sont ovalaires ou en étoile avec un cytoplasme peu visible. Ces caractéristiques rendent le diagnostic de malignité plus compliqué ²⁰.

1.3.2 Critères histologiques diagnostiques

Pour les LMS conventionnels, les critères diagnostiques utilisés et reconnus par l'OMS 2003 et l'OMS 2014, sont les critères de Stanford ([ANNEXE 3](#))²¹.

Ils comprennent les atypies cytonucléaires, l'IM et la nécrose tumorale (TNC).

Les atypies cytonucléaires sont évaluées au grossissement x 10, elles comprennent la présence de pléomorphisme nucléaire, l'anisocaryose, les nucléoles et l'hyperchromatisme nucléaire.

L'IM nécessaire pour catégoriser la tumeur comme maligne est différent selon le sous type tumoral :

- LMS à cellules fusiformes : ≥ 10 mitoses/10 champs au fort grossissement²²
- LMS épithélioïde : ≥ 4 mitoses/10 champs au fort grossissement^{22,23}.
- LMS myxoïde : ≥ 2 mitoses / 10 champs au fort grossissement¹⁸⁻²⁰

Le troisième critère histologique est représenté par la TNC qui est retrouvée dans 80% des LMS¹⁸. Elle doit être différenciée de la nécrose vasculaire ou hyaline qui peut être également présente dans les léiomyomes. Elle est caractérisée par une coupure nette, abrupte entre les zones viables et les zones nécrotiques, sans présence de zone de transition. On note également la présence de cellules atypiques fantomatiques au sein des plages de nécrose ou en anneau autour des vaisseaux dans la nécrose.

L'équipe de Lim et al²⁴ a étudiée la variabilité inter observateur de l'interprétation de la TNC, en faisant relire 34 cas de LMS par 6 anatomopathologistes experts afin de catégoriser la nécrose en TNC, nécrose non tumorale (noTNC) ou en indéterminée pour TNC. Dans 18% des cas il n'y avait pas de consensus et dans 47% un consensus partiel. Malgré cette définition, la nécrose reste donc un critère subjectif, laissant place à l'interprétation.

1.3.3 Profil immunohistochimique

Les léiomyosarcomes utérins présentent un phénotype immunohistochimique musculaire lisse. Ils expriment de façon variable la desmine, la transgeline, l'actine musculaire lisse et la h-caldesmone. Ce profil immunohistochimique peut être incomplet pour les LMS épithélioïdes ou myxoïdes, c'est-à-dire que l'expression peut être faible et/ou focale. Les LMS d'origine

utérine expriment également dans 30-40% des cas les récepteurs hormonaux tels que les récepteurs aux œstrogènes (RE), à la progestérone (RP) et les récepteurs aux androgènes^{18,25,26}.

1.4 ÉVOLUTION CLINIQUE ET FACTEURS PRONOSTIQUES

1.4.1 Présentation clinique

Les ULMS surviennent principalement en période péri et post-ménopausique, l'âge moyen au diagnostic étant compris entre 52 et 57 ans^{17,25,27}.

Les patientes sont majoritairement asymptomatiques. Les ULMS peuvent être de découverte fortuite au cours d'une hystérectomie pour LM. Selon la littérature ils représentent entre 0,002% et 0,66% des prélèvements envoyés pour LM²⁸⁻³⁰.

Ils peuvent également être révélés par des signes cliniques, qui restent peu spécifiques, identiques à ceux des LM ce qui rend leur diagnostic pré opératoire difficile¹⁸. Les symptômes les plus fréquents sont des métrorragies (56%) , une masse pelvienne (54%) ou des douleurs pelviennes (22%)¹⁶.

1.4.2 Facteurs de risques

Les facteurs de risque supposés des ULMS sont l'obésité, l'hormonothérapie substitutive, un traitement par Tamoxifène, la contraception oestroprogestative et l'origine ethnique (population afro-américaine)^{15,31,32}. L'irradiation pelvienne, facteur de risque reconnu des carcinosarcomes, n'a pas été démontrée pour les ULMS mais reste un facteur de risque supposé²⁵.

1.4.3 Prise en charge thérapeutique

1.4.3.1 Traitement chirurgical

Concernant les ULMS de stade localisés, l'hystérectomie totale monobloc avec exérèse complète de la tumeur, est le traitement de référence³⁰.

En effet, une résection tumorale incomplète est un facteur de mauvais pronostic ³³. Pour les patientes dont le diagnostic de ULMS a été fait après une myomectomie, une reprise chirurgicale avec exérèse complète est recommandée ^{30,33}.

Le rôle de l'annexectomie bilatérale est encore controversé, des études n'ayant pas prouvé son intérêt pronostic ^{33,34}. Elle n'est pas systématique et la conservation des ovaires peut être proposée pour les patientes non ménopausées et présentant une tumeur limitée à l'utérus ³⁵.

Le curage ganglionnaire n'est pas effectué de façon systématique, du fait du faible taux de métastases ganglionnaire des LMS (5-7,3%) ^{30,33}. Il doit cependant être fait s'il y a des adénopathies suspectes à l'imagerie ³⁶.

1.4.3.2 Place de la chimiothérapie

Le rôle de la chimiothérapie adjuvante pour les tumeurs de stades précoces n'a pas démontré pour l'instant de bénéfice clair et doit être discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) ³⁷.

En phase métastatique et pour les stades avancés, elle a montré un intérêt sur la survie globale même si celle-ci reste faible ³³. Les chimiothérapies les plus utilisées sont des molécules cytotoxiques ³⁰ :

- Doxorubicine ± isofosfamine
- gemcitabine ± docétaxel

Les taux de réponses à ces thérapies sont faibles allant de 19 à 32% selon les études ³⁰.

C'est pourquoi, ces dernières années des études menées sur des thérapies ciblées, telles que le pazopanib, le trabectedin ou encore l'hormonothérapie ont été menées. Ces molécules peuvent être administrée en 2^{nde} ligne de traitement en association avec les thérapies cytotoxiques. Cependant elles montrent également de faibles taux de réponse ³⁰.

1.4.3.3 Place de la radiothérapie

Du fait de la grande proportion de rechute à distance, la radiothérapie loco-régionale adjuvante, bien que présentant un effet sur les rechutes locales, ne montre pas, selon les études, d'impact sur la survie. Son indication doit être discutée au cas par cas, en RCP ^{30,33,38}.

Malgré ces thérapeutiques, les ULMS restent donc des tumeurs agressives et de mauvais pronostic, présentant majoritairement une radio et chimio résistance. Même lors d'une prise en charge précoce le taux de récurrence est de 53% à 71%, avec un taux de survie à 5 ans de 41,3% à 51% ^{16,27,39}. Il n'existe pas à ce jour de traitement permettant l'amélioration significative du pronostic.

1.4.4 Facteurs pronostiques cliniques

Le principal facteur pronostique est le stade tumoral. Le système historiquement utilisé était la classification modifiée de la fédération internationale de gynécologie obstétrique (FIGO) des adénocarcinomes utérins.

Kapp et al³⁴ en 2008, ont montré que le stade était un facteur pronostique indépendant pour la survie globale (OS) ($p=0,001$). Abeler et al¹⁷ en 2009 et Gadducci et al⁴⁰ en 2011 ont montré que le stade tumoral était le facteur pronostique le plus fort pour les SU, avec une survie à 5 ans de 50-55% pour les stades I et 25% pour le stade II, 8-12% pour les autres stades.

Cependant Zivanovic et al⁴¹ en 2009 ont comparé la stadification FIGO modifiée et le système de staging de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) sur une série de 219 ULMS. Dans cette étude, ils montrent que les systèmes FIGO et de l'AJCC présentent des index de concordance (IC) sensiblement identiques pour la survie sans progression (PFS) (respectivement IC 0,6 et IC 0,596) et l'OS (IC 0,62 et IC 0,633). Le stade de l'AJCC dans cette étude apparaît plus sensible pour identifier les patients avec un meilleur pronostic, alors que le système de stadification FIGO l'est pour les patients de stades avancés. Cependant aucun des deux systèmes n'apparaît assez complet dans cette série pour effectuer une estimation fiable de la PFS ou de l'OS.

En 2009 la FIGO a établi un nouveau système de stadification pour les sarcomes utérins qui est actuellement le système le plus utilisé ⁴² ([ANNEXE 2](#)).

Giuntoli et al ⁴³ en 2013 l'ont comparé à la classification FIGO 1988 modifiée, à celle de l'AJCC ainsi qu'à un nouveau système sur 244 ULMS. En se basant sur l'IC de leur série, le système de l'AJCC et leur nouvelle stadification apparaissent plus performants.

Les autres facteurs décrits dans la littérature ne sont pas consensuels, ils comprennent :

- La taille tumorale
- Le grade
- L'index mitotique (IM)
- L'âge

L'équipe d'Abeler et al en 2009 a retrouvé en analyse univariée et multivariée sur une série de 259 ULMS, deux facteurs pronostiques indépendants : la taille tumorale et l'IM.

La taille tumorale est un paramètre clinique important, actuellement intégré à la stadification FIGO 2009. D'après l'étude d'Abeler et al, elle a une influence sur le taux de survie à 5 ans. Les patientes avec une tumeur < 5cm présentaient un taux de survie à 5 ans de 64%, celles avec une tumeur de 5 à 10 cm de 56.4%, et ce taux chute à 29,3% pour les patientes avec une tumeur mesurant plus de 10 cm. En analyse multivariée la taille tumorale avec un seuil à 10 cm était un facteur pronostique indépendant fort ($P < 0.001$) ¹⁷. Selon d'autres études, des seuils à 5 cm ou 8cm ont également montré une valeur pronostique ^{33,44,45}.

Les patientes avec un IM de 0–5, 6–10, 11–15, 16–20 et >20 / 10 champs au fort grossissement présentaient également des taux de survie à 5 ans différents, variant de 73%, 60%, 48%, 48% à 23%, respectivement ¹⁷.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de grade histologique reconnu pour les sarcomes utérins. Le grade FNLCC validé pour les sarcomes des tissus mous prenant en compte la différenciation, la nécrose et l'index mitotique, n'est pas adapté aux SU. En effet, le diagnostic des ULMS d'après les critères de Stanford, en fait par définition des tumeurs de haut grade. Pautier et al ont démontré que le score FNLCC ne convenait pas aux SU y compris les ULMS. Dans leur série également seul l'index mitotique était significativement lié à la PFS et OS ⁴⁶.

L'âge est aussi considéré comme pronostique, bien que ce soit encore controversé. Dans de nombreuses études, il est associé à un pronostic plus péjoratif si $\geq$ à 51 ans ou $>$ 54 ans ^{34,44,45}. D'autres études ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les groupes d'âges différents ⁴⁶.

En 2012, un nomogramme (Zivanovic et al) prédisant la probabilité de survie globale à 5 ans a été publié, il constitue actuellement un outil utile pour évaluer le risque de rechute et adapter les traitements ⁴⁷.

Il reprend les facteurs pronostiques cliniques connus tels que l'âge, la taille tumorale, le grade tumoral (en sachant que les critères histologiques diagnostiques des LMS les classent en haut grade), l'envahissement du col utérin, les localisations à distance et l'index mitotique. Ce nomogramme a été validé sur une série indépendante, par une autre étude publiée par Iasonos et al ⁴⁸.

1.4.5 L'immunohistochimie : de nouvelles pistes ?

1.4.5.1 Récepteurs hormonaux

Les récepteurs hormonaux, positifs dans de nombreuses tumeurs gynécologiques, sont retrouvés dans 30-60% ULMS ^{49,50}, ce qui parfois peut aider à différencier ULMS d'un LMS des tissus mous.

Il a également été montré que les ULMS expriment moins les RP que les LM ou STUMP, pouvant ainsi aider dans les cas où le diagnostic de malignité est difficile ^{51,52}. Néanmoins, l'étude qui portait sur 26 cas montre ses limites en pratique diagnostique quotidienne car presque la moitié des ULMS expriment les RE et RP.

Quelques études se sont donc penchées sur le lien entre l'expression des récepteurs hormonaux et le pronostic des LMS utérins : même si certaines ne retrouvent pas d'association entre leur expression et la survie ⁵⁰, d'autres présentent des résultats encourageants.

Les équipes de Leitao et al ont retrouvé en 2004 sur une série de 25 ULMS une association significative entre l'expression des RP et la PFS. Du fait d'un petit nombre de cas ils n'ont pas pu mettre en évidence de lien entre l'expression des RP et RE et l'OS ⁵³.

En 2012, dans une autre série de 43 patientes, le même centre (MSKK de New York) a montré en univarié que l'expression des RP était associée à la PFS ($p=0,002$) et à l'OS ($p=0,03$). Après ajustement sur le stade, l'expression des RP et RE étaient associée à la PFS, seuls les RP étaient également associés à l'OS ($p=0,05$)⁵⁴.

Ces résultats vont dans le sens de l'étude de Akhan et al qui supposait qu'une expression positive des RE et RP était associée à un meilleur pronostic ⁴⁹.

Plus récemment une étude menée par l'équipe de Davidson et al, sur 147 ULMS de stade FIGO I, a retrouvé une association ($p=0,042$) entre l'expression des RP et une OS plus longue : en analyse multivariée l'expression de RP ressortait comme facteur pronostique indépendant ⁵⁵.

1.4.5.2 P16

La protéine p16 (p16) est une protéine suppresseur de tumeur codée par le gène CDKN2A. Elle agit comme inhibiteur du complexe CDK4-cycline D, contrôlant le passage de la phase G1 à la phase S des cellules. Elle est aussi un marqueur de sénescence cellulaire ^{56,57}.

Cette protéine est impliquée dans la carcinogénèse de nombreuses tumeurs gynécologiques par des mécanismes d'action différents ^{58,59}.

Des équipes ont testé l'expression de la protéine 16 (p16) sur les ULMS. Son accumulation a été retrouvée dans 57 à 100 % des ULMS, elle apparait également significativement plus exprimée dans les ULMS par rapport aux STUMP et LM ⁶⁰⁻⁶³, ce qui en fait une aide dans le diagnostic des différents types de tumeurs utérines musculaires lisses. Pour certaines de ces études, dans un second temps un lien entre l'expression de la p16 et la survie a été recherché, sans qu'une association significative soit retrouvée ^{60,64}.

En 2015, l'équipe de Kanayama et al, a montré une association entre sa surexpression sur 17 ULMS, et des PFS et OS raccourcies ⁶¹.

La méta analyse menée par l'équipe de Cao et al, conclue également à une association entre la surexpression de la p16 et un taux de récurrence plus élevé ⁶⁵. Ces résultats sont encourageants et méritent d'être complétés.

Néanmoins, son utilisation dans la pratique diagnostique rencontre de nombreuses limitations, surtout liées au fait que la p16 est également un marqueur de sénescence cellulaire, qui est activé dans les situations de stress. Une étude récente a démontré une forte expression de la protéine p16 dans les LM associés à une nécrose ischémique ⁵⁷.

1.4.5.3 TP53

La protéine p53 (p53) impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire en cas de dommage sur l'ADN, est une protéine « suppresseur de tumeur ». Le gène *TP53* codant la p53 est fréquemment muté dans de nombreux types de cancers. Sa mutation entraîne soit une accumulation de la protéine p53 soit une totale absence d'expression ^{66,67}.

Comme pour la p16, cette mutation est plus fréquente dans les LMS que dans les autres tumeurs musculaires lisses utérines telles que les STUMP ou les LM ⁵¹.

De nombreuses études s'intéressent à la valeur prédictive dans les LMS de l'expression de p53, mais souvent indépendamment du statut mutationnel de *TP53*. Elles présentent des résultats variables : certains n'ont pas montré de valeur pronostique de l'expression de p53 ⁴⁹ alors que d'autres montrent une association avec le taux de récurrence ou avec la survie ⁶⁸⁻⁷⁰.

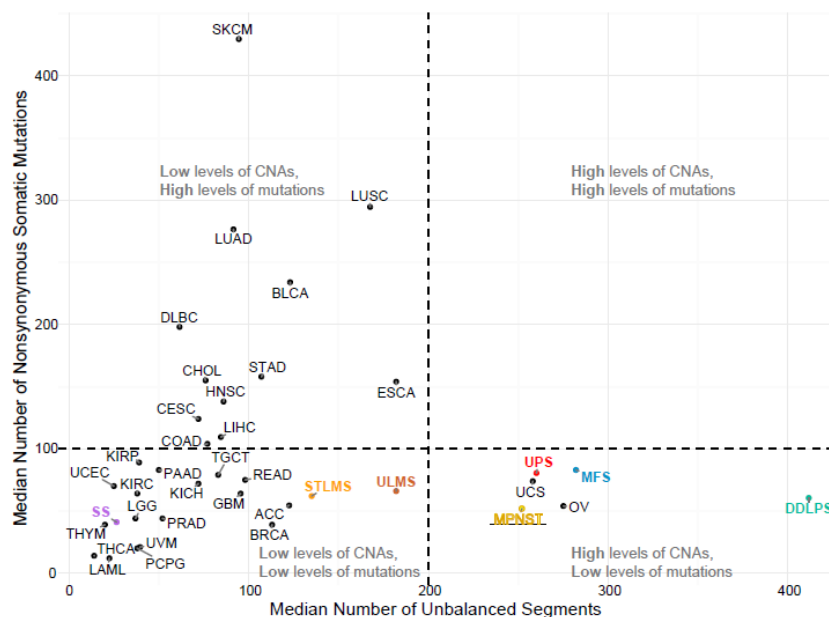
1.5 GENOMIQUE DES ULMS

Sur le plan génomique les sarcomes sont groupés en deux catégories ⁷¹.

- **Les sarcomes à génomique simple** présentant des anomalies génétiques uniques et récurrentes.
- **Les sarcomes à génomique complexe** qui sont caractérisés par une forte instabilité génomique, elle-même caractérisée principalement par des changements du nombre de copies de gènes, avec de faibles charges mutationnelles et seulement quelques gènes tels que *TP53*, *ATRX*, *RB1* hautement mutés selon le type de sarcomes⁷¹ (cf **Figure 4**).

Ces derniers sont les plus fréquents et représentent environ 2/3 des sarcomes ⁷². Les ULMS appartiennent à cette catégorie.

Figure 4 : Nombre médian de mutations somatiques et de copies de gène non équilibrées, pour 6 différents types histologiques de sarcomes.



Selon les données TCGA récemment publiées, les ULMS montrent un bas niveau de variation de nombre de copies géniques et de mutation somatiques. Graphique extrait de Abeshouse et al (2017)⁷¹

SS=sarcome synovial, STLMS=léiomyosarcome des tissus mous, ULMS=léiomyosarcomes utérins, UPS=sarcome pléomorphe indifférencié MFS=myxofibrosarcome, DDPLS= liposarcome dédifférencié, MPNST=tumeur maligne des gaines des nerfs périphériques.

1.5.1 Sarcomagénèse des ULMS

1.5.1.1 *ULMS apparition de novo ?*

La relation entre les LM et leurs composantes malignes (STUMP/LMS), est mal connue. Les LMS sont actuellement considérés comme des tumeurs apparaissant de novo et l'idée d'une transformation maligne d'un LM est encore controversée.

En 2013, une étude, comparant le profil immunohistochimique et génomique de ULMS présentant des aires d'allure sarcomateuses et des aires d'allure léiomyomateuses, a montré que ces zones présentent un profil immunohistochimique et génomique similaire. Les aberrations génétiques retrouvées dans les aires leiomyomateuses étaient également retrouvées dans les zones sarcomateuses ⁷³.

D'autres études ont montré que les mutation du gène MED12, retrouvées dans 66 à 70 % des LM sont également présentes dans 20 à 21 % des ULMS, laissant supposer que les LM et certain LMS partagent des mécanismes de génèse ⁷⁴⁻⁷⁶.

On retrouve aussi quelques cas de LMS développés à partir de LM décrits dans la littérature ^{77,78}. Ces éléments nous font supposer que certains ULMS peuvent survenir à partir de LM.

Cependant, du fait de la fréquence importante de survenue des LM et de la rareté des LMS utérins, les LM ne sont pas considérés comme des précurseurs des STUMP ou LMS.

1.5.1.2 *LMS utérins et extras utérins : une génomique différente ?*

Les LMS ont été catégorisés en 3 sous-types moléculaires (de I à III) en fonction de leur expression génique ^{79,80}.

Bien que les ULMS et les léiomyosarcomes extra utérins (EULMS) présentent de nombreuses similarités histologiques et moléculaires, les ULMS apparaissent équitablement répartis entre les différents sous-types avec une association significative pour le sous type III ($p=0,0005$), alors que les LMS extra-utérins eux sont essentiellement répartis dans les sous types moléculaires I et II ^{71,80}.

Différentes études se sont aussi intéressées aux altérations du gène *MED12* localisé sur le bras long du chromosome X (Xq13.1) dans les tumeurs mésenchymateuses utérines. En se

complexant avec MED13, CDK8 et la cycline C, la protéine MED12 joue un rôle dans la régulation de la transcription. Des mutations ponctuelles situées au niveau de l'intron 1 et de l'exon 2 de *MED12* ont été décrites en proportions différentes selon la localisation des tumeurs musculaires lisses. Elles sont décrites dans 66,6-70% des LM utérin, 20-30% des ULMS et dans 0% des LM extra utérins, 0-4% de LMS extra utérins ^{74,75}.

Il est également décrit une différence significative de la méthylation et de l'expression des micros ARN entre les EULMS et les ULMS ⁷¹.

Ces résultats corroborent l'hypothèse que les ULMS présentent une génomique et une sarcomagénèse différente des LMS extra utérins.

1.5.2 Altérations fréquentes

Les gènes les plus fréquemment altérés, quel que soit le mécanisme, dans les ULMS sont *TP53* (92%), *RB1* (88%), *PTEN* (75%) ⁸¹.

1.5.2.1 Mutations

Les principaux gènes retrouvés mutés d'après la littérature sont résumés dans le (**Tableau 1**)

Tableau 1 : Principaux gènes mutés dans les ULMS

Gène muté	Localisation du gène	Fréquence dans les ULMS	Référence bibliographique
<i>TP53</i>	17p13.1	33-44%	71,74,81
<i>MED12</i>	Xq13.1	7-30%	81,82
<i>ATRX</i>	Xq21.1	22-26%	71,74
<i>FSIP2</i>	2q32.1	21%	74
<i>EIF 3A</i>	10q26.11	16,7%	81
<i>IGF2R</i>	6q25.3	12,5%	81
<i>ABL1</i>	9q34.12	12,5%	81
<i>ABCA13</i>	7p13.1	16%	74
<i>ANKRD26</i>	10q23.31	16%	74
<i>PTEN</i>	10q23.31	0-5%	71,83
<i>RB1</i>	13q14	3,7 %	71

1.5.2.2 Variations du nombre de copies géniques

L'hybridation génomique comparative, également appelée *Array comparative genomic hybridization* (CGH) est une technique de cytogénétique sur puces permettant la détection des variations du nombre de copie génomique entre un ADN tumoral et un ADN témoin ⁸⁴. Cette technique a permis d'évaluer les régions récurrentes avec pertes et gains chromosomiques dans les ULMS. Les données de la littérature sont résumées dans les **Tableaux 2 et 3**.

Tableau 2 : Gains chromosomiques récurrents dans les ULMS

Régions récurrentes avec gain chromosomique	Références bibliographiques
1p, 5q, 7q, 8q	85
17p (38%), Xp (33%), 1q (33%)	86
7q, 12q	87

Tableau 3 : Pertes chromosomiques récurrentes dans les ULMS

Régions récurrentes avec perte chromosomique	Références bibliographiques
1p, 2p, 2q, 5q, 6p, 10q, 11p, 11q, 13q, 14q, 15q, 16q, 20p, 21q.	85
13q (76%), 10q (62%), 16q (38%), 12p (33%), 2p (43%).	86
1p, 2p, 6p, 9p, 14q	87

En 2017, Abeshouse et al ⁷¹ ont analysé 206 sarcomes dont 27 ULMS. Dans cette série d'ULMS, les principaux gènes présentant des délétions étaient : *RB1* (88,9%), *PTEN* (70,3%), *TP53* (55,5%), *ATRX* (66,7%) et *HDLBP* (62,9%), les données sont résumées dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Principaux gènes présentant des pertes ou délétion du nombre de copies sur une série de 27 ULMS.

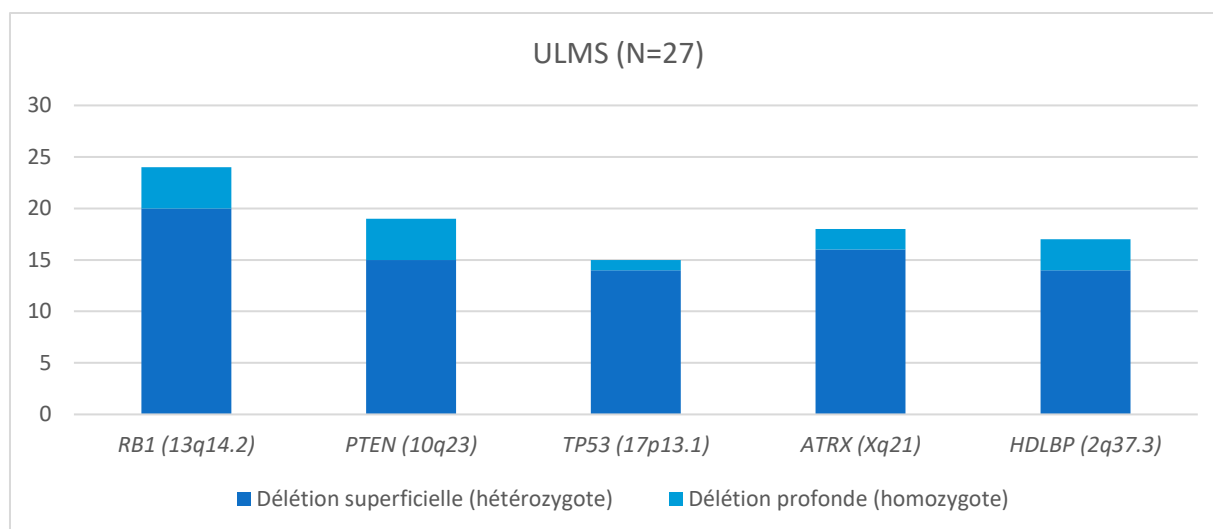


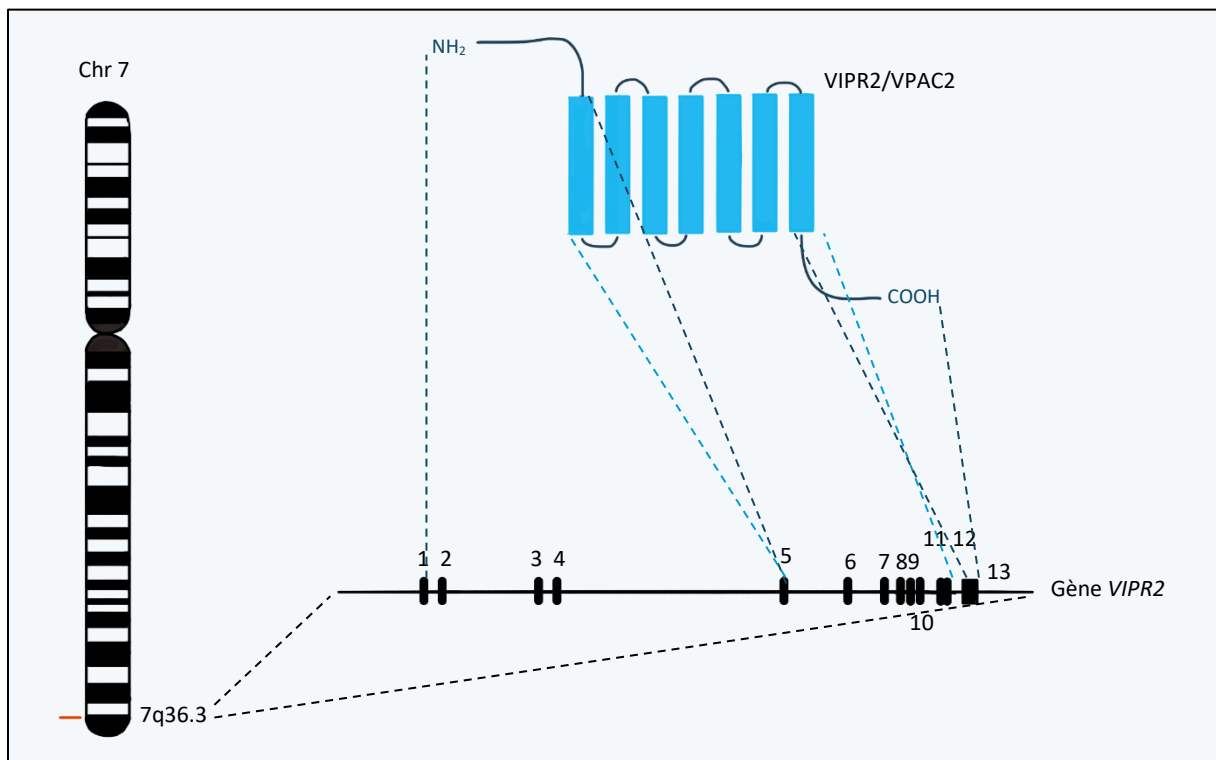
Tableau réalisé d'après Abeshouse et al⁷¹

En 2015, Croce avec l'équipe de Chibon a testé l'hypothèse selon laquelle le profil génomique des lésions mésenchymateuses musculaires lisses utérines permettrait de classer les STUMP en tumeurs bénignes ou malignes. Pour cela un index génomique (GI) a été calculé après réalisation de CGH array pour 29 cas de STUMP, 10 cas témoins de LM et 10 cas témoins de LMS, tel que $GI = A^2/C$, avec A étant le nombre de gains et de pertes, C correspondant au nombre de chromosomes impliqués. L'index génomique permettait de classer les STUMP en LMS si ≥ 10 ou en lésion bénignes si < 10 ⁸⁸. Dans une seconde étude un GI ≥ 35 était corrélé à une survie globale raccourcie pour les ULMS⁸⁹.

1.6 VIPR2/VPAC2

Le gène VIPR2 est situé sur le chromosome 7q36.3 et comprend 13 exons. Il code pour un récepteur transmembranaire heptahélicoïque nommé VIPR2 ou VPAC2 (**Figure 5**)⁹⁰.

Figure 5 : Gène et protéine VIPR2.



A gauche le chromosome 7 avec la position en 7q36.3 du gène VIPR2. En bas schématisation du gène VIPR2 comportant 13 exons. Les exons 1 à 5 codent pour l'extrémité extra cellulaire de VIPR2, les exons 5 à 12 codent pour les 7 domaines transmembranaires hélicoïdaux et l'exon 13 code pour la partie terminale intracytoplasmique. En haut schématisation de VIPR2. Schéma réalisé d'après "Structure of the human VIPR2 gene for vasoactive intestinal peptide receptor type 2"⁹⁰.

Il appartient à une famille de 3 récepteurs : VIPR1/ VPAC1, VIPR2/VPAC2 et PAC1.

Ces récepteurs, couplés à la protéine G, permettent de médier l'action de deux peptides homologues à 67% et appartenant à une même famille d'hormones, qui comprend entre autres la sécrétine, le glucagon et l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH) :

- **Le peptide vasoactif intestinal (VIP)**, qui est composé de 28 amino-acides. Il est retrouvé principalement dans le tube digestif, dans les muscles lisses, le système

nerveux central et périphérique. Il serait impliqué dans le contrôle du rythme circadien, l'anxiété, la réponse au stress, la schizophrénie ainsi que dans la sécrétion d'insuline et de catécholamines et dans la myorelaxation musculaire lisse ⁹¹⁻⁹³.

- **Le pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)**, qui comprend deux formes, le PACAP-27 et PACAP-38 présentant 68% d'acides aminés homologues au VIP. Egalement présent dans le SNC et le SNP, il aurait aussi un rôle dans le contrôle du rythme circadien mais également dans la thermorégulation, le contrôle du métabolisme, la régulation des graisses et les réponses psychomotrices ⁹².

Les récepteurs VPAC1 (ou VIPR1) et VPAC2 (ou VIPR2) présentent une meilleure affinité pour le VIP et le récepteur PAC1 présente une meilleure affinité pour PACAP ⁹².

Ces récepteurs sont comme pour leurs ligands, retrouvés dans de nombreux tissus normaux et tumeurs chez l'Homme. Le VIPR1 est le récepteur le plus fréquent au niveau du tissu digestif, pulmonaire, mammaire, urothélial, pancréatique et lymphocytaire, il est également retrouvé dans les tumeurs dérivées de ces tissus. Le PAC1 est retrouvé dans la médullosurrénale et dans les glandes endométriales ainsi que dans différentes tumeurs : les paragangliomes, phéochromocytomes et carcinomes de l'endomètre ⁹¹.

Le VIPR2 quant à lui est plus exprimé dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, du myomètre ou du parenchyme prostatique, il a également été retrouvé dans les LM ⁹⁴. Son activation agit sur la myorelaxation et sur la vasodilatation, une implication dans le contrôle du rythme circadien et un rôle dans la schizophrénie ont également été décrit ^{92,95}.

1.6.1 VIPR2 et ULMS

En 2017, Cuppens T a analysé dans une série de 84 ULMS, l'association entre la survie globale des patientes et les évènements géniques (pertes, gains, mutations)⁸¹. Le gène codant VIPR2 était le gène le plus affecté dans la série (96%), la délétion de VIPR2 étant significativement associée à une diminution du temps de survie globale ($p=1,2 \times 10^{-2}$, Hazard ratio (HR) = 4,5, IC = 1,4-14,3). Cuppens T a émis l'hypothèse que VIPR2 pouvait être impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses et en stimulant VIPR2 par l'intermédiaire du VIP, a remarqué une diminution de la prolifération cellulaire de façon dose dépendante ⁸¹. La validation immunohistochimique des données obtenues par NGS a été réalisée sur 17 ULMS

de la série, dans notre département, dont pour 5/17 le myomètre sain était disponible. Dix sur dix-sept ULMS et 4/5 myomètres présentaient un marquage VIPR2 positif.

1.7 OBJECTIFS DE L'ETUDE

Du fait de leur rareté les ULMS restent des tumeurs encore mal connues.

Les facteurs pronostiques des ULMS sont mal définis et il n'existe pas encore de traitement médical complémentaire permettant une amélioration significative de la survie.

Dans ce contexte, et avec la mise en évidence récente d'un lien entre le VIPR2, qui pourrait être une potentielle cible actionnable, et les ULMS, nous avons voulu étudier le rôle pronostique de l'expression protéique de VIPR2 en immunohistochimie sur une série de 59 ULMS.

Nous avons également voulu l'évaluer par rapport aux facteurs pronostiques déjà décrits en littérature, tels que le stade, l'IM, les atypies, la nécrose, l'expression des récepteur hormonaux, l'expression de la p16 et p53 ainsi que l'index génomique.

A notre connaissance cette étude est la première à chercher le lien entre VIPR2 et la survie dans les ULMS sur une série conséquente par l'étude de l'expression protéique (IHC).

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 SELECTION DES CAS

Pour cette étude rétrospective nous avons sélectionné 53 tumeurs musculaires lisses utérines initialement diagnostiquées comme ULMS (selon les critères de Stanford et OMS 2014) et 6 STUMP avec un Index Génomique (GI) ≥ 10 pour un total de 59 patientes.

Les cas de STUMP et LMS proviennent de deux études multicentriques (centres français, belges et suisses) préliminaires^{88,89}. Les cas pour lesquels le matériel tumoral disponible était insuffisant ou de mauvaise qualité ont été exclus.

La série était ainsi constituée de 36 cas provenant de l'institut Bergonié (Bordeaux), 9 cas des Hôpitaux Universitaires de Lausanne, 8 cas du centre Oscar Lambret (Lille), 3 cas de l'hôpital de la Croix Rousse (Lyon), 2 cas du Centre Hospitalier universitaire (CHU) de Montpellier et 1 cas provient de l'université libre de Bruxelles.

2.2 RECUEIL DES DONNEES

Les données concernant le suivi des patientes, l'âge, la date du diagnostic, la taille tumorale ainsi que les données macroscopiques, la prise en charge thérapeutique et le suivi ont été recueillies.

Les tumeurs ont été diagnostiquées entre 1977 et 2011. Le stade tumoral a été établi pour toutes les tumeurs selon la classification FIGO 2009 ([ANNEXE 2](#)).

2.3 ETUDE MORPHOLOGIQUE

Pour trois cas les échantillons tumoraux étaient fixés en Bouin, les 56 autres étaient fixés en formol neutre tamponné.

Les prélèvements parvenus inclus en paraffine ont été analysés après réalisation de coupes histologiques et coloration HES (hématoxyline, éosine, safran).

Tous les cas ont été relus par deux pathologistes (le Dr Croce S. et Mme Philip M.).

Pour chaque cas, en fonction du pattern histologique identifié, les critères nécessaires au diagnostic de LMS étaient évalués à nouveau. Pour les ULMS à cellules fusiformes ils étaient évalués selon les critères de Stanford ([ANNEXE 3](#)), avec pour les LMS épithélioïdes un seuil ≥ 4 mitoses /10 champs pour l'IM et ≥ 2 mitoses/10 champs pour les LMS myxoïdes^{20,22}.

L'IM a été calculé au fort grossissement (objectif x40) pour tous les prélèvements. Les atypies nucléaires ont été évaluées à l'objectif x10 et classées en absent = 0 ; légères = 1; modérées = 2 et marquées = 3^{46,55}. Pour les cas dont seul 1 bloc de paraffine a été reçu, s'il y avait une différence significative entre l'IM recompté et celui renseigné par le pathologiste d'origine en faveur de celui-ci, l'IM d'origine était conservé. La TNC a été évaluée, et définie par la présence d'aires nécrotiques d'apparition abrupte, sans zones de transitions^{22,24}.

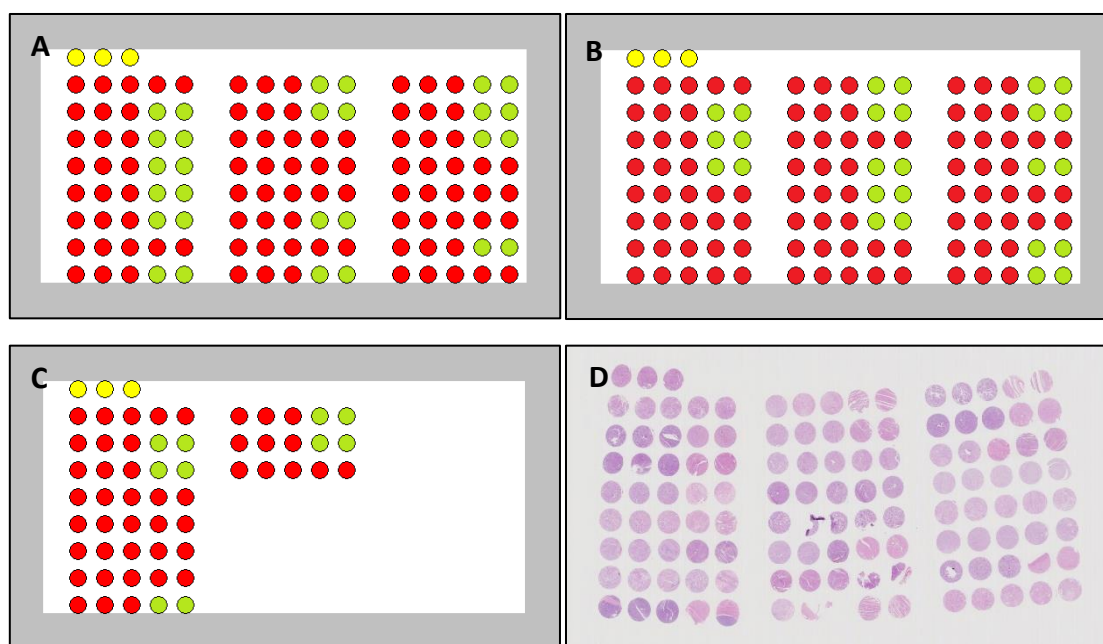
2.4 REALISATION DES « TISSUE-MICROARRAYS » (TMA)

Tous les prélèvements ont été revus sur lames HES afin de sélectionner les zones tumorales représentatives et les zones de myomètre sain quand il était présent. Les zones sélectionnées ont ensuite été cerclées sur les blocs de paraffine correspondants.

Les blocs de TMA ont été construits avec l'aide et les conseils de la technicienne de recherche du département de biopathologie de l'institut Bergonié (Valérie Velasco). Les zones d'intérêt ont été prélevées en utilisant un « Tissue Arrayer » (Beecher Instruments Tissue Arrayer, Sun Prairie, WI), puis disposées dans un bloc de paraffine vierge. Trois cylindres de 1mm de diamètre issus de 3 zones tumorales représentatives différentes et 2 cylindres issus de 2 zones de myomètre ont été réalisés pour 32 cas. Pour les cas restants, (27/59), ne présentant pas de zones de myomètre sain, cinq cylindres de tumeurs ont été réalisés.

Les blocs de TMA ont tous été orientés par 3 spots prélevés dans des spots de foie sain. Ils ont ensuite fait l'objet de coupes sériées, en utilisant un microtome classique qui ont ensuite été déposées sur lames et colorées en HES. (**Figure 6**).

Figure 6 : Organisation des blocs de TMA et photo d'une lame de TMA.



En jaune les spots de foie sain, en rouge les spots de tissu tumoral et en vert les spots de tissu sain. **A** patientes n°1 à 24, **B** patientes n°25 à 48, **C** patientes n° 49 à 59. **D** Lame histologique en coloration HES des patientes n°1 à 24 en coloration HES.

2.5 PROTOCOLE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur un automate Benchmark Ultra (Roche Ventana, Meylan, France) avec les anticorps listés dans le **Tableau5**.

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour l'étude immunohistochimique.

Nom	Clone	Dilution	Distribution	Temps d'incubation	Prétraitement	Système de révélation
VPAC2/VIPR2 Vasoactive intestinal peptide receptor 2	Anticorps polyclonal de lapin	1/200	Interchim	56 min	CC1 standard à 96°C	Kit ULTRAVIEW (uV)
Protéine 16	ink4a	Prédilué	Roche Ventana Meylan, France	32 min	CC1 Standard	Kit ULTRAVIEW (uV)
Protéine 53	DO7	1/50	Dako, Courtaboeuf, France	32 min	CC1 Standard	Kit ULTRAVIEW (uV)

Nom	Clone	Dilution	Distribution	Temps d'incubation	Prétraitement	Système de révélation
Récepteur aux Estrogènes (RE)	SP1	Prédilué	Roche Ventana, Meylan France	32 min	CC1 Standard	Kit ULTRAVIEW (uV)
Récepteur de la Progestérone (RP)	1E2	Prédilué	Roche Ventana, Meylan France	32 min	CC1 standard	Kit ULTRAVIEW (uV)

2.6 SCORES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

L'anticorps anti-VIPR2, a été testé sur 4 blocs entiers correspondant à des ULMS de la cohorte, afin de contrôler l'homogénéité du marquage et d'évaluer la reproductibilité des marquages sur les spots de TMA. Puis, nous avons évalué le marquage cytoplasmique sur les spots de TMA avec différents scores.

Nous avons d'abord utilisé un histoscore (H-score) qui prend en considération la proportion de cellules marquées ainsi que les intensités de marquage, en utilisant la formule :

H-score= 1 x (% de cellules à marquage faible) + 2 x (% de cellules à marquage modéré) + 3 x (% de cellules à marquage intense).

Ce score va de 0 à 300. Ce score a été testé et utilisé dans des études, pour différents anticorps, sur des TMA et sur des sarcomes utérins, dont des LMS⁹⁶⁻⁹⁸.

Le deuxième score est un score semi quantitatif simple (nommé ici score-S). Ce score additionne 2 nombres : un nombre pour le pourcentage de cellules marquées et un autre pour l'intensité du marquage. Le résultat de l'addition étant considéré négatif si inférieur à 6 et positif de 6 à 8. Ce score est celui qui a été testé pour l'anticorps anti-VIPR2 par l'équipe de Cuppens et al sur 17 LMS et 5 myomètres sains⁸¹. Ce score a été également utilisé pour les cancers du sein^{99,100}. Il est résumé dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Score-S

Pourcentage de cellules marquées		Intensité	
0	Pas de cellule	0	Pas de marquage
1	<1% de cellules	1	Faible
2	1-10% de cellules	2	Modéré
3	11-33% de cellules	3	Fort
4	34-66% de cellules		
5	67-100% de cellules		
Addition des scores			
0-5	Négatif		
6-8	Positif		

L'immunomarquage nucléaire de p16 a été évalué avec un score semi quantitatif déjà utilisé par l'équipe de Ip et al ⁵⁷ et de Bodner-Adler et al ⁶⁰. Un marquage cytoplasmique et/ou nucléaire a été considéré comme positif. (**Tableau 7**)

Tableau 7 : Score immunohistochimique de l'anticorps anti-p16

Score	Pourcentage de cellules marquées
0	0% de cellules marquées
1	Marquage de cellules isolées
2	<33% de cellules marquées
3	33-66% de cellules positives
4	> 66% de cellules positives

L'expression de la protéine p53 a été scorée en marquage aberrant ou marquage normal, pour correspondre à l'état mutationnel du gène p53 ¹⁰¹⁻¹⁰³. Un marquage immunohistochimique normal, étant considéré comme un marquage hétérogène, d'intensité variable des cellules tumorales. (**Tableau 8**)

Tableau 8 : Score immunohistochimique de l'expression de la protéine p53

Statut mutationnel du gène <i>TP53</i>	Marquage immunohistochimique	Pourcentage de cellules marquées
Muté	Aberrant	0% ≥ 80%
Sauvage (wild-type)	Normal	1% à 79%

Concernant les récepteurs hormonaux RE et RP, le score utilisé était un score semi quantitatif simple qui multiplie un nombre pour le pourcentage de cellules marquées et un autre pour

l'intensité du marquage, l'expression étant considérée faible si inférieure à 4 et forte de 4 à 6⁵⁵. (**Tableau 9**)

Tableau 9 : Score immunohistochimique utilisés pour évaluer l'expression des récepteurs hormonaux.

Pourcentage de cellules marquées		Intensité du marquage	
0	0%	0	Négatif
1	1-10%	1	Modéré
2	11-50%	2	Fort
3	≥ 50 %		
Multiplication des scores			
0-3	Expression faible		
4-6	Expression forte		

Tous les immunomarquages ont été lus séparément par deux pathologistes (Dr Croce S. et Mme Philip M.), en cas de discordance entre les scores des deux lecteurs, la décision était prise par consensus.

2.7 EXTRACTION DE L'ADN

L'ADN est extrait en plusieurs étapes à partir de blocs de paraffine fixés en formol, selon le protocole Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) :

http://www.chemagilent.com/pdf/G441090020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf

La zone prélevée a été précédemment cerclée sur une lame HES afin de choisir la zone tumorale la plus cellulaire (> 80%) puis repérée sur le bloc en de paraffine.

2.8 ÉTUDE CYTOGENETIQUE : PROFIL GENOMIQUE PAR HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE MICRO-ARRAY (CGH)

L'ADN extrait a été hybridé dans une plaque micro-array génome entier de 8x60 k (G4450A; Agilent® Technologies, Santa Clara, CA, USA), selon le protocole du constructeur. Les échantillons micro-arrays ont été scannés avec un scanner à ADN micro-array, les images obtenues ont été analysées par « Feature Extraction V10.1.1.1 du logiciel Agilent® Cytogenomic 4.0 ». L'algorithme ADM-2 du logiciel d'analyse CGH v4.0.76 (Agilent® Technologies) a été utilisé pour identifier les anomalies du nombre de copies de l'ADN.

Un gain du nombre de copies de l'ADN a été défini par un log 2 ratio supérieur à 0,25, et une perte du nombre de copies de l'ADN a été définie par un log 2 ratio inférieur à -0,25. Une amplification a été définie par un log 2 ratio supérieur à 1,5, et une délétion homozygote a été définie par un log 2 ratio inférieur à -1,5. Pour prendre en compte le nombre et le type de changement du nombre de copies de l'ADN tumoral, nous avons calculé pour chaque cas l'index génomique (GI), tel que $GI = A^2/C$, avec A correspondant au nombre total de gains et de pertes et C correspondant au nombre de chromosomes impliqués ^{88,89,104}.

Les cas de STUMP d'une précédente série ⁸⁸ présentant un GI > 10 ont été inclus, dans notre étude.

2.9 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *XLSTAT* (version 2018.3 ; Copyright Addinsoft). Une probabilité inférieure à 0,05 était considérée comme significative.

Pour les tests de corrélation, les variables quantitatives ont été comparées avec le test de Wilcoxon Mann-Whitney et les variables qualitatives ont été comparées avec l'exact test de Fisher.

Le temps de recul médian de la cohorte a été calculé selon la méthode de Kaplan-Meier inversée (évènement = patiente vivante).

L'OS a été calculée comme le nombre de mois séparant la date du diagnostic initial de la date du décès ou des dernières nouvelles. La PFS a été calculée comme le nombre de mois séparant la date du diagnostic de la date de l'apparition de la première métastase ou récurrence. Si aucune récurrence ou progression de la maladie n'était retrouvée, la PFS était considérée comme le nombre de mois séparant le diagnostic, des dernières nouvelles ou du décès en fonction de celui qui arrivait en premier. L'analyse de la PFS et de l'OS ont été faites selon la méthode de Kaplan-Meier. Les courbes de survie ont été comparées grâce au test du Log-rank. Les Hazard ratio des analyses univariées et les analyses multivariées ont été effectuées par une modélisation de Cox en OS et PFS.

Les analyses multivariées ont été effectuées en 2 étapes pour s'adapter au nombre d'évènements avec un nombre maximal de 6 variables. Dans un premier temps, une analyse multivariée a été effectuée pour les données clinico-histologiques, afin de déterminer les données indépendantes sur notre cohorte. Dans un second temps, seules les variables dont la probabilité était inférieure à 0,1 en modélisation de Cox ont été ensuite ajustées aux données immunohistochimiques et génomiques.

Pour toutes les modélisations de Cox, un test de proportionnalité a été effectué (test de Schonefeld), afin de vérifier qu'il n'y avait pas de violation de l'hypothèse de risques proportionnels ([ANNEXE 4](#)).

Pour ces analyses les paramètres ont été regroupé de la façon suivante :

Age	< 51 ans
	≥ 51 ans
Taille tumorale	< 5 cm
	≥ 5cm
Pattern histologique	LMS à cellules fusiformes
	LMS épithélioïde et LMS à cellules pléomorphiques / ostéoclastiques
Atypies cellulaires	Légères et modérée
	Marquées
IM	≤ 20
	> 20
Nécrose	Absente
	Présente
Stade FIGO	I
	II, III, IV
P16	< 33%
	≥ 33%
P53	Marquage aberrant (0% ou ≥ 80%)
	Marquage normal (1% à 79%)
RE et RP	Marquage faible (0-3)
	Marquage fort (4-6)

Pour l'évaluation de l'anticorps anti-VIPR2 avec le Hscore, étant donné qu'il n'existe pas de palier connu pour cet anticorps, les analyses ont été réalisées pour différents paliers (60/70/80/90), avec le score-S les tumeurs étaient regroupées en positives ou négatives.

3 RESULTATS

3.1 DONNEES CLINICO-HISTOLOGIQUES

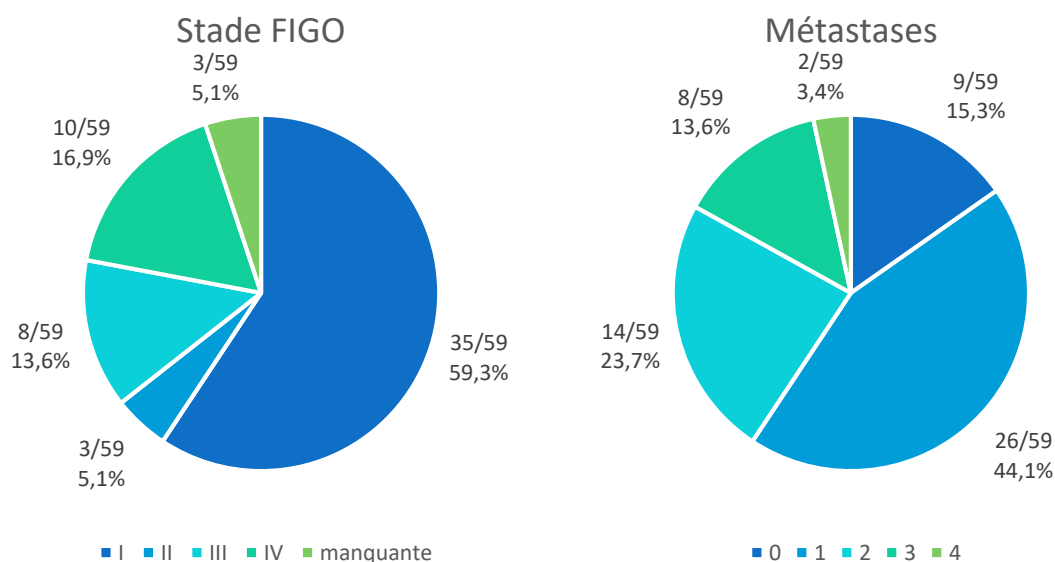
3.1.1 Caractéristiques cliniques de la cohorte

59 blocs ont été sélectionnés dont 57 correspondants aux tumeurs primitives et 2 blocs réalisés sur les récives locales.

Pour les données cliniques et de suivi, au sein de la cohorte de 59 patientes, la médiane d'âge au diagnostic était de 56 ans, avec des âges extrêmes de 26 à 87 ans.

Le stade tumoral n'était pas connu pour trois patientes (3/59). Pour les 56 autres patientes, la majorité des cas se présentaient au stade I. Dans notre cohorte 84,7% des patientes ont présenté une ou plusieurs métastases (50/59). La répartition des patientes de la cohorte en fonction du Stade FIGO et du nombre de métastases présentées sont résumés dans la **Figure 7**.

Figure 7: Description de la cohorte en fonction du stade tumoral et du nombre de métastases présentées



Les différentes localisations métastatiques présentées par les patientes étaient les suivantes :

Localisation	(%)	N
Pulmonaire	54,2%	(32/59)
Péritonéale	27,1%	(16/59)
Osseuse	13,6%	(8/59)
Hépatique	8,5%	(5/59)
Pelvienne	8,5%	(5/59)
Tissus mous (sans autre précision)	6,8%	(4/59)

Les localisations cutanées, cérébrales et vaginales ont chacune été présentées par 2 patientes soit 3,4% chacune. Des localisations pancréatiques, ganglionnaires, thyroïdiennes, urétérales, iléales, lombo-aortiques, ovariennes, cervicales, vésicales et rectales ont chacune été présentées par 1 patiente soit 1,7% chacune.

Concernant les traitements adjuvants, pour 11 patientes l'information n'était pas connue, soit 18,6 % (11/59).

Pour les autres patientes :

- 31,2% (15/48) ont reçu de la radiothérapie pelvienne adjuvante seule,
- 25% de chimiothérapie adjuvante seule (12/48),
- 8,3% des patientes ont reçu une radiothérapie et chimiothérapie adjuvante (4/48),
- 35,4% n'ont pas reçu de traitement adjuvant (17/48).

Le temps de recul des 59 patientes s'étendait de 2 mois à 233 mois avec un temps de recul médian de 100,5 mois avec IC 95% (86,955-114,156), au final 10 patientes étaient vivantes en rémission, 9 patientes étaient vivantes avec récurrence de la maladie, et 40 patientes étaient décédées à cause du LMS.

3.1.2 Caractéristiques morphologiques de la cohorte

Les caractéristiques morphologiques des tumeurs sont résumées dans le **Tableau 10**.

Elles mesuraient 1,3 à 23 cm, avec une taille médiane à 8 cm, pour 2 cas nous avons une approximation de la taille tumorale et pour 4 cas nous n'avons aucune précision sur la taille tumorale.

L'examen microscopique montrait différents patterns histologiques, incluant des tumeurs à cellules fusiformes, épithélioïdes et pléomorphiques (ou de type ostéoclastique) (**Figure 8**). Les tumeurs à cellules pléomorphiques présentaient un immunomarquage négatif pour les marqueurs mélanocytaires (ainsi le diagnostic de PECome a été exclu).

L'IM moyen était de 26,56 mitoses/10 champs au fort grossissement avec une médiane à 21 mitoses/10 champs.

Tableau 10 : Caractéristiques macroscopiques et histologiques des ULMS de la cohorte

	Variables	Effectif (N)	(%)
Taille (cm)	>5	46	78 %
	≤5	9	15,3%
	Non connue	4	6,8%
Morphologie	Fusiforme	46	78%
	Épithélioïde	10	17%
	Pléomorphique /Ostéoclastique	3	5%
IM	>20	31	52,5%
	≤20	28	47,5%
Atypies	Légères	3	5,1%
	Modérées	13	22%
	Marquées	43	72,9%
Nécrose	Présente	52	88,1%
	Absente	7	11,9%

Figure 8 : Aspects microscopiques des différents pattern histologiques de la cohorte

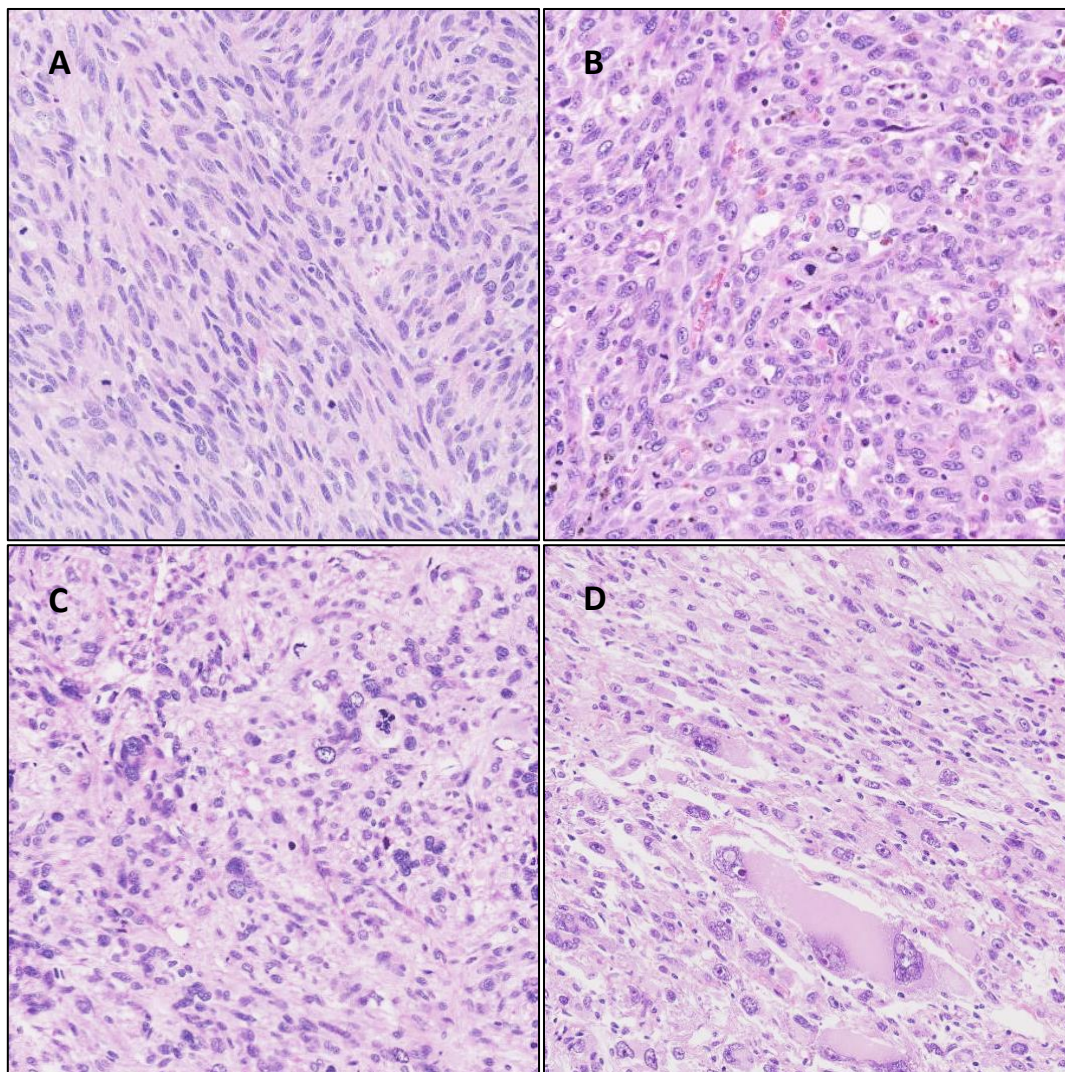


Photo de lames en Coloration HES au grossissement x10 **A** Léiomyosarcome à cellules fusiformes, formant des courants ou faisceaux cellulaires se croisant à angle droit (patiente n°41). **B** Léiomyosarcome épithélioïde, comportant des cellules tumorales rondes à ovalaire (patiente n°37). **C** Léiomyosarcome avec cellules pléomorphes (patiente n°22). **D** Léiomyosarcome à cellules pléomorphes comportant des cellules de type ostéoclastiques (patiente n°47).

3.2 DONNEES IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET GENOMIQUES

3.2.1 Immunohistochimies RE, RP, p16 et P53

Les caractéristiques immunohistochimiques des tumeurs sont résumées dans le **Tableau 11**.

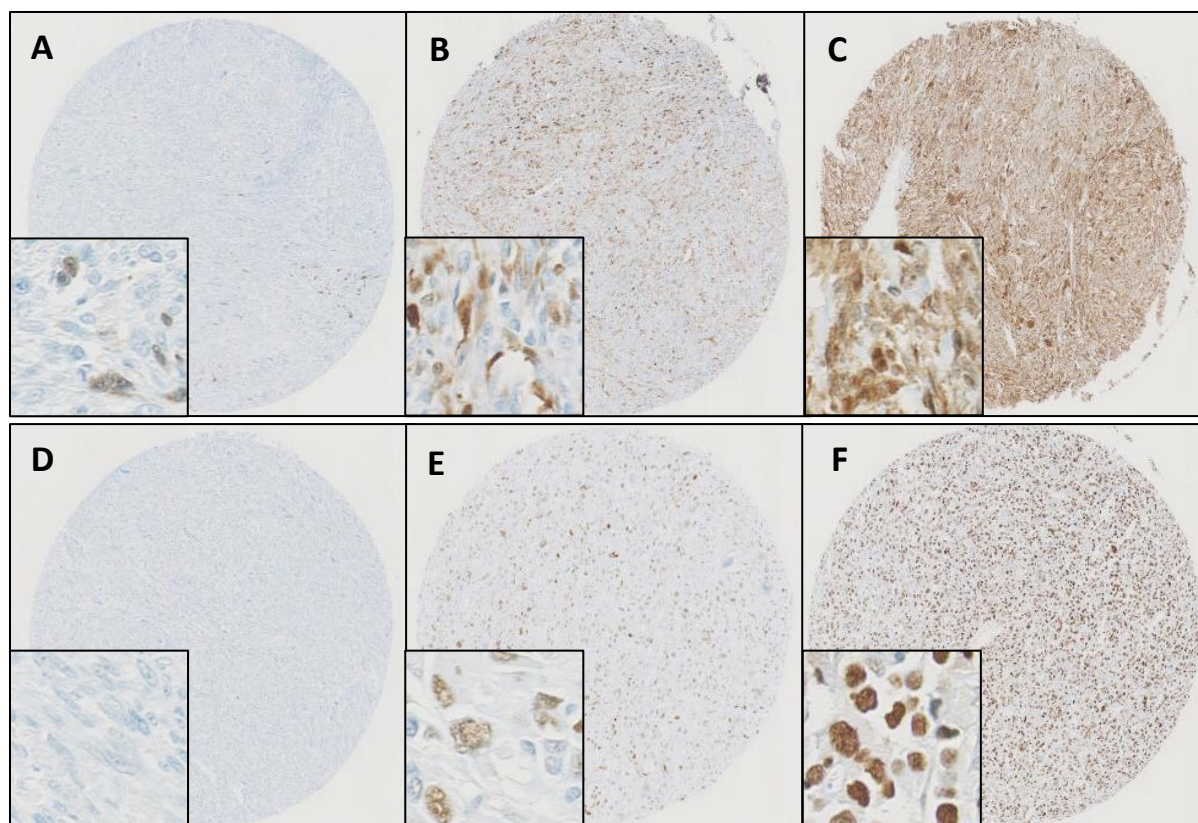
- 16/59 LMS ont présenté un immunomarquage fort (score 4 à 6) pour les récepteurs aux œstrogènes (15,8%) et 16/59 pour les récepteurs à la progestérone (15,8%).
- Le marquage p53 était aberrant pour 54,2% des LMS (32/59).
- 64,4% des cas ont présenté un marquage p16 supérieur ou égal à 33% (38/59).

Les exemples de marquages p16 et p53 sont présentés dans la **Figure 9**.

Tableau 11 : Caractéristiques immunohistochimiques des ULMS de la cohorte.

	Modalités	(N=59)	(%)
RE	0	31	52,5
	1	7	11,9
	2	4	6,8
	3	1	1,7
	4	8	13,6
	6	8	13,6
RP	0	31	52,5
	1	9	15,2
	2	3	5,1
	4	10	16,9
	6	6	10,2
P16	Négatif	14	23,7
	Cellules isolées	2	3,4
	<33%	4	6,8
	33-66%	8	13,5
	>66%	30	50,8
	Non interprétable	1	1,7
P53	Négatif	20	33,9
	≥ 80%	12	20,3
	Normal	24	40,7
	Non interprétable	3	5,1

Figure 9 : Photo des immunomarquages p16 et p53 de la cohorte.



Grossissement x2,5 et x20. **A** marquage p16 isolé (score 1) (patiente n°53). **B** marquage p16 33-66% (score 3)(patiente n°54). **C** marquage p16 >66% (score 4) (patiente n°56). **D** marquage p53 négatif, aberrant correspondant à une protéine tronquée (patiente n°53). **E** marquage p53 hétérogène, normal (patiente n°59). **F** marquage p53 excessif (patiente n°57).

3.2.2 Index génomique

Pour un cas de la cohorte, présentant les caractéristiques histologiques nécessaires au diagnostic de LMS, l'index génomique était ininterprétable, pour les 58 autres patientes pour qui la CGH a pu être effectuée, l'index génomique médian était de 42,270 [11-180]. La répartition des patientes selon le seuil à 35 est décrite dans le **Tableau 12**.

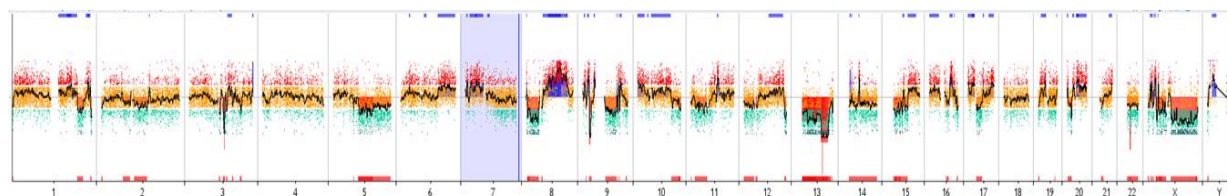
Deux exemples de profil génomique de la cohorte sont présentés dans la **Figure 10**.

Tableau 12 : Répartition des patientes (n=58) en fonction du GI avec un seuil à 35.

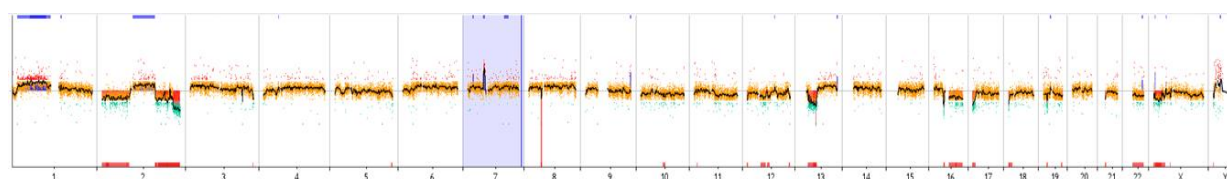
GI	(N=59)	(%)
<35	23	39
≥35	35	59,3
Non interprétable	1	1,7

Figure 10 : Exemple de profil génomique par CGH

A



B



A Profil génomique d'un léiomyosarcome (patiente n°12) avec GI=141. **B** Profil génomique d'un léiomyosarcome (patiente n°1) avec GI=18.

3.2.3 l'expression immunohistochimique du VIPR2

L'immunomarquage du VIPR2 était cytoplasmique (**Figure 11**).

Les résultats du Hscore s'étendaient de 0 à 230, avec une moyenne à 83,62 et une médiane à 70. Le seuil de positivité du Hscore pour le VIPR2 n'étant pas connu, différents paliers ont été étudiés, autour de la moyenne, de la médiane et présentant des corrélations significatives avec le score-S ($p < 0,001$) (**Tableau 13**).

Les données descriptives de l'expression du VIPR2 sont résumées dans le (**Tableau 14**).

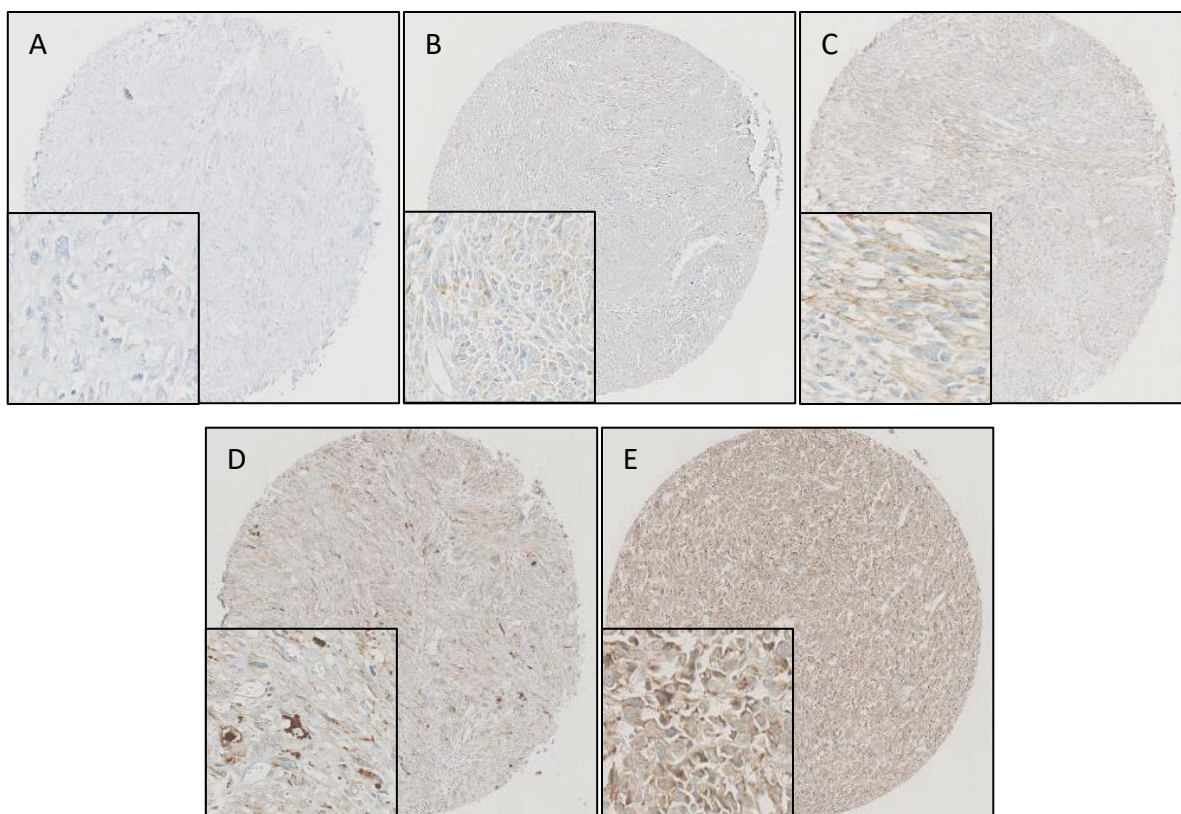
Tableau 13 : Test de corrélation entre le Hscore pour différent paliers et le score-S.

Hscore	Score-S		p-value
	Négatif	Positif	
<60	24	0	< 0,0001
≥60	8	27	
<70	25	0	< 0,0001
≥70	7	27	
<80	28	2	< 0,0001
≥80	4	25	
<90	29	3	< 0,0001
≥90	3	24	

Tableau 14 : Expression immunohistochimique du VIPR2 de la cohorte (n=59)

Variables	(N=59)	(%)
VIPR2 (Score-S)		
Négatif	32	54,2
Positif	27	45,8
VIPR2 (Hscore)		
<60	24	40,7
≥60	35	59,3
<70	25	42,4
≥70	34	57,6
<80	30	50,8
≥80	29	49,2
<90	32	54,2
≥90	27	45,8

Figure 11 : Photos de l'immunomarquage avec l'anticorps anti-VIPR2



Grossissement x2,5 et x10. **A** Hscore=0, score-S négatif (patiente n°31). **B** Hscore= 40, score-S négatif (patiente n°3). **C** Hscore =70, score-S négatif (patiente n°55). **D** Hscore =110, score-S positif (patiente n°10). **E** Hscore = 230, score-S positif (patiente n°59).

Le **Tableau 15** présente les relations entre les données clinico-histologiques et l'expression de VIPR2 en immunohistochimie.

L'expression de VIPR2 était corrélée à l'IM ($p=0,002$). Il n'a pas été retrouvé d'autre association avec l'âge, la taille tumorale, la stadification FIGO, les atypies, le type histologique, la présence de nécrose ou la réalisation d'un traitement adjuvant.

Tableau 15 : Corrélation entre les caractéristiques clinico-histologiques et l'expression de VIPR2 évaluée avec le score-S.

Variables quantitatives	Score-S Négatif Médianes	Score-S Positif Médianes	p value
Age au diagnostic*	55	57	0,148
Taille tumorale (cm)*	7,5	8,5	0,294
Mitoses*	19,5	31	0,002
Variables qualitatives	Score-S Négatif (N)	Score-S Positif (N)	p value
Traitement adjuvant †			
Oui	15	16	1,000
Non	9	8	
Stade FIGO †			
I	23	12	0,056
II, III, IV	8	13	
Atypies †			
Légères/modérées	12	4	0,078
Marquées	18	25	
Forme histologique †			
Fusifforme	28	18	0,067
Autre	4	9	
Nécrose †			
Présente	26	26	0,112
Absente	6	1	

* Les analyses des variables quantitatives : la médiane est donnée pour chaque groupes d'expression du VIPR, la p-value est calculée avec le test de Wilcoxon Mann-Whitney. † Les analyses des variables qualitatives : la proportion de cas est donnée dans chaque sous-groupes, la p-value est calculée avec l'exact test de Fisher.

3.3 ANALYSES DE SURVIE

La médiane d'OS était de 85,2 mois, IC 95% (59,75-110,64). La médiane de PFS de la série était de 35,1 mois, IC 95% (23,44-46,77).

Nous avons, dans un premier temps, réalisé les analyses univariées et multivariées avec les paramètres clinico-histologiques, afin de limiter le nombre de covariables. Notre but étant d'évaluer l'expression de VIPR2 comme facteur pronostique, ainsi que de choisir le système de score le plus performant entre le Hscore et le score-S. Nous avons dans un second temps réalisé ces analyses pour l'expression immunohistochimique de VIPR2.

3.3.1 Analyses des paramètres clinico-histologiques

Les résultats des analyses univariées sont résumées dans le **Tableau 16** et les courbes de survie significatives sont en ANNEXE 5. Le stade FIGO présentait une association forte avec l'OS et la PFS ($p < 0,0001$). Avec une médiane de survie globale de 101 [48-233] les stades précoces ont une survie significativement meilleure que les stades avancés qui ont une médiane de survie globale de 12 [4-27] $p < 0,0001$. Il a également été retrouvé une association entre une OS ou une PFS plus courte et les caractéristiques histologiques telles qu'un compte mitotique > 20 mitoses par 10 champs et la présence de nécrose. Les atypies cytonucléaires marquées étaient aussi associées à une OS plus courte.

Tableau 16 : Analyses univariées des différents paramètres cliniques et histologiques pour l'OS et la PFS.

Variables	Médiane OS (IC 95%)	p-value (log rank)	HR (IC 95%)	Médiane PFS (IC 95%)	p-value (log rank)	HR (IC 95%)
Âge						
<51	48 (27-57)	0,413	1,339 (0,685-2,620)	25,2(12-57)	0,336	1,346 (0,750-2,412)
≥51	47 (28-82)			14,4(6-26,4)		
Traitement						
Non	-	0,057	2,872 (1,048-4,156)	13(2,9-35)	0,547	1,203 (0,655-2,209)
Oui	38 (27-73)			12(7-26,4)		
FIGO						
I	101(48-233)	< 0,0001*	4,286 (1,903-9,652)	28(21-60)	< 0,0001*	4,661 (2,030-10,702)
II, III, IV	12(4-27)			1,6(1-7)		
Taille						
≤5	172 (47- -)	0,107	2,051 (0,967-4,348)	21,6(13-75)	0,338	1,420 (0,715-2,821)
>5	39 (19-79)			14,4(6-27)		
Histologie						
Autre	58 (5-172)	0,624	1,207 (0,579-2,517)	12(2,8-137)	0,175	1,589 (0,844-2,993)
Fusiforme	47(30-82)			19,2(9-27)		
Mitoses						
≤ 20	98(45-233)	0,005*	2,441 (1,306-4,563)	27(21-60)	0,003*	2,213 (1,257-3,893)
>20	32(12,7-57)			7(2-19,2)		
Nécrose						
Absente	-	0,004*	-	-	0,014*	3,785 (1,879-7,624)
Présente	38 (27-58)			12(7-25)		
Atypies						
Légères/ modérées	233 (73- -)	0,003*	3,116 (1,654-5,869)	34(25-57)	0,063	1,776 (1,005-3,141)
Marquées	32 (19-48)			9(4,5-21,6)		

P-value calculées avec le test du log-rank, (HR) Hazard ratio, (IC) intervalles de confiance supérieurs et inférieurs.

Dans le but d'évaluer les facteurs cliniques pronostiques indépendants dans notre cohorte, nous avons réalisé une première analyse multivariée. Pour cela, nous avons intégré les données significatives, en OS et en PFS, des analyse univariées, ainsi que l'âge et la taille tumorale, puis nous avons procédé étape par étape, en excluant à chaque fois la variable la moins significative. En analyse multivariée pour l'OS comme pour la PFS, l'IM et le stade FIGO ressortaient comme paramètres indépendants. (**Tableaux 17 et 18**).

Tableau 17 : Analyse multivariée en OS des données clinico-histologiques

Variables	Pr > Khi ²	HR (IC 95%)
Stade FIGO I	< 0,0001*	0,150 (0,070-0,320)
IM > 20	0,001*	3 ,334 (1,630-6,820)
Taille >5 (exclue étape 4)	0,058	
Atypies marquées (exclue étape 3)	0,117	
Age >51 (exclue étape 2)	0,561	
Nécrose (exclue étape 1)	0,947	

Analyse réalisée par modélisation de Cox avec p-value et Hazard ration (IC 95%). *valeurs significatives

Tableau 18 : Analyse multivariée en PFS des données clinico-histologiques

Variables	Pr > Khi ²	HR (IC 95%)
Stade FIGO I	< 0,0001*	0,093 (0,041-0,208)
IM >20	0,0003*	3,330 (1,729- 6,411)
Taille >5 (exclue étape 3)	0,095	
Nécrose (exclue étape 2)	0,221	
Age >51 (exclue étape 1)	0,175	

Analyses réalisées par modélisation de Cox avec p-value et Hazard ratio (IC 95%). *valeurs significatives

3.3.2 Analyses des paramètres immunohistochimiques et génomiques

Les résultats des analyses univariées sont résumées dans le **Tableau 19**, les courbes de survies pour les RP et l'index génomique (GI) sont en ANNEXE 6.

Il existait pour notre cohorte une association forte entre l'expression des récepteurs à la progestérone et une OS et PFS plus longues (p<0,0001 et p=0,0015). L'index génomique était significativement associé à la survie globale mais pas à la survie sans progression.

En revanche ni l'expression de la p16, de la p53 ni celle des récepteurs aux œstrogènes ne présentaient de corrélation avec l'OS ou la PFS.

Tableau 19 : Analyses univariées des différents paramètre immunohistochimiques et génomique pour l'OS et la PFS.

	Médiane OS (IC 95%)	p-value	HR (IC 95%)	Médiane PFS (IC 95%)	p-value	HR (IC95%)
RE						
Faible (0-3)	35 (27-73)	0,087	0,539 (0,281-1,033)	12 (6-24)	0,297	0,722 (0,400-1,304)
Fort (4-6)	82(45-233)			28 (14-50)		
RP						
Faible (0-3)	30 (18-47)	<0,0001*	0,156 (0,083-0,292)	12 (6-21,6)	0,0015*	0,341 (0,193-0,66019)
Fort (4-6)	233 (82- -)			50 (25-72)		
p53						
Normal	32(12-233)	0,687	1,139 (0,582-2,23)	26,4 (7-35)	0,395	1,298 (0,720-2,341)
Aberrant	57(32-101)			14,4 (6-25,2)		
p16						
<33	82 (32-82)	0,064	2,002 (0,943-4,254)	21,6 (12-35)	0,787	1,083 (0,599-1,964)
≥33	38 (27-58)			9 (6-28)		
GI						
<35	172(45- -)	0,045*	1,979 (1,052-3,727)	25(7-57)	0,172	1,477 (0,842-2,589)
≥35	38 (23-58)			14,4 (6-26,4)		

p-value réalisées avec le test du log-rank, Hazard ratio (HR), intervalles de confiance (IC) supérieurs et inférieurs. * données significatives.

3.3.3 Expression de VIPR2

3.3.3.1 Données brutes en OS

Les répartitions du temps de survie globale en fonction de l'expression du marquage immunohistochimique de VIPR2 avec le Hscore et Score-S sont montrées dans les **figures 12 et 13**. Pour mieux, visualiser les données un plafond à 100 mois de suivi a été défini, les patientes dont les données étaient censurées (vivantes à la fin du suivi) avec un temps de suivi inférieur à 100 mois ne sont pas intégrées aux graphiques.

Figure 12 : Nuage de point : OS des patientes en fonction du Hscore.

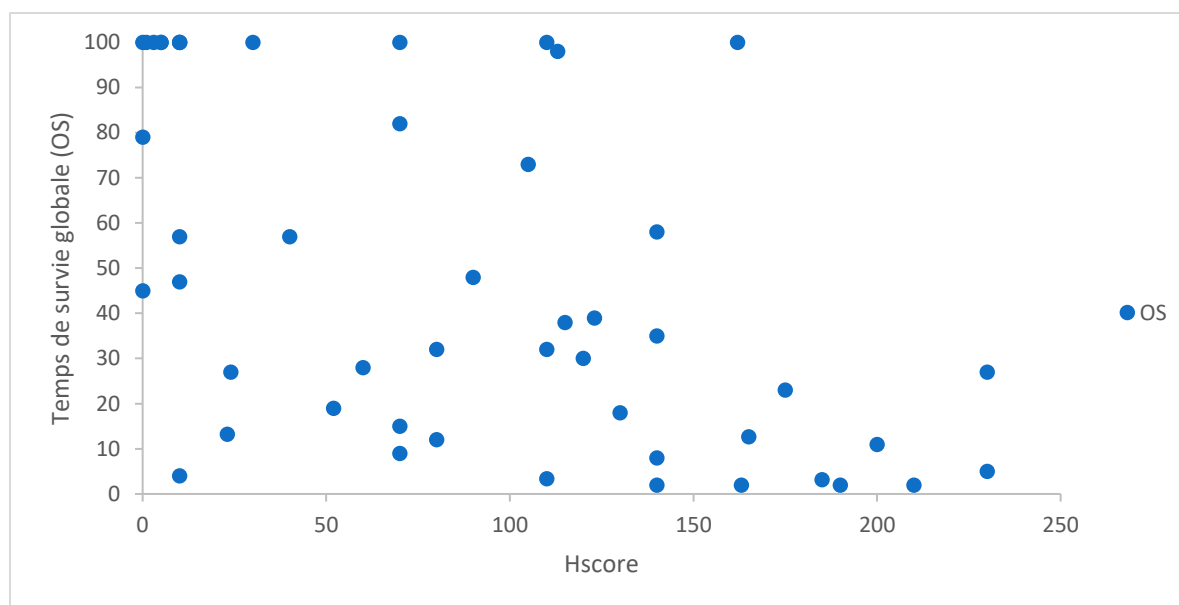
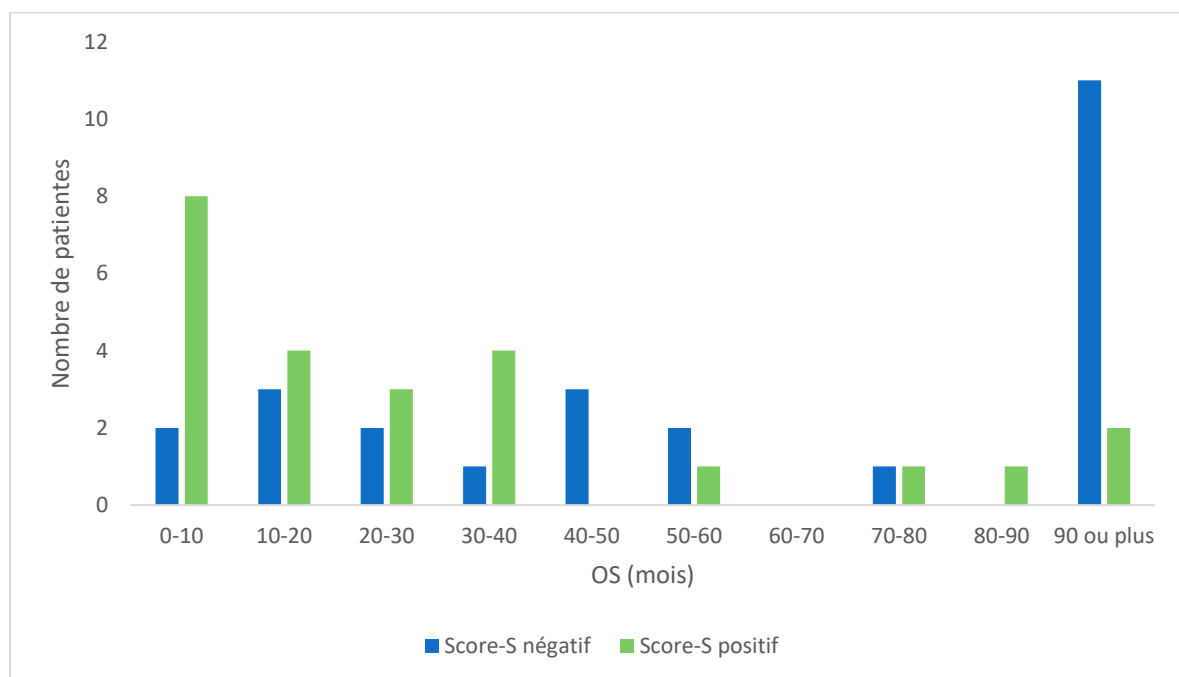


Figure 13 : Histogramme : répartition de l'OS selon le Score-S



3.3.3.2 Analyses univariées

Les analyses de survies réalisées sur la totalité de la cohorte (n=59) montraient une association entre l'expression du VIPR2 et l'OS ainsi qu'avec la PFS. Plus précisément, plus le VIPR2 était surexprimé dans la tumeur, plus la PFS et l'OS étaient raccourcies. Cette association se retrouvait quel que soit le système de score, y compris pour les différents seuils du Hscore testés, avec une significativité plus importante en OS pour un seuil à 80 (**Figure 14 et Tableau 20**).

Pour le Hscore avec un seuil à 80, le temps médian de survie était de 30 mois avec IC 95% (12-39) pour un Hscore $\geq$ 80, de 101 mois avec IC à 95% (57-233) pour les tumeurs présentant un Hscore < 80.

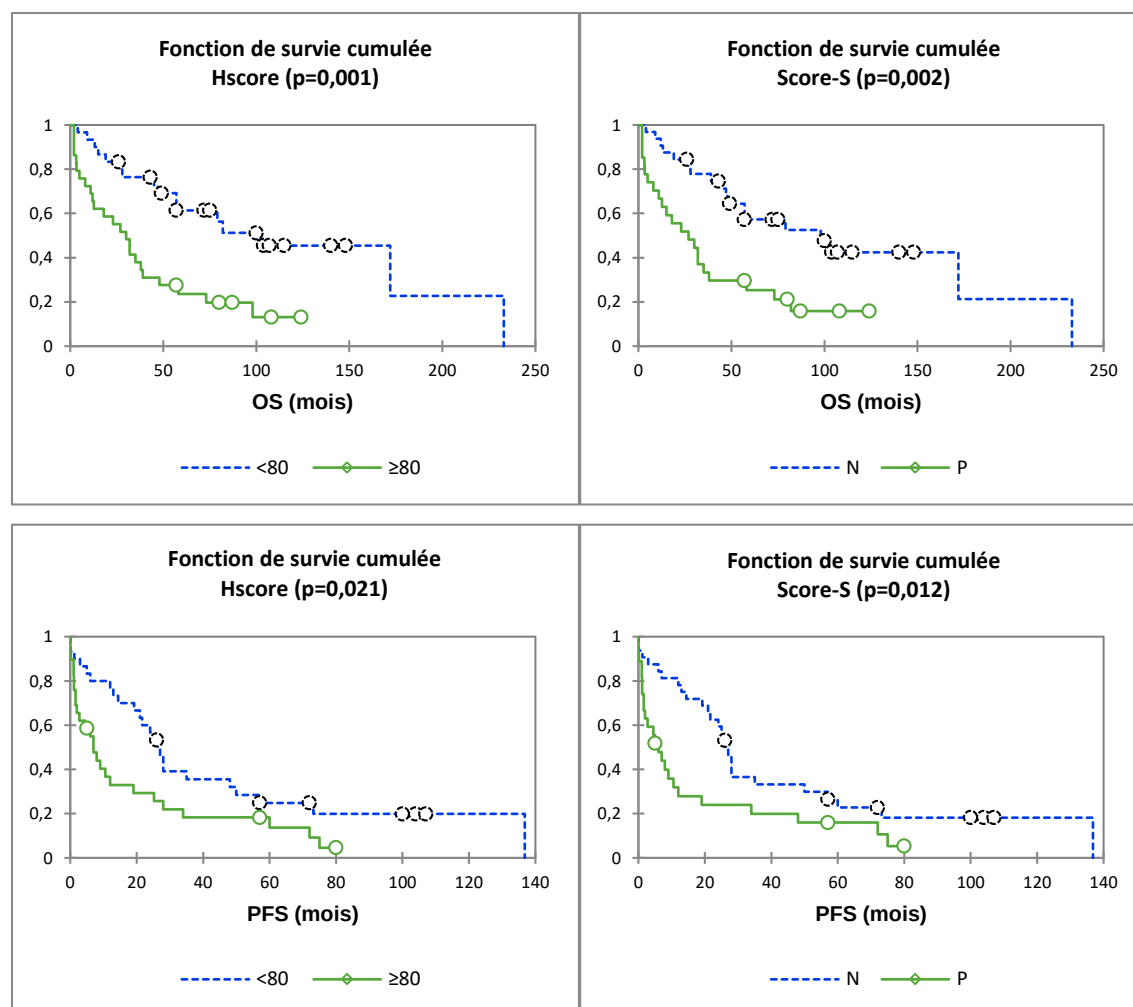
Nous avons également réalisé les courbes de survie pour les patientes en Stade FIGO I (n= 35), qui ne montraient pas d'associations significatives entre la survie globale et l'expression du VIPR2 que ce soit avec le score-S (p=0,280) ou avec le Hscore (palier à 80) (p=0,240).

Tableau 20 : Analyses univariées en OS et PFS de l'expression de VIPR2

A			B		
	p-value (test du log rank)	HR (IC 95%)		p-value (test du log rank)	HR (IC95%)
Score-S	0,002	2,691 (1,401-5,168)	Score-S	0,012	2,029 (1,149-3,583)
Hscore 60	0,003	2,771 (1,370-5,604)	Hscore 60	0,006	2,230 (1,228-4,049)
Hscore 70	0,005	2,549 (1,284-5,060)	Hscore 70	0,011	2,094 (1,163-3,769)
Hscore 80	0,001	2,887 (1,481-5,628)	Hscore 80	0,021	1,914 (1,086-3,374)
Hscore 90	0,004	2,492 (1,301-4,772)	Hscore 90	0,043	1,768 (1,006-3,108)

Tableaux descriptifs des p value, Hazard ratio (HR) et intervalles de confiance supérieurs et inférieurs respectifs des différents scores et seuils d'immunomarquage du VIPR2 pour l'OS (A) et la PFS (B).

Figure 14 : Courbes de survies de l'expression immunohistochimique de VIPR2.



Courbes de survies globale (OS) et de survie sans progression (PFS) selon la méthode de Kaplan Meier avec comparaison par test du Log-Rank des ULMS selon l'expression de l'anticorps anti-VIPR2. (N= négatif, P= positif).

3.3.3.3 Expression du VIPR2 tumeur /myomètre

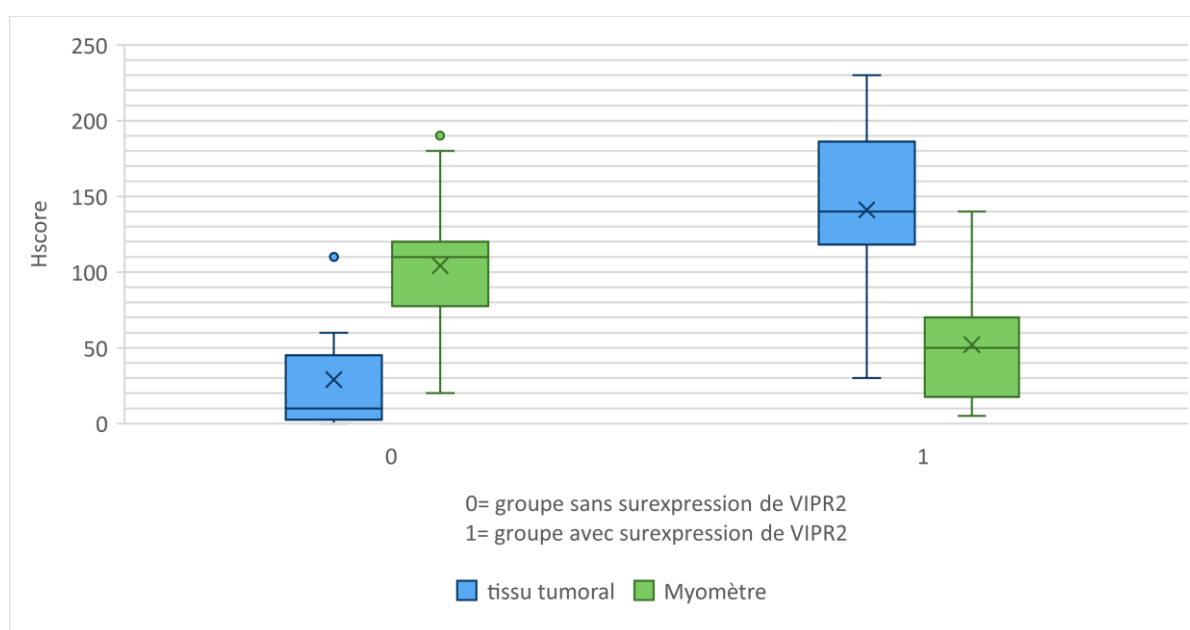
Au regard de ces résultats, nous avons également voulu voir, pour les TMA contenant du myomètre sain (n =32), si l'expression du VIPR2 par rapport à l'expression basale du myomètre était également liée à l'OS ou à la PFS, afin de s'affranchir d'une expression normale du VIPR2.

Pour cela, nous avons premièrement calculé la différence de Hscore en valeur absolue entre le myomètre et la tumeur. La différence absolue d'expression s'étendait de 10 à 180, avec une médiane à 82,5. 13 tumeurs présentaient une différence absolue d'expression inférieure à 80.

Il n'a pas été retrouvé d'association significative entre l'OS ou la PFS et la différence absolue d'expression ($p=0,889$ et $p=0,752$).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu voir si la surexpression de VIPR2 par rapport au myomètre sain était liée à la survie en calculant : Hscore tumeur – Hscore myomètre. Quatorze patientes ne présentaient pas de surexpression de VIPR2 par rapport au tissu myométrial sain. Pour ces 14 ULMS, le Hscore médian était de 10 [0-110], le Hscore médian pour le myomètre était de 110 [20-190]. Les 18 autres patientes présentaient une surexpression de l'anticorps-anti VIPR2 par rapport au myomètre. Le Hscore tumoral médian était de 140 [30-230], pour le myomètre sain la médiane était de 50 [5-140]. Ces données sont résumées dans la **Figure 15**.

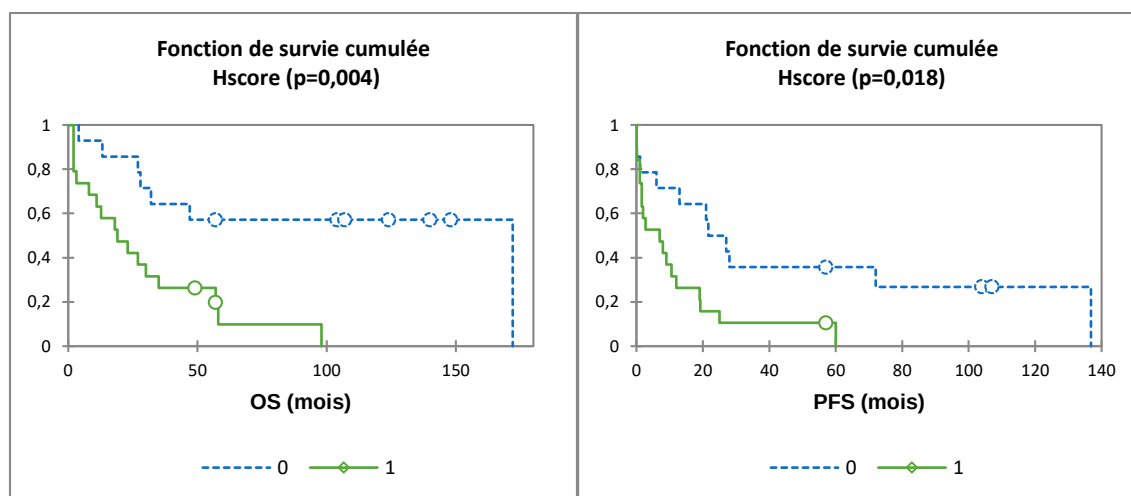
Figure 15 : Données descriptives de l'expression de VIPR2 pour le tissu tumoral et le myomètre (n=32)



Box plot présentant la moyenne (X), la médiane (-) et l'intervalle à 95% (L).

Les courbes de survies montraient une association significative entre la surexpression tumorale de VIPR2 par rapport à l'expression basale myométriale et l'OS ou une PFS plus courte (**Figure 16 et Tableau 21**).

Figure 16 : Courbes de survies de l'expression immunohistochimique de VIPR2 par rapport au myomètre.



Courbes de survies globale (OS) et de survie sans progression (PFS) selon la méthode de Kaplan Meier avec comparaison par test du Log-Rank des ULMS montrant une surexpression de VIPR2 par rapport au myomètre sain (1) et des ULMS ne présentant pas de surexpression de VIPR2 par rapport au myomètre sain (0). (n=32)

Tableau 21 : Analyses univariées pour l'OS et la PFS de l'expression de VIPR2 de la tumeur par rapport au myomètre

		OS		PFS	
	(N=32)	p-value	HR (IC 95%)	p-value	HR (IC95%)
0	14	0,004*	3,258 (1,421-7,475)	0,018*	2,294 (1,078-4,882)
1	18				

Tableau descriptif des p value, Hazard ratio (HR), intervalles de confiance supérieurs et inférieurs respectifs pour l'OS et la PFS des ULMS surexprimant VIPR2 par rapport au myomètre (1) et des ULMS ne montrant pas de surexpression (0). (n=32)

3.3.4 Analyses multivariées

Les analyses multivariées ont été effectuées sur 53 patientes, du fait du manque de données pour la taille tumorale et le stade FIGO pour certaines patientes de la cohorte. Nous avons intégré les données cliniques et histologiques de l'analyse multivariée précédente pour lesquelles $p < 0,1$ afin de les ajuster aux données génomiques et immunohistochimiques présentant une association significative en analyse univariée ($p < 0,05$). L'expression du VIPR2 comptabilisée avec le Hscore palier à 80 ou le score-S était considérée comme un facteur prédictif indépendant pour la survie globale. La taille tumorale, le stade FIGO et l'expression des RP ressortaient également comme des paramètres indépendants (**Tableaux 22A et 22B**).

En PFS seuls le stade FIGO et l'index mitotique étaient des paramètres indépendants quel que soit le score utilisé (**Tableaux 23A et 23B**).

Tableau 22 : Analyse multivariée en OS effectuée avec les 2 scores d'évaluation du VIPR2 (n=53)

A	Variable	p-value	HR (IC95%)
	Stade FIGO I	0,0004*	0,284 (0,109-0,529)
	RP (4-6)	0,0012*	0,129 (0,037-0,446)
	Hscore ≥80	0,005*	2,846 (1,371-5,910)
	Taille tumorale >5	0,0084*	4,169 (1,442-12,049)
	IM ≥20 (exclue étape 2)	0,173	
	GI ≥35 (exclue étape 1)	0,891	

B	Variable	p-value	HR (IC95%)
	RP (4-6)	0,0002*	0,0882 (0,024-0,319)
	Score-S positif	0,0007*	3,665 (1,727-7,777)
	Stade FIGO I	0,0013*	0,279 (0,129-0,610)
	Taille tumorale >5	0,0047*	4,7102 (1,610-13,777)
	IM ≥20 (exclue étape 2)	0,847	
	GI ≥35 (exclue étape 1)	0,972	

Analyse réalisée par modélisation de Cox avec p-value et Hazard ratio (IC 95%) avec Hscore (A) et score-S (B). *données significatives.

Tableau 23 : Analyses multivariées en PFS (n=53)

A	Variables	p- value	HR (IC 95%)
	Stade FIGO I	< 0,0001*	0,093 (0,041-0,208)
	IM ≥ 20	0,0003*	3,330 (1,729-6,411)
	Taille tumorale >5 (exclue étape 3)	0,058	
	Hscore (≥80) (exclue étape 2)	0,134	
	RP (4-6) (exclue étape 1)	0,478	
B	Variables	p-value	HR (IC 95%)
	Stade FIGO I	< 0,0001*	0,093 (0,041-0,208)
	IM ≥20	0,0003*	3,330 (1,729-6,411)
	Taille tumorale >5 (exclue étape 3)	0,058	
	Score-S (P) (exclue étape 2)	0,296	
	RP (4-6) (exclue étape 1)	0,206	

Analyses réalisées par modélisation de Cox avec p-value et Hazard ration (IC 95%) avec Hscore (A) et score-S (B). *données significative

3.3.5 Pour aller plus loin

Nous avons également regardé les profils génomiques au niveau du locus du gène VIPR2 en 7q des tumeurs de la cohorte, afin de les comparer au profil immunohistochimique de VIPR2. Le détail des données qui ont été recueillies sont dans l'[ANNEXE 7](#), elles sont résumées dans le **Tableau 24**. Nous avons observé que la surexpression de la protéine VIPR2 n'était pas le résultat de gain ou d'amplification, suggérant qu'elle serait le résultat d'une régulation épigénétique.

Tableau 24 : Répartition des tumeurs en fonction de leur profil génomique et immunohistochimique.

Profil d'expression immunohistochimique de VIPR2 (score-S)	Profil génomique en 7q			
	Perte	Gain	Normal	Non interprétable
Positif	9	1	17	0
Négatif	4	1	26	1

4 DISCUSSION

Le peptide intestinal vasoactif (VIP) est impliqué dans divers mécanismes physiologiques et physiopathologiques, tels que le contrôle du rythme circadien, de la tension pulmonaire, de la myorelaxation et de la sécrétion d'insuline^{91,92}.

L'immunoréactivité de VIP est décrite dans des tumeurs telles que l'adénocarcinome pancréatique, les cancers mammaires, les glioblastomes, les carcinomes colo-rectaux¹⁰⁵. Son récepteur VIPR1 y est souvent surexprimé.

VIPR2 quant à lui est moins bien connu ou étudié. Il apparaît exprimé dans les cellules musculaires lisses, des vaisseaux, du myomètre ou du parenchyme prostatique, pulmonaire, dans le cortex cérébral. Il est retrouvé dans les tumeurs dérivées de ces tissus⁹¹.

Les voies de signalisations activées par ces récepteurs sont encore mal connues.

Leur activation via la sous unité α de la protéine G, stimule l'adénylate cyclase (AC), entraînant l'augmentation intracellulaire de cAMP (**Figure 17**). Cette augmentation conduit à l'activation de la protéine Kinase A (PKA) qui peut activer la voie de signalisation ERK pour favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire^{92,93}. D'autres effets ont également été décrits, tels que la stimulation de la production de calcium intracellulaire par l'activation de la phospholipase C et la modulation de l'activité de la phospholipase D⁹², cependant les mécanismes précis contribuant à l'augmentation du calcium intracellulaire restent flous.

Figure 17 : Augmentation du cAMP intracellulaire par activation des récepteurs VIP/PACAP

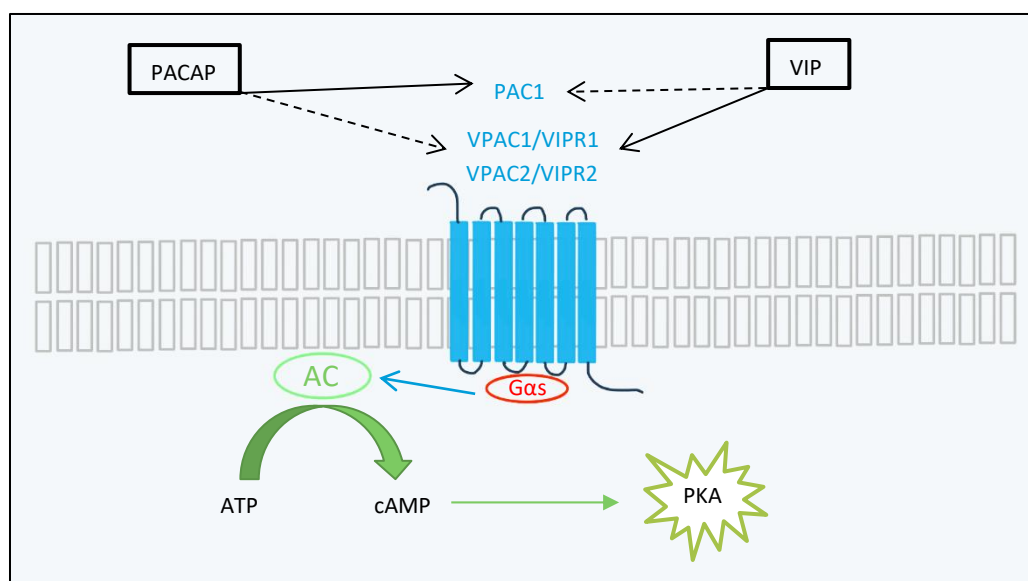


Image réalisée d'après ⁹². En bleu les récepteurs transmembranaires, en vert l'adenylate cyclase (AC), en rouge la sous unité α de la protéine G (Gas).

4.1 MESSAGE PRINCIPAL

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle pronostique de l'expression immunohistochimique de VIPR2 sur une série de 59 ULMS.

Nos données ont révélé que sur l'ensemble de la cohorte, les patientes exprimant VIPR2 dans les ULMS montraient une survie globale et une survie sans progression significativement plus courte en analyse univariée et ce quel que soit le système de score utilisé. On a également retrouvé lorsque l'expression de VIPR2 dans la tumeur était ajustée à l'expression dans le myomètre sur une partie de notre cohorte, que les patientes présentant une surexpression tumorale de VIPR2 avaient une survie globale et sans récurrence plus courte. La valeur indépendante de VIPR2 sur la survie sans récurrence n'a pas pu être confirmée. Cependant l'expression protéique de VIPR2 ressort comme facteur pronostique péjoratif indépendant en multivariée pour la survie globale.

4.1.1 Comparaison avec la littérature

Les résultats de notre étude vont dans le sens inverse de ceux publiés par Cuppens et al ⁸¹.

D'après une analyse qui intégrait l'étude des variations du nombre de copies géniques, des mutations, fusions et leur expression, menée sur une série de 84 ULMS, Cuppens et al ont observé que 52% des ULMS analysés montraient une délétion du locus 7q36.3 (où le gène *VIPR2* est localisé). Ces délétions étaient significativement corrélées à une OS plus courte ($p=3,2^{E-02}$). *VIPR2* apparaissait être le gène le plus significativement associé à la survie ($p=1,2^{E-02}$).

Pour valider le statut délété du gène *VIPR2*, les auteurs ont étudié son expression dans la tumeur par RNA-sequencing sur une série de 24 ULMS. *VIPR2* était significativement sous régulé ainsi que ses ligands, VIP et PACAP dans les ULMS. Sur 17 ULMS et 5 échantillons de myomètre, l'expression immunohistochimique de *VIPR2* a été évaluée. Dix des dix-sept ULMS et 4/5 myomètres étaient considérés comme positifs, sans différence significative entre les deux groupes. Une analyse par Western-Blot sur 4 ULMS et 3 myomètres a été effectuée sur des échantillons dont du matériel congelé était disponible, retrouvant une diminution significative de l'expression protéique de *VIPR2* dans les ULMS. Ils ont donc émis et testé sur une lignée cellulaire ULMS SK-UT-1, l'hypothèse selon laquelle la stimulation de *VIPR2* par VIP diminuerait la prolifération cellulaire, et ont remarqué une diminution significative de la prolifération de façon dose-dépendante. Le protocole d'IHC, la méthode analytique (de lecture) sont comparables aux nôtres, puisque les analyses IHC de *VIPR2* ont été menées dans le laboratoire de Biopathologie de l'Institut Bergonié avec le même anticorps *VIPR2* polyclonal de lapin et les lames ont été interprétées par le Dr Croce S.

Finalement, seule la délétion du gène *VIPR2* a été ajustée à la survie, la régulation du gène et l'expression protéique de *VIPR2* n'ont pas fait l'objet d'analyses de survies. De plus, le faible nombre de cas utilisé en western-blot ($n=4$) et en immunohistochimie ($n=17$) ne permettent pas une vraie comparaison avec nos résultats. Cependant leurs conclusions vont dans le sens d'études décrivant le rôle antiprolifératif musculaire lisse de VIP et ses récepteurs ^{106–108}.

D'un autre coté les récepteurs de VIP et PACAP sont surexprimés dans de multiples tumeurs, pouvant jouer un rôle dans la détection des lésions et pour l'administration de thérapies

ciblées ^{94,109}. Moody et Gozes en 2007, ont montré que, le récepteur VIPR1 était présent en forte densité dans les cellules cancéreuses pulmonaire ou mammaires. Les mêmes auteurs ont décrit que les peptides de type VIP, fonctionnent tel des facteurs de croissance autocrine dans ces cancers. Ils ont également montré que l'addition d'antagonistes aux récepteurs de VIP, inhibe la croissance des cancers du sein et du poumon in vitro et in vivo ¹¹⁰. Ces résultats vont dans le sens d'autres études montrant que VIP joue un rôle dans la croissance de certaines tumeurs, dont les carcinomes pulmonaires, prostatiques et mammaires ^{91,111-113}.

Différents mécanismes d'action en fonction des tumeurs sont décrits. VIP pourrait entraîner une stimulation de la sécrétion de peptides analogues à la bombésine, dans les cancers pulmonaires ⁹¹. D'autres études montrent également pour les cancers pulmonaires que des récepteurs couplés aux protéines G tels que le VIPR2, peuvent stimuler la croissance tumorale en activant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)⁹¹. Il a également été décrit que VIP et PACAP en activant l'adénylate cyclase, pourraient augmenter l'expression et la sécrétion du VEGF et stimuler la croissance cellulaire ⁹¹. Ces données vont dans le sens de nos résultats, et pourraient expliquer le lien entre une surexpression de VIPR2 et l'agressivité tumorale.

Actuellement les mécanismes détaillés de l'association entre l'action de VIP sur ses récepteurs et l'apparition de tumeurs malignes demeurent encore flous du fait d'études souvent contradictoires.

4.1.2 Forces et faiblesses :

Une des difficultés de l'étude a été de recueillir les données cliniques, d'autant plus lorsque la patiente a été opérée hors centre et de nombreuses données de recueil sont manquantes. Ainsi, le manque de renseignement précis sur les traitements reçus et la large période d'inclusion des patientes s'étendant de 1977 à 2011, ont pu former un biais de notre étude. Les traitements chirurgicaux ou médicaux, par exemple, ont évolué durant ces années, pouvant modifier les données de survie des patientes. En raison de la nature rétrospective des données, les conclusions qui pourraient être tirées de notre analyse ont donc une valeur limitée. Cependant la plupart des études sur les ULMS disponibles présentent le même biais de sélection.

Les caractéristiques de notre cohorte sont comparables à ce qui est observé dans les autres séries de la littérature. La médiane d'âge, le pourcentage de stade FIGO I au moment du diagnostic, le taux important de patientes présentant des métastases, le pourcentage de localisation métastatiques pulmonaires, osseuses et péritonéales, tous comme la taille médiane tumorale, la médiane de l'index mitotique et la fréquence des ULMS fusiformes sont similaires à ce qui est généralement décrit^{17,33,39,45}.

La lecture en double aveugle des immunohistochimies par deux pathologistes, avec une décision en second temps par consensus, ainsi que la lecture des immunohistochimies dirigées contre VIPR2 selon deux méthodes de score différentes, calculées indépendamment l'une de l'autre, sont des forces de notre étude. Dans la publication de Cuppens⁸¹ une seule méthode d'analyse de l'IHC a été utilisée.

Nous avons observé une grande variabilité dans l'expression basale de VIPR2 dans notre série de myomètre avec le Hscore (5 à 190), ce qui peut prêter à confusion sur l'interprétation de la surexpression de cet anticorps dans les LMS. Une série plus importante comprenant pour chaque tumeur son équivalent myométrial sain est nécessaire afin de déterminer si la positivité de VIPR2 ou de la surexpression par rapport au myomètre est le facteur pronostic le plus fiable. En outre, on ne possède pas de modèle fonctionnel comparant la sous expression, l'expression basale et la surexpression.

En raison du faible effectif de notre étude, des études plus approfondies incluant un plus grand nombre de patients seraient nécessaires pour établir l'implication de VIPR2 dans la décision thérapeutique chez les patientes en stade FIGO I.

Bien que cette étude comporte 59 cas, cela est également insuffisant pour ajuster toutes les variables ensemble en analyses multivariées. Nous avons effectué ces analyses en deux temps et VIPR2 n'a été ajusté qu'aux variables clinico-histologiques fortes et indépendantes dans la série.

Nous sommes conscients que l'une des principales limites de notre étude est l'utilisation d'un seul anticorps. En 2015, Schulz et al ont testé un nouvel anticorps dirigé contre VIPR2, le MAB SP235. Ils l'ont testé sur 167 échantillons tumoraux correspondant à 21 types de tumeurs, dont 4 LMS et sur les tissus normaux correspondants¹⁰⁵. Dans cette étude l'anticorps SP235 a

montré une bonne spécificité envers VIPR2. L'anticorps SP235 est un anticorps monoclonal de lapin dirigé vers les acides aminés de la partie C terminale (419-428) de VIPR2, qui n'était pas disponible au moment de l'étude. L'anticorps que nous avons utilisé est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre une séquence de 16 acides aminés de la partie interne de VIPR2, cet anticorps a précédemment été utilisé par Cuppens et al⁸¹. Dans notre étude, 45,8% des tumeurs sont positives avec le score-S. Dans l'étude de Cuppens et al, on remarque que 58,8% des ULMS ressortent positif en immunohistochimie, ce qui contraste avec la sous régulation du gène VIPR2 et la sous expression de VIPR2 en western blot retrouvées⁸¹, cela pose la question de la spécificité de l'anticorps sélectionné.

Nous avons également cherché à comparer le profil immunohistochimique de VIPR2 avec le profil génomique du bras long du chromosome 7 afin d'expliquer la surexpression de VIPR2 retrouvée.

Il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre ces deux profils. Les cas positifs en immunohistochimie pour VIPR2 ne sont pas expliqués, dans notre étude, par une amplification du gène. On peut donc supposer que le mécanisme de contrôle de la surexpression de VIPR2 est au niveau de la transcription et de la régulation épigénétique. Cependant le gène VIPR2 bien qu'étant couvert par 3 sondes, est un gène télomérique dont l'interprétation reste délicate par CGH.

L'application d'un deuxième anticorps monoclonal tel que le MAB SP235, ou dirigé contre une autre partie de VIPR2, ainsi que l'étude des taux de transcrits par RT-PCR renforcerait la signification de l'étude et devrait être effectuée dans de futures recherches.

A notre connaissance aucune autre étude n'avait encore évalué le rôle de VIPR2 en tant que facteur pronostique indépendant en analyse multivariée. Actuellement il n'existe pas dans la littérature de série aussi importante, portant sur l'analyse de VIPR2 dans les ULMS. De plus il est nécessaire de souligner la difficulté à collecter ces tumeurs rares, et ce malgré l'existence de réseau de référence en France (RRePS).

4.2 MESSAGES SECONDAIRES

4.2.1 Choix du score

Le Hscore précédemment utilisé pour l'évaluation de marquage sur des TMA pour les leiomyosarcomes ^{96,98}, est un score détaillé qui rend compte de l'hétérogénéité du marquage immunohistochimique. Bien que la précision de ce score nous ait permis de comparer l'expression de VIPR2 dans la tumeur à celle du myomètre, en pratique, il est long, fastidieux à calculer et reste subjectif. Des études ont montré que les scores extrêmes sont tout à fait reproductibles, mais qu'il y a beaucoup de divergences inter-observateurs dans les scores intermédiaires ¹¹⁴. Le score-S, utilisé dans les cancers du sein et par Cuppens et al ^{81,99,100}, est un score binaire, qui de fait est plus facile d'utilisation en pratique et plus reproductible. Nous n'avons pas montré avec nos résultats de différence dans le rôle pronostique de VIPR2 en fonction du score utilisé. Le score-S apparaît plus adapté pour un travail de routine.

4.2.2 Autres facteurs pronostiques

Dans notre étude, un grand nombre de facteurs pronostiques potentiels ont été examinés. Le facteur pronostique le plus fort de notre cohorte est le stade FIGO. Une tumeur confinée à l'utérus, de stade FIGO I a un impact positif sur l'OS et sur la PFS en analyse univariée et multivariée, ce qui va dans le sens de nombreuses études menée sur le sujet ^{34,40,44,45}.

Sur les analyses multivariées, parmi les paramètres testés, la taille de la tumeur ≤ 5 cm et l'index mitotique ≤ 20 ainsi qu'une expression forte des récepteurs à la progestérone apparaissent comme étant les seuls autres facteurs pronostiques favorables indépendants. Ce qui va dans le sens de différentes études ^{17,54,55}.

Dans notre série, une taille tumorale > 5 cm, ne ressort pas significativement associée à une OS ou PFS raccourcies, mais cette variable ressort indépendante dans une des analyses multivariées, ceci peut être expliqué par le nombre important de tumeurs de stade FIGO I et de taille supérieure à 5cm, de notre cohorte (26/59). Ce résultat confirme les données de plusieurs études disponibles dans la littérature ^{17,33,44,45}.

Un index génomique supérieur à 35 est, dans notre série, un facteur pronostique péjoratif en OS. Il ne montre pas de valeur pronostique en PFS. Ces résultats corroborent ceux des études précédemment réalisées avec ces séries de ULMS^{88,89} bien que dans nos analyses, il ne ressorte pas comme facteur indépendant face aux récepteurs à la progestérone, au VIPR2 et au stade FIGO.

Dans notre étude les paramètres tels que l'âge des patientes, le marquage immunohistochimique p16 et p53 ainsi que l'expression des RE apparaissent peu informatifs en termes de pronostic.

4.3 APPLICATIONS CLINIQUES :

Les ULMS, sont des tumeurs agressives, avec une forte capacité métastatique et un faible taux de survie à 5 ans ²⁷. Ces tumeurs répondent peu favorablement aux traitements par chimiothérapie ou radiothérapie contrairement aux carcinomes, aux tumeurs germinales et aux cancers hématologiques. Il y a donc un besoin d'identifier des molécules candidates pour une thérapie ciblée. Il a été rapporté que des antagonistes du VIP inhibaient significativement la croissance des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), des carcinomes mammaires, de la prostate et du pancréas in vitro et in vivo^{112,115,116}. VIPR2 pourrait donc être une nouvelle cible thérapeutique dans les ULMS.

4.4 CONCLUSION :

En conclusion, nous présentons ce qui constitue la première étude, à notre connaissance, évaluant le rôle pronostique de l'expression protéique de *VIPR2* dans les ULMS à ce jour. Nos données suggèrent que l'expression de *VIPR2* est un facteur pronostique péjoratif indépendant dans les ULMS. Une évaluation plus approfondie dans de futures études serait nécessaire pour comprendre le rôle potentiel de *VIPR2* en tant que facteur pronostic et/ou cible thérapeutique dans les ULMS.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Wheeler PR, Young B, O'Dowd G, et al. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheeler. Bruxelles: De Boeck supérieur, 2015.
- 2 Binder Foucard F, Belot A, Delafosse P, et al. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim - Partie 1 : tumeurs solides. , 2013.
- 3 Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, eds. WHO classification of tumours of female reproductive organs, 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.
- 4 Gadducci A, Cosio S, Romanini A, et al. The management of patients with uterine sarcoma: a debated clinical challenge. Crit Rev Oncol Hematol 2008;65:129–142.
- 5 Brooks SE, Zhan M, Cote T, et al. Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis of 2677 cases of uterine sarcoma 1989–1999. Gynecol Oncol 2004;93:204–208.
- 6 Nucci MR. Practical issues related to uterine pathology: endometrial stromal tumors. Mod Pathol 2016;29:S92–S103.
- 7 Bennett JA, Nardi V, Rouzbahman M, et al. Inflammatory myofibroblastic tumor of the uterus: a clinicopathological, immunohistochemical, and molecular analysis of 13 cases highlighting their broad morphologic spectrum. Mod Pathol 2017;30:1489–1503.
- 8 Croce S, Kock L de, Boshari T, et al. Uterine Tumor Resembling Ovarian Sex Cord Tumor (utrosct) Commonly Exhibits Positivity With Sex Cord Markers Foxl2 and Sf-1 but Lacks *foxl2* and *dicer1* Mutations. Int J Gynecol Pathol 2016;35:301–308.
- 9 Chiang S, Staats PN, Senz J, et al. Foxl2 Mutation is Absent in Uterine Tumors Resembling Ovarian Sex Cord Tumors. Am J Surg Pathol 2015;39:618–623.
- 10 Fadare O. Heterologous and Rare Homologous Sarcomas of the Uterine Corpus: A Clinicopathologic Review. Adv Anat Pathol 2011;18:60–74.
- 11 Schoolmeester JK, Carlson J, Keeney GL, et al. Alveolar Soft Part Sarcoma of the Female Genital Tract: A Morphologic, Immunohistochemical, and Molecular Cytogenetic Study of 10 Cases With Emphasis on its Distinction From Morphologic Mimics. Am J Surg Pathol 2017;41:622–632.
- 12 Schoolmeester JK, Howitt BE, Hirsch MS, et al. Perivascular Epithelioid Cell Neoplasm (pecoma) of the Gynecologic Tract: Clinicopathologic and Immunohistochemical Characterization of 16 Cases. Am J Surg Pathol 2014;38:176–188.

- 13 Schoolmeester JK, Dao LN, Sukov WR, et al. TFE3 Translocation Associated Perivascular Epithelioid Cell Neoplasm (PEComa) of the Gynecologic Tract: Morphology, Immunophenotype, Differential Diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2015;39:394–404.
- 14 Harlow BL, Weiss NS, Lofton S. The epidemiology of sarcomas of the uterus. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:399–402.
- 15 Toro JR, Travis LB, Wu HJ, et al. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978–2001: An analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer*;119:2922–2930.
- 16 D’Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: A review. *Gynecol Oncol* 2010;116:131–139.
- 17 Abeler VM, Røyne O, Thoresen S, et al. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology* 2009;54:355–364.
- 18 Ip PPC, Cheung ANY. Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:691–704.
- 19 Oliva E, Carcangiu M., Carinelli S, et al. Mesenchymal tumours. Leiomyosarcoma. In: Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, editors. *WHO classification of tumours of female reproductive organs*, 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. p. 139–141.
- 20 Parra-herran C, Schoolmeester JK, Yuan L, et al. Myxoid Leiomyosarcoma of the Uterus: A Clinicopathologic Analysis of 30 Cases and Review of the Literature With Reappraisal of Its Distinction From Other Uterine Myxoid Mesenchymal Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2016;40:285–301.
- 21 Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol* 1994;18:535–558.
- 22 Oliva E. Practical issues in uterine pathology from banal to bewildering: the remarkable spectrum of smooth muscle neoplasia. *Mod Pathol* 2015;29:S104–S120.
- 23 Oliva E, Carcangiu M., Carinelli S, et al. Mesenchymal tumours. Smooth muscle tumour of uncertain malignant potential. In: Kurman R., Herrington C., Young R., editors. *WHO Classification of tumours of Female reproductive organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. p. 135–147.
- 24 Lim D, Alvarez T, Nucci MR, et al. Interobserver variability in the interpretation of tumor cell necrosis in uterine leiomyosarcoma. *Am J Surg Pathol* 2013;37:650–658.
- 25 Hadoux J, Morice P, Lhommé C, et al. Léiomyosarcomes utérins : épidémiologie, histologie, biologie, diagnostic, pronostic et traitement. *Bull Cancer (Paris)* 2013;100:903–915.

- 26 Oliva E, Young RH, Amin MB, et al. An Immunohistochemical Analysis of Endometrial Stromal and Smooth Muscle Tumors of the uterus: A Study of 54 Cases Emphasizing the Importance of Using a Panel Because of Overlap in Immunoreactivity for Individual Antibodies. *Am J Surg Pathol* 2002;26:403–412.
- 27 Hosh M, Antar S, Nazzal A, et al. Uterine Sarcoma: Analysis of 13,089 Cases Based on Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 2016;26:1098–1104.
- 28 Lange S, Pluchino N, Fehlmann A, et al. Prevalence of undiagnosed uterine leiomyosarcoma in women undergoing hysterectomy or myomectomy for benign indications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.06.029.
- 29 Pritts EA. The prevalence of occult leiomyosarcoma in women undergoing presumed fibroid surgery and outcomes after morcellation: *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;:1.
- 30 Ricci S, Stone RL, Fader AN. Uterine leiomyosarcoma: Epidemiology, contemporary treatment strategies and the impact of uterine morcellation. *Gynecol Oncol* 2017;145:208–216.
- 31 Lavie O, Barnett-Griness O, Narod SA, et al. The risk of developing uterine sarcoma after tamoxifen use. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:352–356.
- 32 Felix AS, Cook LS, Gaudet MM, et al. The etiology of uterine sarcomas: a pooled analysis of the epidemiology of endometrial cancer consortium. *Br J Cancer* 2013;108:727–734.
- 33 Seagle B-LL, Sobocki-Rausch J, Strohl AE, et al. Prognosis and treatment of uterine leiomyosarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol* 2017;145:61–70.
- 34 Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. *Cancer* 2008;112:820–830.
- 35 Nasioudis D, Chapman-Davis E, Frey M, et al. Safety of ovarian preservation in premenopausal women with stage I uterine sarcoma. *J Gynecol Oncol* 2017;28. doi:10.3802/jgo.2017.28.e46.
- 36 Si M, Jia L, Song K, et al. Role of Lymphadenectomy for Uterine Sarcoma: A Meta-Analysis. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 2017;27:109–116.
- 37 Littell RD, Tucker L-Y, Raine-Bennett T, et al. Adjuvant gemcitabine-docetaxel chemotherapy for stage I uterine leiomyosarcoma: Trends and survival outcomes. *Gynecol Oncol* 2017;147:11–17.
- 38 Reed NS, Mangioni C, Malmström H, et al. Phase III randomised study to evaluate the role of adjuvant pelvic radiotherapy in the treatment of uterine sarcomas stages I and II: An European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Group Study (protocol 55874). *Eur J Cancer* 2008;44:808–818.

- 39 Bartosch C, Afonso M, Pires-Luís AS, et al. Distant Metastases in Uterine Leiomyosarcomas: The Wide Variety of Body Sites and Time Intervals to Metastatic Relapse. *Int J Gynecol Pathol* 2017;36:31–41.
- 40 Gadducci A. Prognostic factors in uterine sarcoma. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:783–795.
- 41 Zivanovic O, Leitao MM, Iasonos A, et al. Stage-Specific Outcomes of Patients With Uterine Leiomyosarcoma: A Comparison of the International Federation of Gynecology and Obstetrics and American Joint Committee on Cancer Staging Systems. *J Clin Oncol* 2009;27:2066–2072.
- 42 Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet* 2009;104:177–178.
- 43 Giuntoli RL, Lessard-Anderson CR, Gerardi MA, et al. Comparison of current staging systems and a novel staging system for uterine leiomyosarcoma. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 2013;23:869–876.
- 44 Pellanda AF, De Bari B, Deniaud-Alexandre E, et al. Outcome and prognostic factors in 110 consecutive patients with primary uterine leiomyosarcoma: A Rare Cancer Network study. *Chin J Cancer Res* 2017;29:521–532.
- 45 Giuntoli RL, Metzinger DS, DiMarco CS, et al. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy☆. *Gynecol Oncol* 2003;89:460–469.
- 46 Pautier P, Genestie C, Rey A, et al. Analysis of clinicopathologic prognostic factors for 157 uterine sarcomas and evaluation of a grading score validated for soft tissue sarcoma. *Cancer* 2000;88:1425–1431.
- 47 Zivanovic O, Jacks LM, Iasonos A, et al. A nomogram to predict postresection 5-year overall survival for patients with uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2012;118:660–669.
- 48 Iasonos A, Keung EZ, Zivanovic O, et al. External validation of a prognostic nomogram for overall survival in women with uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2013;119:1816–1822.
- 49 Akhan SE, Yavuz E, Tecer A, et al. The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas. A clinicopathologic study. *Gynecol Oncol* 2005;99:36–42.
- 50 Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, et al. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine leiomyosarcoma and correlation with different clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 2003;23:729–732.
- 51 Hewedi IH, Radwan NA, Shash LS. Diagnostic value of progesterone receptor and p53 expression in uterine smooth muscle tumors. *Diagn Pathol* 2012;7:1.

- 52 Liang Y, Zhang X, Chen X, et al. Diagnostic value of progesterone receptor, p16, p53 and pHH3 expression in uterine atypical leiomyoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:7196–7202.
- 53 Leitaó MM, Soslow RA, Nonaka D, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 2004;101:1455–1462.
- 54 Leitaó MM, Hensley ML, Barakat RR, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors and outcomes in patients with newly diagnosed uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* 2012;124:558–562.
- 55 Davidson B, Kjærøeng ML, Førstund M, et al. Progesterone Receptor Expression Is an Independent Prognosticator in FIGO Stage I Uterine Leiomyosarcoma. *Am J Clin Pathol* 2016;145:449–458.
- 56 Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004;114:1299–1307.
- 57 Ip PP, Lim D, Cheung ANY, et al. Immunoexpression of p16 in uterine leiomyomas with infarct-type necrosis: an analysis of 35 cases. *Histopathology* 2017;71:743–750.
- 58 O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2006;13:8–15.
- 59 Kawaguchi Ken-ichi, Oda Yoshinao, Saito Tsuyoshi, et al. Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J Pathol* 2003;201:487–495.
- 60 Bodner-Adler B, Bodner K, Czerwenka K, et al. Expression of p16 protein in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis. *Gynecol Oncol* 2005;96:62–66.
- 61 Kanayama S, Oi H, Kawaguchi R, et al. Immunohistochemical Analysis of p16 Expression in Uterine Smooth Muscle Tumors. *Open J Obstet Gynecol* 2015;05:688–697.
- 62 Chen L, Yang B. Immunohistochemical Analysis of P16, P53, and Ki-67 Expression in Uterine Smooth Muscle Tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27:326–332.
- 63 Atkins KA, Arronte N, Darus CJ, et al. The Use of p16 in enhancing the histologic classification of uterine smooth muscle tumors. *Am J Surg Pathol* 2008;32:98–102.
- 64 Ünver NU, Acikalin MF, Öner Ü, et al. Differential expression of P16 and P21 in benign and malignant uterine smooth muscle tumors. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284:483–490.
- 65 Cao HY, Yang S, Wang S, et al. Is differential expression of p16INK4a based on the classification of uterine smooth muscle tumors associated with a different prognosis? A meta-analysis. *Genet Mol Res GMR* 2017;16. doi:10.4238/gmr16019481.
- 66 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–310.

- 67 Nenutil R, Smardova J, Pavlova S, et al. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* 2005;207:251–259.
- 68 Layfield LJ, Liu K, Dodge R, et al. Uterine Smooth Muscle Tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:221–227.
- 69 Niemann TH, Raab SS, Lenel JC, et al. p53 protein overexpression in smooth muscle tumors of the uterus. *Hum Pathol* 1995;26:375–379.
- 70 Blom R, Guerrieri C, Stål O, et al. Leiomyosarcoma of the Uterus: A Clinicopathologic, DNA Flow Cytometric, p53, and mdm-2 Analysis of 49 Cases. *Gynecol Oncol* 1998;68:54–61.
- 71 Abeshouse A, Adebamowo C, Adebamowo SN, et al. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell* 2017;171:950-965.e28.
- 72 Tsuyoshi H, Yoshida Y. Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Cancer Sci* 2018. doi:10.1111/cas.13613.
- 73 Mittal KR, Chen F, Wei JJ, et al. Molecular and immunohistochemical evidence for the origin of uterine leiomyosarcomas from associated leiomyoma and symplastic leiomyoma-like areas. *Mod Pathol* 2009;22:1303–1311.
- 74 Mäkinen N, Aavikko M, Heikkinen T, et al. Exome Sequencing of Uterine Leiomyosarcomas Identifies Frequent Mutations in TP53, ATRX, and MED12. *PLoS Genet* 2016;12. doi:10.1371/journal.pgen.1005850.
- 75 Pérot G, Croce S, Ribeiro A, et al. MED12 Alterations in Both Human Benign and Malignant Uterine Soft Tissue Tumors. *PLoS ONE* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0040015.
- 76 Makinen N, Mehine M, Tolvanen J, et al. MED12, the Mediator Complex Subunit 12 Gene, Is Mutated at High Frequency in Uterine Leiomyomas. *Science* 2011;334:252–255.
- 77 Yanai H, Wani Y, Notohara K, et al. Uterine leiomyosarcoma arising in leiomyoma: clinicopathological study of four cases and literature review. *Pathol Int* 2010;60:506–509.
- 78 Kim JH, Choi YJ, Kim DC, et al. Leiomyosarcoma arising in a patient with prior mitotically active leiomyoma. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36:187–190.
- 79 Beck AH, Lee C-H, Witten DM, et al. Discovery of molecular subtypes in leiomyosarcoma through integrative molecular profiling. *Oncogene* 2010;29:845–854.
- 80 Guo X, Jo VY, Mills AM, et al. Clinically relevant molecular subtypes in leiomyosarcoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2015;21:3501–3511.
- 81 Cuppens T, Moisse M, Depreeuw J, et al. Integrated genome analysis of uterine leiomyosarcoma to identify novel driver genes and targetable pathways. *Int J Cancer* 2017. doi:10.1002/ijc.31129.

- 82 Davidson B, Micci F. Molecular characteristics of uterine sarcomas. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17:515–522.
- 83 Amant F, de la Rey M, Dorfling CM, et al. PTEN mutations in uterine sarcomas. *Gynecol Oncol* 2002;85:165–169.
- 84 Ahn JW, Coldwell M, Bint S, et al. Array Comparative Genomic Hybridization (Array CGH) for Detection of Genomic Copy Number Variants. *J Vis Exp JoVE* 2015. doi:10.3791/51718.
- 85 Raish M, Khurshid M, Ansari MA, et al. Analysis of molecular cytogenetic alterations in uterine leiomyosarcoma by array-based comparative genomic hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1173–1186.
- 86 Hu J, Khanna V, Jones M, et al. Genomic alterations in uterine leiomyosarcomas: Potential markers for clinical diagnosis and prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;31:117–124.
- 87 Cho Y, Bae S, Koo M, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* 2005;99:545–551.
- 88 Croce S, Ribeiro A, Brulard C, et al. Uterine smooth muscle tumor analysis by comparative genomic hybridization: a useful diagnostic tool in challenging lesions. *Mod Pathol* 2015;28:1001–1010.
- 89 Croce S, Ducoulombier A, Ribeiro A, et al. Genome profiling is an efficient tool to avoid the STUMP classification of uterine smooth muscle lesions: a comprehensive array-genomic hybridization analysis of 77 tumors. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2018. doi:10.1038/modpathol.2017.185.
- 90 Lutz E.M., Shen S., Mackay M., et al. Structure of the human VIPR2 gene for vasoactive intestinal peptide receptor type 2. *FEBS Lett* 1999;458:197–203.
- 91 Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT. VIP/PACAP, and their receptors and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2016;23:38–47.
- 92 Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther* 2009;121:294–316.
- 93 Langer I. Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. *Front Endocrinol* 2012;3. doi:10.3389/fendo.2012.00129.
- 94 Reubi JC, Läderach U, Waser B, et al. Vasoactive Intestinal Peptide/Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide Receptor Subtypes in Human Tumors and Their Tissues of Origin¹. *Cancer Res* 2000;60:3105–3112.
- 95 Yuan J, Jin C, Sha W, et al. A competitive PCR assay confirms the association of a copy number variation in the VIPR2 gene with schizophrenia in Han Chinese. *Schizophr Res* 2014;156:66–70.

- 96 Maiques O, Santacana M, Valls J, et al. Optimal protocol for PTEN immunostaining; role of analytical and preanalytical variables in PTEN staining in normal and neoplastic endometrial, breast, and prostatic tissues. *Hum Pathol* 2014;45:522–532.
- 97 Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab Invest* 2005;85:885–894.
- 98 Yue X, Utsunomiya H, Akahira J-I, et al. Expression of steroid and xenobiotic receptor in uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Oncol Lett* 2013;5:835–839.
- 99 Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1999;17:1474–1481.
- 100 Leake R, Barnes D, Pinder S, et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol* 2000;53:634–635.
- 101 Lassus H, Leminen A, Lundin J, et al. Distinct subtypes of serous ovarian carcinoma identified by p53 determination☆☆☆☆☆Supplementary data associated with this article can be found at doi: 10.1016/S0090-8258(03)00608-5. *Gynecol Oncol* 2003;91:504–512.
- 102 Köbel M, Piskorz AM, Lee S, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res* 2016;2:247–258.
- 103 Köbel M, Ronnett BM, Singh N, et al. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int J Gynecol Pathol* 2018;:1.
- 104 Lagarde P, Pérot G, Kauffmann A, et al. Mitotic Checkpoints and Chromosome Instability Are Strong Predictors of Clinical Outcome in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18:826–838.
- 105 Schulz S, Mann A, Novakhov B, et al. VPAC2 receptor expression in human normal and neoplastic tissues: evaluation of the novel MAB SP235. *Endocr Connect* 2015;4:18–26.
- 106 St. Hilaire R-C, Murthy SN, Kadowitz PJ, et al. Role of VPAC1 and VPAC2 in VIP mediated inhibition of rat pulmonary artery and aortic smooth muscle cell proliferation. *Peptides* 2010;31:1517–1522.
- 107 Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, et al. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2003;111:1339–1346.
- 108 Maruno K, Absood A, Said SI. Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:14373–14378.
- 109 Reubi Jean Claude. In Vitro Evaluation of VIP/PACAP Receptors in Healthy and Diseased Human Tissues: Clinical Implications. *Ann N Y Acad Sci* 2006;921:1–25.

- 110Moody T, Gozes I. Vasoactive Intestinal Peptide Receptors: A Molecular Target in Breast and Lung Cancer. *Curr Pharm Des* 2007;13:1099–1104.
- 111Collado B, Carmena MJ, Sánchez-Chapado M, et al. Expression of vasoactive intestinal peptide and functional VIP receptors in human prostate cancer: Antagonistic action of a growth-hormone-releasing hormone analog. *Int J Oncol* 2005;26:1629–1635.
- 112Szilasi M, Buglyo A, Treszl A, et al. Gene expression of vasoactive intestinal peptide receptors in human lung cancer. *Int J Oncol* 2011;39:1019–1024.
- 113Moody TW, Zia F, Draoui M, et al. A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4345–4349.
- 114van Diest PJ, van Dam P, Henzen-Logmans SC, et al. A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1997;50:801–804.
- 115Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, et al. Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone and Vasoactive Intestinal Peptide Inhibit Tumor Proliferation by Different Mechanisms: Evidence from in Vitro Studies on Human Prostatic and Pancreatic Cancers. *Endocrinology* 2000;141:2120–2128.
- 116Plonowski A, Varga JL, Schally AV, et al. Inhibition of PC-3 human prostate cancers by analogs of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) endowed with vasoactive intestinal peptide (VIP) antagonistic activity. *Int J Cancer*;98:624–629.

ANNEXES

ANNEXE 1 : CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS DU CORPS UTERIN

Tumeurs épithéliales et précurseurs

Précurseurs

Hyperplasie sans atypies
Hyperplasie atypique / carcinome endométrial in situ

Carcinomes endométriaux

Carcinome endométrial
 Différenciation malphigienne
 Villoglandulaire
 Sécrétant
Carcinome mucineux
Carcinome séreux endométrial in situ
Carcinome séreux
Carcinome à cellules claires
Tumeurs neuroendocrines
 Tumeur neuroendocrine de bas grade
 Tumeur carcinoïde
Carcinome neuroendocrine de haut grade
 Carcinome neuroendocrine à petites cellules
 Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
Adénocarcinome mixte
Carcinome indifférencié
Carcinome dédifférencié

Lésions pseudo-tumorales

Polypes
Métaplasies
Réaction d'Arias-Stella
Lésions Lymphome-like

Tumeurs mésenchymateuses

Léiomyomes

Léiomyome cellulaire
Léiomyome à cellules bizarres
Léiomyome mitotiquement actif
Léiomyome hydropique
Léiomyome apoplectique
Lipoléiomyome

Léiomyome épithélioïde
Léiomyome myxoïde
Leiomyome disséquant (cotylédonoïde)
Léiomyomatose diffuse
Léiomyomatose intra vasculaire
Léiomyome métastasant

Tumeurs musculaires lisses à potentiel de malignité incertain

Léiomyosarcomes

Léiomyosarcome épithélioïde
Léiomyosarcome myxoïde

Tumeurs du stroma endométrial et apparentées

Nodule du stroma endométrial
Sarcome du stroma endométrial de bas grade
Sarcome du stroma endométrial de haut grade
Sarcome utérin indifférencié
Tumeurs utérines ressemblant aux tumeurs ovariennes des cordons sexuels

Tumeurs mésenchymateuses diverses

Rhabdomyosarcome
Tumeur épithélioïde périvasculaire
 Bénigne
 Maligne

Autres

Tumeurs mixtes épithéliales et mésenchymateuses

Adénomyome
Adénomyome atypique polypoïde
Adénofibrome
Adénosarcome
Carcinosarcome

Diverses tumeurs

Tumeur adénomatoïde
Tumeurs neuroectodermiques
Tumeurs germinales

Tumeurs lymphoïdes et myéloïdes

Tumeurs secondaires

ANNEXE 2 : STADIFICATION FIGO 2009

Stade	
I	Tumeur limitée à l'utérus
IA	Tumeur inférieure ou égale à 5cm
IB	Tumeur supérieure à 5cm
II	Tumeur étendue au pelvis
IIA	Atteinte annexielle
IIB	Extension au tissu pelvien extra-utérin
III	Tumeur étendue à l'abdomen
IIIA	Extension abdominale sur 1 seul site
IIIB	Extension abdominale plus de 1 site
IIIC	Métastase ganglionnaire pelvienne et/ou lombo-aortique
IV	Localisation ou métastases à distance
IVA	Extension à la vessie et/ou au rectum
IVB	Métastase à distance incluant les ganglions extra-abdominaux y compris les ganglions inguinaux

19,42

ANNEXE 3 : CRITERES HISTOLOGIQUES DE STANFORD

TNC	IM ¹	Atypies nucléaires
Focale/extensive	≥ 10	Absentes
Focal/extensive	0	Diffuses modérées à sévères
Pas de nécrose ou nécrose hyaline	≥ 10	Diffuses modérées à sévères

¹ Nombre de mitoses/ 10 champs au fort grossissement (x40)

ANNEXE 4 : VERIFICATION DES HYPOTHESES DE LA PROPORTIONNALITE DES RISQUES RELATIFS PAR LE TEST DE SCHOENEFELD

Test de proportionnalité de l'analyse multivariée en OS des données clinico- histologiques (cf tableau 17)

Variable	Pr > Khi ²
Age	0,148
Taille	0,395
FIGO	0,487
Atypies	0,609
Nécrose	1,000
IM	0,677
Global	0,654

Test de proportionnalité de l'analyse multivariée en PFS des données clinico- histologiques (cf tableau 18)

Variable	Pr > Khi ²
Age	0,920
Taille	0,867
FIGO	0,637
Nécrose	0,829
IM	0,256
Global	0,921

Test de proportionnalité de l'analyse multivariée en OS avec le Hscore (cf tableau 22)

Variable	Pr > Khi ²
Taille	0,394
FIGO	0,432
IM	0,773
GI	0,572
Hscore	0,591
RP	0,429
Global	0,885

Test de proportionnalité de l'analyse multivariée en OS avec le scor-S (cf tableau 22)

Variable	Pr > Khi ²
Taille	0,398
FIGO	0,354
IM	0,891
GI	0,484
Score-S	0,563
RP	0,446
Global	0,833

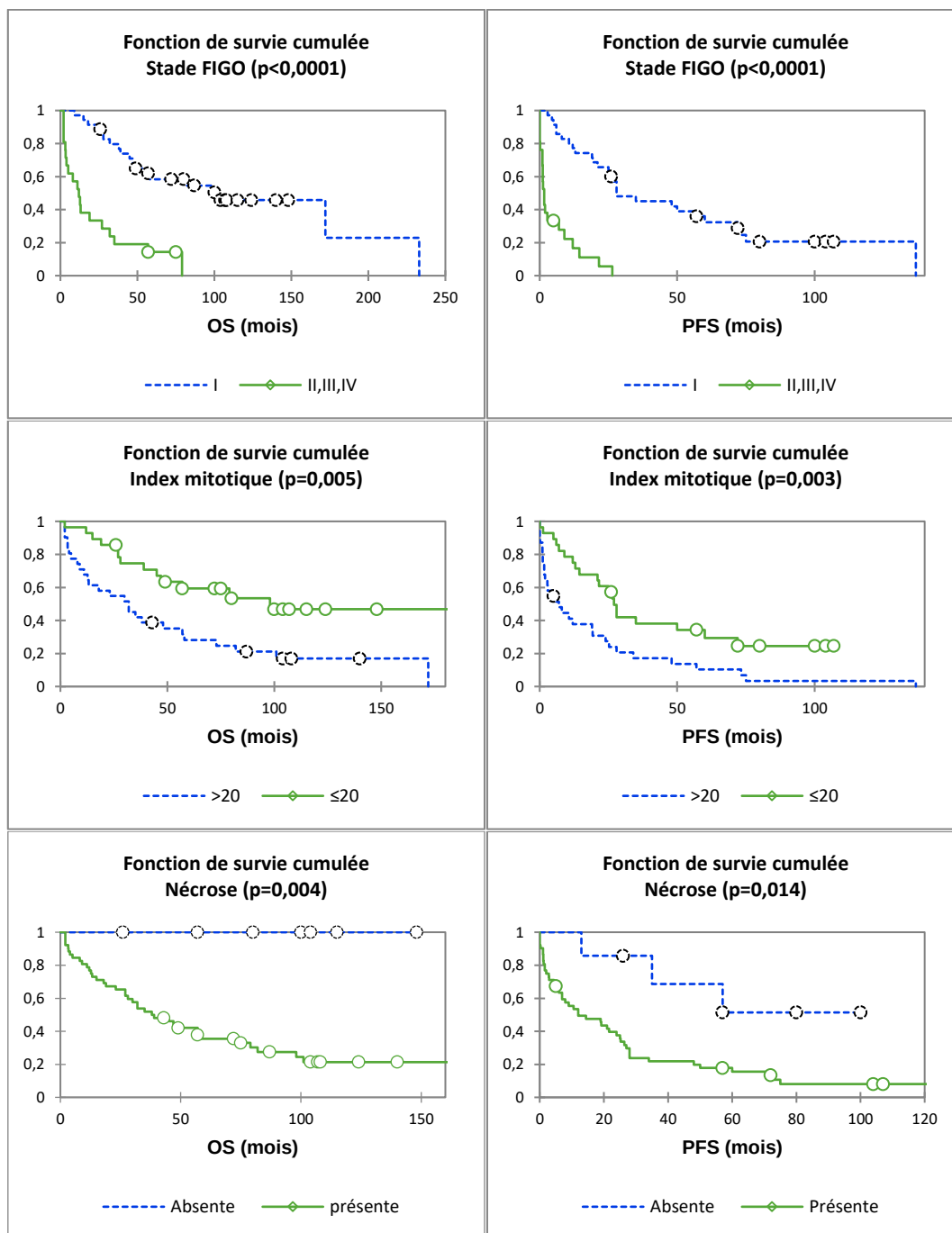
Test de proportionnalité de l'analyse multivariée en PFS avec le Hscore (cf tableau 23)

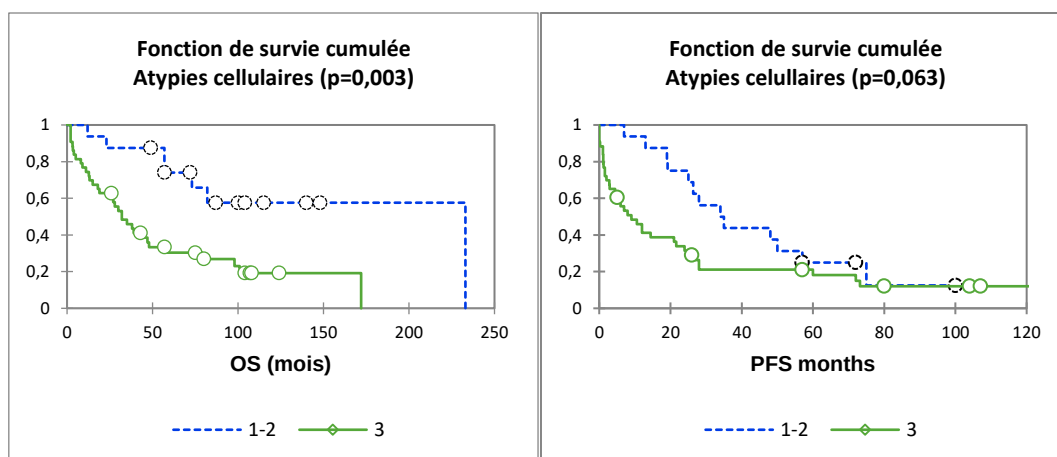
Variable	Pr > Khi ²
Taille	0,744
FIGO	0,438
IM	0,179
Hscore	0,505
RP	0,169
Global	0,725

Test de proportionnalité de l'analyse multivariée en PFS avec le score-S (cf tableau 23)

Variable	Pr > Khi ²
Taille	0,633
FIGO	0,276
IM	0,119
Score-S	0,505
RP	0,111
Global	0,634

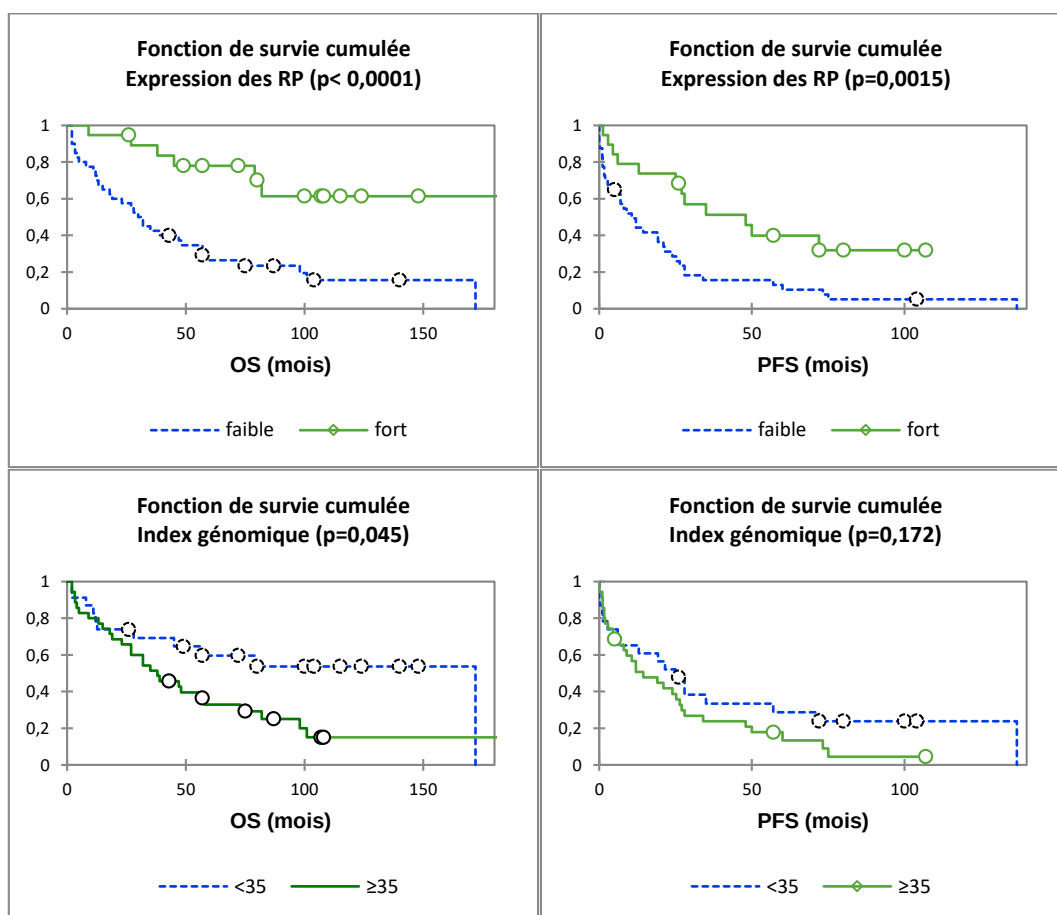
ANNEXE 5 : COURBES DE SURVIES DES PARAMETRES CLINICO-HISTOLOGIQUES





Selon la méthode de Kaplan Meier avec comparaison par test du Log-Rank pour le stade FIGO, l'IM, les atypies cytonucléaires, et la présence de nécrose.

ANNEXE 6 : COURBES DE SURVIES DES PARAMETRES IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET GENOMIQUES



Selon la méthode de Kaplan Meier avec comparaison par test du Log-Rank pour l'expression des récepteurs à la progestérone et l'index génomique.

ANNEXE 7 : PROFIL CGH DU CHROMOSOME 7Q DES CAS DE LA COHORTE

Patient n°	IHC VIPR2	Profil CGH en 7q	Patient n°	IHC VIPR2	Profil CGH en 7q
1	N	normal	30	N	normal
2	N	normal	31	N	normal
3	N	normal	32	N	normal
4	P	normal	33	N	PERTE
5	P	normal	34	N	normal
6	N	normal	35	N	normal
7	P	normal	36	P	PERTE
8	N	normal	37	P	normal
9	N	normal	38	N	Non interprétable
10	P	normal	39	P	normal
11	N	normal	40	P	PERTE
12	N	normal	41	N	PERTE
13	P	normal	42	P	normal
14	P	normal	43	N	normal
15	N	normal	44	N	normal
16	N	normal	45	N	normal
17	P	normal	46	P	normal
18	N	PERTE	47	N	normal
19	P	PERTE	48	P	normal
20	N	normal	49	N	normal
21	P	normal	50	N	normal
22	P	PERTE	51	N	PERTE
23	P	GAIN	52	N	normal
24	P	normal	53	N	normal
25	P	PERTE	54	N	normal
26	P	PERTE	55	P	PERTE
27	P	normal	56	P	PERTE
28	N	normal	57	P	normal
29	P	normal	58	P	PERTE
			59	N	GAIN

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.