



HAL
open science

Mise au point d'un test de dépistage des tumeurs
séreuses de haut grade chez des femmes à risques.
Analyse simultanée des aneuploïdies (CNV) et du statut
TP53 sur ADN FFPE tumoral et ADN plasmatisque
circulant par capture NGS Oneseq

Louis Lebreton

► To cite this version:

Louis Lebreton. Mise au point d'un test de dépistage des tumeurs séreuses de haut grade chez des femmes à risques. Analyse simultanée des aneuploïdies (CNV) et du statut TP53 sur ADN FFPE tumoral et ADN plasmatisque circulant par capture NGS Oneseq. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02937649

HAL Id: dumas-02937649

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02937649>

Submitted on 14 Sep 2020

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.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse n°56

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLÔME D'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par LEBRETON Louis

Né le 17/02/1993 à Rouen

Le 05/06/2020

**Mise au point d'un test de dépistage des tumeurs séreuses
de haut grade chez des femmes à risques.**

**Analyse simultanée des aneuploïdies (CNV) et du statut *TP53* sur ADN FFPE tumoral
et ADN plasmatique circulant par capture NGS Oneseq**

Sous la direction du Professeur Nicolas SEVENET

Membres du jury :

Pr DUFOURCQ Pascale
Pr ARVEILER Benoît
Dr LONGY Michel
Pr Nicolas SEVENET

Présidente
Examinateur
Examinateur
Directeur

Remerciements :

Pour mes parents : Dans quelle mesure peut-on parler aux êtres chers et disparus sans avoir le sentiment que les mots ne sonnent trop creux dans l'abîme que constituent nos souvenirs ? La disparition est-elle une réalité ? « Je marcherai les yeux fixés sur ma pensée » dit Hugo à Léopoldine, mais aussi à nous lecteurs, émerveillés par le fait que les êtres soient toujours là, qu'on les entende rire pour peu que l'oreille soit bien tendue, qu'on finit par trouver ça délicieux en fermant les yeux, qu'on aime leur parler, qu'on rejette l'idée de mélancolie parce qu'il n'y a plus de raison. Leur souffle a poussé mes ailes dans la rêverie, au milieu de l'immense océan de connaissances offert par la beauté et l'harmonie de notre monde. Tendre la main et souffrir de démystifier les mystères qui s'offrent à nous, beaux et complexes, rouvre délicieusement le dialogue entre nous.

Pour mes frères et sœurs : Pierre, j'ai respecté l'ordre et ai attendu que tu soutiennes ta thèse pour en venir à bout moi aussi. Ceci évoque le lien entre Babyfoot et son père, contre lequel il a essuyé sa seule défaite.. 9 à 10..sans doute par respect généalogique là aussi ! Sur la dernière ligne droite je me sens un peu comme mon « Tal-Rasha » level 83 prêt à en découdre devant le Baal de l'enfer.. Je ne me souviens plus si je l'avais achevé.. peu importe et puis peut être que j'avais quasiment terminé quand Christian a débranché la prise (et pas Freeze)..

Mathilde, pour te donner une idée de la thèse d'exercice en pharmacie, c'est comme effectuer dans la même journée 3 ou 4 allers-retours du 346 au Spar avec la principale intéressée (avant qu'elle s'installe chez Mme C.), chargé de pack de boissons à chaque retour bien sûr ! En résumé → pas facile mais il faut bien le faire ! Puis pour nous c'est facile en pharmacie, on a un diaporama comme support, le manque d'éloquence est compensé, alors je ne fais pas trop le fier !

Jean, cette thèse se déroule au XXI e siècle après JC (REFERENCE), et s'est terminée dans un contexte de remaniements socio-économico-coronaro-pandémiques (REFERENCE), ce qui explique la lutte entre deux mouvances politico-idéologiques jadis confraternelles (REFERENCE) au moment de la première moitié du troisième quart de la seconde république (REFERENCE), et dont les intérêts politiques particuliers ont pris le dessus sur les idéaux diffusés par les premiers penseurs (REFERENCE). L'histoire ça nous gagne !

Guillaume, dans un moment de lâcheté j'aurais pu te demander de me remplacer pour l'oral de cette thèse, puisque la ressemblance physique est, paraît-il, suffisamment prononcée pour ce genre d'amusements. On en sommes-nous du décompte ? Je te rappelle que ma taille s'est arrêtée à 1,79m et qu'elle ne diminuera pas sans le concours d'un tassement vertébral, qui ne saurait être trop précoce pour qui veut conserver sa jeunesse comme la prunelle de ses yeux. Tu en es à 1,76 ? 77 ? Il y a une poussée de croissance autour de 20 ans.. Peut-être qu'en faisant des étirements je saurais rester plus grand ?

À Bernard, Chantal, Aude, Stéphane, Victor, Élise, Aurore, Ronan, Charles, Adeline et ses enfants.

À mes amis,

Olivier, combien de fois m'as-tu conduit ? Certes en voiture longtemps parce que je n'ai décidé de passer mon permis qu'après avoir renoncé à le trouver dans une pochette surprise ou le gagner dans un jeu-concours Pasquier, mais aussi conduit dans la joie de beaucoup de moments passés et .. futurs !

Guillaume et Maëva, maintenant que nous serons collègues de parentalité, nous pouvons nous échanger les bons conseils. 3 mois de différence qu'est-ce ? Romane et XX (pas d'exclusivité ici) seront peut-être complices et saurons être d'aussi fins joueurs de tarot que leurs aïeux ? XX ne trichera pas c'est promis..

Vincent, le comique de répétition m'impose de te remercier pour m'avoir conduit également, et aussi pour un futur barbecue bien grillé et saignant !

Alexia et Maxime, le temps dégagé va me permettre de m'améliorer dans deux domaines : simulation footballistique (de préférence 11 contre 11 et sur gazon) et ponctualité de réponse aux sms.. Alexia je nous revois parler à la campagnarde Islandaise sourde pour comprendre ce que ce sont que ces fruits qui poussent partout dans la pelouse..

Loïc, nous savons que les campings Islandais et l'eau légèrement soufrée renforcent les liens de l'amitié de manière plutôt ostentatoire.. Tout comme tes fabuleux services le 17 août dernier !!

Jean (fac), il y en a eu des tourbillons, ça forge la mémoire et ça nous prouve qu'on n'a pas perdu notre temps, puisqu'on en parle encore !!

Damien et Delphine, je ne peux toujours pas vous dire quelles furent les raisons de ma fugue l'autre soir, pourtant le canapé était confortable..

Thibault et Clément, je ne sais pas si Michel Estrade a réussi à allumer sa livebox depuis le temps..

Jean-Madeleine, avons-nous dépassé la 20^{ème} vague ? Notre rôle était bien établi dans cette ferme (l'un au balcon l'autre à l'escalier), avec des Pringles® comme carburant, et un peu de chance à l'ouverture des boîtes !!

Aux comparses de Baby ! Vivement de futures escarmouches, Julian (ce sera un duel de papas), Kavish, Samuel, et à Bergonié Stéphane, Pierrot, Jean-Marie.

Jessica et Charly, ça vaudra bien une ventrèche entre docteurs, avec des haricots Béarnais peu onéreux.

Cécile, il y a des souvenirs étonnants n'est-ce-pas ?

À mes collègues de travail,

D'abord je souhaite remercier sincèrement ceux qui à l'institut Bergonié m'ont grandement aidé dans l'organisation de ce travail : Nathalie pour les nombreux conseils et pour cet élan que tu m'as toujours aidé à conserver, Jennifer pour les astuces / explications bioinfo, Françoise pour la formation puis les échanges de « piles de CR », Delphine pour ces heures de manipulations techniques d'un professionnalisme remarquable, Françoise Durrieu et Pauline pour les traitements d'échantillons de plasmas, le laboratoire de pathologie moléculaire pour les analyses par SNP array avec Flora, Laetitia, Sabrina pour ses conseils avisés autour de la pathologie tumorale, Isabelle Soubeyran pour m'avoir permis de réaliser les techniques de SNP array.

Je souhaite remercier particulièrement l'équipe de génétique clinique que j'ai côtoyé avec grand plaisir pendant une année complète, l'artificialité de la lumière dans la pièce n'a pas masqué cette constante bienveillance qui flottait librement dans les couloirs du service. Angela, Pierre et Henri, même si nos repas étaient express c'était drôlement bon ! Églantine, Anaïs, Virginie, Élisabeth, Florence, Maïxan, Claire, Emmanuelle pour votre aide et votre gentillesse.

Michel, à plusieurs reprises vos conseils avisés m'ont permis de franchir des paliers « intellectuels » dans l'avancée du travail. Je reconnais avoir beaucoup appris, en peu de temps, notamment sur la manière d'appréhender un problème scientifique et pratique.

Nicolas, il y a environ 9 ans je passai l'UE9 de PACES, et je me demandais ce qu'était ce « NCBI » et ces histoires de « PCR » et « d'enzymes de restriction ». Tes enseignements m'ont grandement formés et donnés le goût de cette matière si singulière qu'est l'Acide Désoxy-riboNucléique.. Permet donc à un étudiant en fin de cursus de te remercier pour cela et bien sûr pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans des conditions idéales.

Je remercie tous les enseignants de l'université de Bordeaux (et d'ailleurs), mais aussi le service de génétique de l'hôpital Pellegrin qui m'a donné goût à ce milieu durant l'externat (Benoît, Eulalie et toute l'équipe), également Mathieu. Les équipes du laboratoire de génétique fonctionnelle des maladies infectieuses à l'institut Pasteur, avec qui j'ai tant appris sous le beau ciel Parisien durant une année de master 2. L'équipe actuelle de Biochimie, et les co-internes.

Merci à Pascale Dufourcq de présider mon jury de thèse, et pour les nombreux enseignements durant le cursus de pharmacie.

Pour finir,

Aux personnes qui nous ont sauvé : Georges, Laurence, Arnaud, Martine, François et d'autres.

A Anatole et Hélène, pourrions-nous assister à l'ouverture du nouveaux Régent de Marcheprime ?? Il y aura une troisième invitée..

A Charlotte et Sébastien, l'affection que je vous porte est à la hauteur de votre gentillesse envers moi. Et voici un nouveau prétexte pour nous réunir avec plaisir.

A Camille, « étoile de mes yeux, soleil de ma nature », à l'heure où le blé brûlé deviendra paille, les vœux exaucés ouvriront leur voilure, et nous bercerons nuits et jours où que l'on aille.

Table des matières

1	Introduction.....	9
1.1	Epidémiologie des cancers de l’ovaire	9
1.2	Classification anatomo-pathologique des tumeurs de l’ovaire	10
1.3	Carcinogenèse des HGSC :.....	11
1.4	HGSC et hérédité	16
1.4.1	Généralités :	16
1.4.2	Syndrome familial sein – ovaire HBOC et gènes <i>BRCA1</i> - <i>BRCA2</i> :.....	17
1.4.3	Autres gènes impliqués dans la prédisposition héréditaire des HGSC.....	24
1.4.4	Consultations d’oncogénétique	25
1.5	Chirurgie prophylactique des patientes mutées et risque résiduel de HGSC.....	26
1.6	Dépistage des HGSC par Antigène CA-125 et échographie trans-vaginale	27
1.7	ADN tumoral circulant.....	28
1.7.1	Découverte	28
1.7.2	Aspects biologiques.....	29
1.7.3	Test de détection des HGSC par l’analyse de cfDNA dans la littérature scientifique : .	30
2	Objectifs du travail de thèse :.....	32
3	Matériels et méthodes	33
3.1	Résumé :.....	33
3.2	Échantillonnage :	34
3.3	Phase pré-analytique :.....	34
3.4	Phase analytique : NGS Oneseq	37
3.5	Phase analytique : SNP-array (Oncoscan)	44
4	Résultats.....	45
4.1	Mise au point de la technique NGS Oneseq sur ADN FFPE :.....	45
4.2	Analyse des échantillons de cfDNA des patientes atteintes de HGSC	50
4.2.1	Recherche d’aneuploïdies :	50
4.2.2	Recherche de mutation <i>TP53</i> dans les échantillons de cfDNA.....	54
5	Discussion.....	55
5.1	Mise au point de l’analyse NGS Oneseq sur ADN FFPE :.....	55
5.2	Analyses sur cfDNA (mutations <i>TP53</i> / aneuploïdies) dans le contexte des HGSC.....	56
5.3	Perspectives :.....	61
6	Conclusion :.....	64
7	ANNEXES	65
7.1	ANNEXE (1/2) : Informations sur les patientes atteintes de HGSC	65
7.2	ANNEXE (2/2) : Anomalies génétiques fréquentes des HGSC publiées par trois articles. ...	66
8	Bibliographie	67

Liste des abréviations / glossaire :

ADN = Acide désoxyribonucléique

Aneuploïdies = nombre anormal de chromosomes, par extension : perte de la diploïdie pour une position génomique donnée

CDB = Cassures double brin

cfDNA= ADN circulant plasmatique libre

CIC : Cortical Inclusion Cysts

ctDNA = ADN tumoral circulant plasmatique

ESP = Early Serous precursor

FFPE = Formalin Fixed Paraffin embedded

HES = Hématine Éosine Safran

HGSC = High Grade Serous Carcinoma (tumeurs séreuses de haut grade)

HR = Homologous Recombination (Réparation homologue)

NGS = Next Generation Sequencing (séquençage de nouvelle génération)

NHEJ = Non-Homologous End Joining (Réparation non homologue)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pan-génomique = génome entier

pb = paires de bases

Profondeur de lecture = nombre de lectures de séquences en NGS (ou « reads ») à une position génomique donnée

Read = lecture d'une séquence en NGS. Un read correspond à un cluster de lecture en technologie Illumina.

STIC = Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma

STIL = Serous Tubal Intraepithelial Lesion

sWGS = shallow whole genome sequencing

WGS = Whole Genome Sequencing

Table des Figures et tableaux

Figure 1 : Incidences des cancers de l’ovaire répertoriés en 2018 dans le monde.	9
Figure 2: Stade de la maladie au diagnostic (A) et survie à 5 ans pour chaque stade (B).....	9
Figure 3 : Sous types histologiques des tumeurs épithéliales de l’ovaire	10
Figure 4 : Hypothèses concernant la carcinogenèse des HGSC.....	11
Figure 5 : Aspect des lésions tubaires sur lames HES	13
Figure 6 : Risques cumulés de développer un cancer de l’ovaire en fonction de l’histoire familiale	16
Figure 7 : BRCA1 et BRCA2 : positions chromosomiques des gènes et structures des protéines.....	18
Figure 8 : Fonctionnement du système de réparation homologue et rôle des protéines BRCA.	21
Figure 9 : Risques cumulés de développer un cancer de l’ovaire invasif en fonction de l’âge pour les porteuses d’une mutation délétère sur le gène BRCA1 ou sur le gène BRCA2.	23
Figure 10 : Éléments biologiques concernant l’ADN circulant tumoral	29
Figure 11 : Stratégie expérimentale	33
Figure 12 : Analyse de taille par TapeStation Agilent	36
Figure 13 : Banque de capture NGS Oneseq	38
Figure 14 : Étapes de la préparation de librairie SureSelectXTLow Input et séquençage Illumina ...	40
Figure 15 : Descriptif de la technique de SNP array Oncoscan	44
Figure 16 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d’ADN FFPE par SNP array.....	45
Figure 17 : Aneuploïdies par gène d’intérêt dans les ADN FFPE analysés par SNP array	46
Figure 18 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d’ADN FFPE par DECon (NGS Oneseq).	46
Figure 19 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d’ADN FFPE par Surecall (NGS Oneseq)	47
Figure 20 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d’ADN FFPE par CNAclinic (NGS Oneseq). .	47
Figure 21 : Concordances des aneuploïdies sur ADN FFPE par NGS Oneseq et par SNP array	48
Figure 22 : Comparaison des aneuploïdies retrouvées sur les ADN FFPE des HGSC par CNAclinic avec les données du TCGA	49
Figure 23 : Modélisation des zones d’aneuploïdies détectables dans les échantillons de cfDNA.....	51
Figure 24 : Sensibilité de détection des aneuploïdies après dilutions in silico de l’ADN FFPE 1.8. ...	53
Figure 25 : Variabilité des proportions de ctDNA dans le plasma de patientes atteintes d’HGSC (avant traitement).	59
Tableau 1 : Caractéristiques comparées des lésions tubaires et des HGSC.....	14
Tableau 2 : Lésions retrouvées sur les différents modèles murins de Perets et al	14
Tableau 3 : Caractéristiques comparées des principaux mécanismes de réparation des cassures doubles brins.....	20
Tableau 4 : Recommandations de l’âge d’annexectomie bilatérale en fonction du gène muté	26
Tableau 5 : Effets du suivi par antigène-émie CA-125 et par échographie trans-vaginale sur la mortalité par cancer de l’ovaire (adapté de Henderson et collègues 54)	27
Tableau 6 : Quantification des échantillons de cfDNA	35
Tableau 7 : Pourcentages de ctDNA requis pour détecter les ploïdies maximale et minimale par échantillon d’ADN tumoral.	52
Tableau 8 : Fréquences alléliques des mutations délétères du gène TP53 retrouvées dans les échantillons d’ADN FFPE de cfDNA et d’ADN leucocytaire.	54
Tableau 9 : Travaux scientifiques portant sur la recherche de mutation somatique du gène TP53 dans des échantillons de cfDNA chez des patientes atteintes de HGSC.....	56

1 Introduction

1.1 Epidémiologie des cancers de l’ovaire

L’incidence des cancers de l’ovaire en France en 2018 est de 7,5 pour 100 000 personnes (5193 nouveaux cas), ce qui en fait la 8^{ème} cause de cancer chez les femmes (1). Ce paramètre est plus élevé aux Etats-Unis (11,4 pour 100 000)(2) et en Europe de l’Est, mais plus faible dans les pays d’Asie centrale et dans les pays en voie de développement (figure 1). Source : OMS

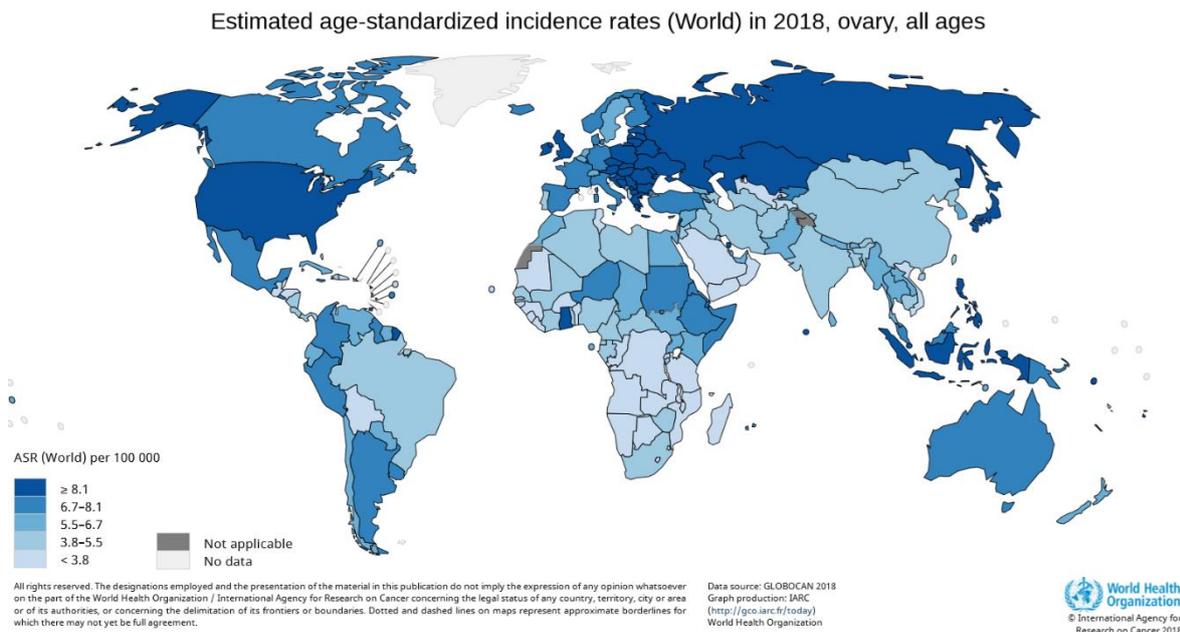
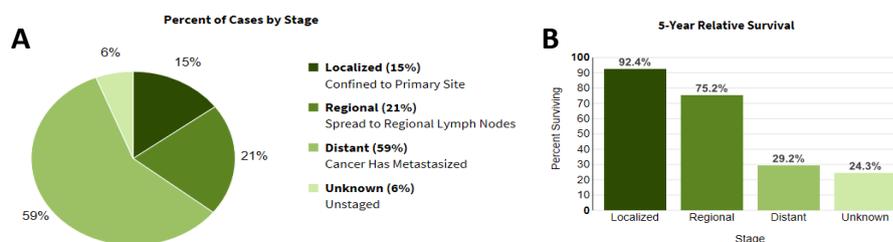


Figure 1 : Incidences des cancers de l’ovaire répertoriés en 2018 dans le monde.

L’âge médian au diagnostic est de 68 ans(2) et le taux de mortalité en France en 2018 est de 3,8 pour 100 000 personnes, ce qui en fait la 5^{ème} cause de mortalité par cancer chez la femme et la 1^{ère} parmi les cancers gynécologiques(3).

La survie à 5 ans du cancer de l’ovaire a été estimée à 43% en France (période 2005-2010), celle-ci chutant à 36% dans la tranche d’âge des 65-75 ans (3).

Le mauvais pronostic est en partie expliqué par un diagnostic à un stade avancé dans 60% des cas (4) (figure 2).



Source : statistiques américaines : National cancer institute, Surveillance, Epidemiology, and End Results

Figure 2: Stade de la maladie au diagnostic (A) et survie à 5 ans pour chaque stade (B).

1.2 Classification anatomo-pathologique des tumeurs de l’ovaire

La classification OMS la plus récente des tumeurs de l’ovaire date de 2014(5). Celle-ci permet de classer la diversité des tumeurs de l’ovaire dans de nombreux sous types, dont les tumeurs dites « épithéliales » (figure 3) qui représentent plus de 90% des tumeurs malignes de l’ovaire(6). Au sein de cette catégorie, les **tumeurs séreuses de haut grade** sont les plus sévères car elles représentent à elles seules 70% des tumeurs malignes de l’ovaire (6). Nous désignerons ces tumeurs par le sigle « **HGSC** » pour *High Grade Serous Carcinoma*.

Epithelial tumours		Clear cell tumours	
Serous Tumours	référence	Benign	référence
Benign		Clear cell cystadenoma	8443/0
Serous cystadenoma	8441/0	Clear cell adenofibroma	8313/0
Serous adenofibroma	9014/0	Borderline	
Serous surface papilloma	8461/0	Clear cell borderline tumour / Atypical proliferative clear cell tumour	8313/1
Borderline		Malignant	
Serous borderline tumour / Atypical proliferative serous tumour	8442/1	Clear cell carcinoma	8310/3
Serous borderline tumour - micropapillary variant / Non-invasive low-grade serous carcinoma	8460/2*	Brenner tumours	
Malignant		Benign	
Low-grade serous carcinoma	8460/3	Brenner tumour	9000/0
High-grade serous carcinoma	8461/3	Borderline	
		Borderline Brenner tumour / Atypical proliferative Brenner tumour	9000/1
Mucinous tumours		Malignant	
Benign		Malignant Brenner tumour	9000/3
Mucinous cystadenoma	8470/0	Seromucinous tumours	
Mucinous adenofibroma	9015/0	Benign	
Borderline		Seromucinous cystadenoma	8474/0*
Mucinous borderline tumour / Atypical proliferative mucinous tumour	8472/1	Seromucinous adenofibroma	9014/0*
Malignant		Borderline	
Mucinous carcinoma	8480/3	Seromucinous borderline tumour / Atypical proliferative seromucinous tumour	8474/1*
Endometrioid tumours		Malignant	
Benign		Seromucinous carcinoma	8474/3*
Endometriotic cyst		Undifferentiated carcinoma	8020/3
Endometrioid cystadenoma	8380/0		
Endometrioid adenofibroma	8381/0		
Borderline			
Borderline endometrioid tumour / Atypical proliferative endometrioid tumour	8380/1		
Malignant			
Endometrioid carcinoma	8380/3		

Figure 3 : Sous types histologiques des tumeurs épithéliales de l’ovaire

(Adapté de l’OMS 2014) Encadré en rouge les tumeurs séreuses de haut grade (HGSC pour High Grade Serous Carcinoma)

Les HGSC sont diagnostiqués par différentes approches :

- **Morphologique** (macroscopie et histologie) (non détaillé ici) (5).
- **Immunohistochimique** : Marquages fréquemment positifs : WT1 (92% des cas), p53 (93% des cas), PAX8 (98% des cas), CDKN2A (60% des cas)(5).
- **Génétique** : mutation ponctuelle délétère du gène *TP53* dans 95% des cas et présence de nombreuses aneuploïdies(5).

1.3 Carcinogénèse des HGSC :

L'origine tissulaire des HGSC fait l'objet de différentes hypothèses dans la littérature :

- **Origine ovarienne** (figure 4A)
- **Origine tubaire (trompes de Fallope)** (figure 4B)
- **Échappement des précurseurs.** (figure 4C)

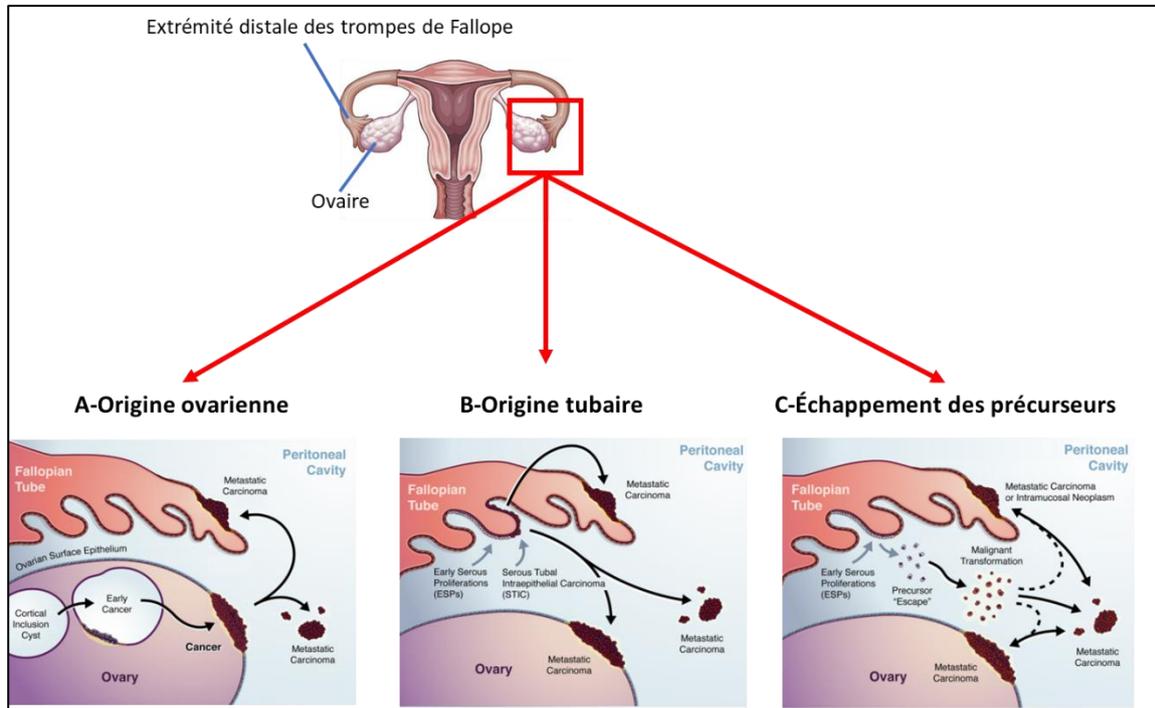


Figure 4 : Hypothèses concernant la carcinogénèse des HGSC

(A) Origine ovarienne. Les précurseurs des HGSC proviennent de l'ovaire, soit sous la forme de *Cortical Inclusion Cyst* (CIC), soit à partir de la surface épithéliale de l'ovaire (non montré sur le schéma) **(B) Origine tubaire.** Les lésions proviennent des trompes de Fallope et forment un continuum des *Early Serous proliferation* (ESP) → *Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma* (STIC) → HGSC. **(C) Échappement des précurseurs.** Les ESP intra-tubaire acquièrent un caractère malin sans passer par un stade intermédiaire, ESP → HGSC. (Adapté de Soong et al (7))

A. Origine ovarienne

L'hypothèse de l'origine ovarienne a été proposée par Fathalla en 1971(8) et en 2013(9) , stipulant que l'épithélium de surface ovarien constitue le tissu d'origine des tumeurs de type HGSC retrouvées sur les ovaires. Les ovulations auraient un rôle pro-carcinogène sur le tissu épithélial (8,9), provoquant une augmentation du risque tumoral chez les femmes nullipares (ovulations nombreuses à l'échelle de la vie) et une diminution du risque par la prise de contraceptifs oraux (blocage des ovulations). Une des études citées rapporte une baisse du risque de tumeurs de l'ovaire de 50% pour une prise de contraceptifs oraux d'au moins 10 ans(10).

De plus, des lésions bénignes intra-ovarienne appelées inclusions cystiques ou « cortical invasion cysts » (CIC) sont parfois retrouvées dans les ovaires lors de l'examen anatomo-pathologique et ont été considérées comme des lésions pré-cancéreuses(11). Cependant, le caractère pré-cancéreux de ces lésions n'est pas étayé dans la littérature, ni sur le plan histologique (absence de continuum

morphologique avec les lésions tumorales) ni sur le plan phylogénétique (entre les « CIC » et les HGSC) (12).

Des expériences de transgénèse ciblée au sein des cellules épithéliales ovariennes ont tenté de reproduire la carcinogenèse chez la souris(11). Certaines anomalies génétiques ont provoqué l'apparition de tumeurs de type HGSC, notamment l'inactivation des gènes *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, mais aussi l'activation forcée de *HOXA9* (13) ou l'inactivation de *STK11* (14). Cependant ces études n'ont pas reproduit le phénotype tumoral observé chez les humains (dissémination métastatique) et n'expliquent pas l'absence de lésions précancéreuses liées aux tumeurs HGSC dans les ovaires.

B. Origine tubaire (Trompes de Fallope) :

L'hypothèse de l'origine tubaire stipule que des lésions retrouvées sur l'épithélium des trompes de Fallope constituent les précurseurs à l'origine des HGSC(15) (figure 4B).

• Contexte de la mise en évidence des lésions tubaires :

La découverte du rôle des mutations délétères dans les deux gènes *BRCA* sur la prédisposition génétique aux HGSC a entraîné l'augmentation des gestes d'annexectomies prophylactiques (= ablation chirurgicale des trompes de Fallope et des ovaires)(16). Ce nouveau matériel d'étude a permis de découvrir et d'étudier des lésions hyperplasiques et dysplasiques au sein des trompes de Fallope(17).

• Lésions tubaires :

Les deux principaux types de lésions retrouvées dans les parties distales des trompes de Fallope(18,19) sont :

- les **lésions non dysplasiques** appelées **ESP** (« Early Serous Proliferation ») ou **p53 signature**. L'immunohistochimie montre un marquage fortement positif à la protéine TP53, mais pas d'anomalie morphologique (figure 5A) (20).
- les **lésions dysplasiques**, de deux types selon l'aspect en lame HES : **STIL** (« Serous Tubal Intraepithelial Lesion ») qui conservent une polarisation cellulaire, et les **STIC** (« Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma ») qui perdent la polarisation cellulaire. Ces lésions sont dysplasiques en coloration HES avec un marquage immunohistochimique fortement positif à la protéine TP53 (figure 5B) (20).

Des données immunohistochimiques et phylogénétiques soutiennent l'idée d'une carcinogenèse progressive : **ESP**→ **STIL**→ **STIC**→**HGSC** (tableau 1).

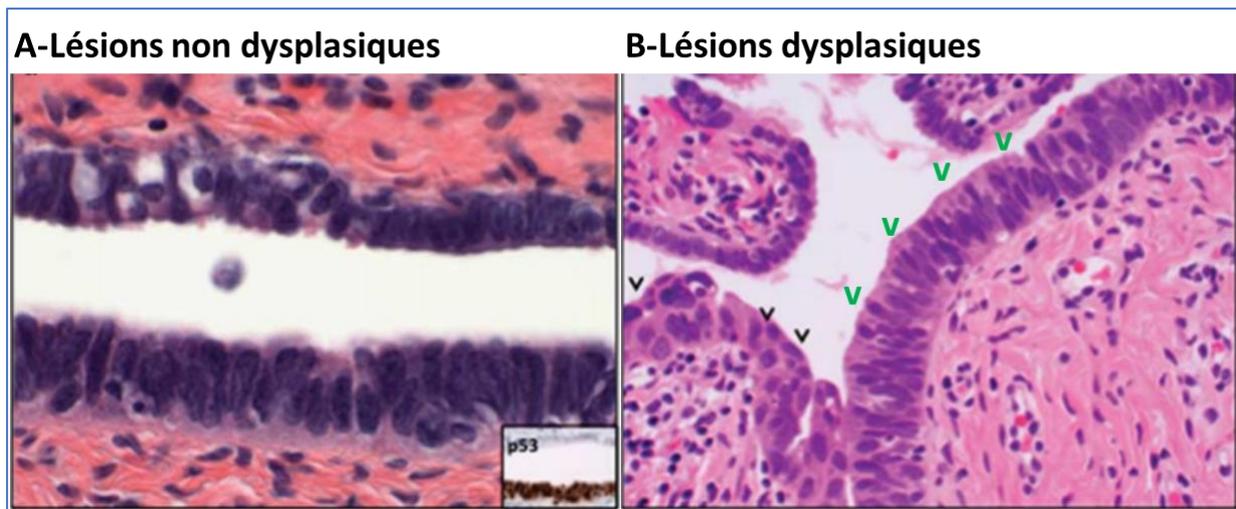


Figure 5 : Aspect des lésions tubaires sur lames HES

(A) Lésions non dysplasiques (« ESP » ou « p53 signature »). L'épithélium tubaire est monostratifié et l'immunohistochimie TP53 est positive (image en bas à droite). **(B) Lésions dysplasiques** (STIL et STIC). Les indicateurs verts montrent les STIL, l'épithélium est composé de plusieurs couches (polystratifié) mais conserve la polarisation cellulaire. Les indicateurs noirs montrent les STIC, l'épithélium est pseudo-stratifié et il y a une perte de polarisation cellulaire. Les STIC et STIL sont positifs au marquage TP53 (non montré ici). HES = Hématine Éosine Safran ; Adapté de : Meserve et al 2017; Modern pathology

- **Caractéristiques immunohistochimiques des lésions tubaires** (tableau 1) :

Les lésions tubaires présentent un immunomarquage positif à l'**anticorps ciblant la protéine TP53**(16), tout comme les HGSC. L'immunomarquage positif peut prendre deux formes différentes en fonction de la nature de la mutation sur le gène *TP53*(21) :

- Une **forte positivité** par surexpression de la protéine (mutation faux sens délétère du gène).
- Une **extinction du signal** (mutation qui crée un codon stop).

D'autres caractéristiques immunohistochimiques sont partagées entre les lésions tubaires et les HGSC :

- **Phénotype de cellules sécrétrices tubaires** (marquage positif HMFG2) (18) ;
- **Cassures de l'ADN double brin** (marquage au γ -H2AX des foci RAD51) (18) ;

- **Caractéristiques phylogénétiques des lésions tubaires** (tableau 1) :

La proximité phylogénétique entre les lésions tubaires et les tumeurs de type HGSC a été confirmée par des analyses moléculaires.

Les lésions tubaires et les HGSC présents sur les trompes de Fallope d'une même patiente montrent des mutations du gène *TP53* identiques (18,19). L'analyse d'anomalies moléculaires sur plusieurs locus par NGS a permis de confirmer la phylogénie : ESP → STIL / STIC → HGSC → métastases (20).

Cependant, deux résultats nuancent ce schéma de carcinogénèse :

- Certaines lésions STIC peuvent être des métastases de la tumeur « primitive » (20) (figure 4B),
- Certaines lésions STIC et ESP n'ont montré aucun lien phylogénétique avec des tumeurs HGSC(20).

	Lésions non dysplasiques	Lésions dysplasiques	HGSC
Morphologie (18)	Epithélium monostratifié à noyaux de tailles variables, sans perte de polarité cellulaire.	Epithélium de stratification variable, à noyaux de tailles variables et nucléolés, avec (STIC) ou sans (STIL) perte de polarité.	Epithélium d'allure papillaire, glandulaire ou cribriforme. Nombreuses atypies nucléaires et index mitotique élevé
Immunomarquage TP53 (11)	Oui	Oui	Oui
Mutation TP53(11)	Oui	Oui	Oui
Dommages sur l'ADN (marquage au γ-H2AX)(18)	Oui	Oui	Oui
Phénotype de cellules sécrétrices tubaires (marquage au HMFG2) (18)	Oui	Oui	Oui
Localisation(18)	Extrémités distales des trompes de Fallope	Extrémités distales des trompes de Fallope	Trompes de Fallope, ovaires, péritoine

Tableau 1 : Caractéristiques comparées des lésions tubaires et des HGSC.

Les caractéristiques partagées sont en fond vert, les morphologies formant un continuum sont graduées du jaune au rouge.

- **Études de modèles murins pour confirmer l'origine tubaire des HGSC :**

Perets et al(22) ont inactivé par transgénése ciblée les gènes *TP53*, *PTEN* +/- *BRCA1* ou *BRCA2* dans les cellules sécrétrices des trompes de Fallope de souris. Les auteurs ont comparé les apparitions de tumeurs entre ces modèles murins (tableau 2) :

Modèle murin	Nombre de souris	STIC	HGSC dans les trompes de Fallope	Métastase ovarienne	Métastase péritonéen
BRCA1-/- TP53mut ; PTEN-/-	16	14/16 (87,5%)	14/16 (87,5%)	5/16 (31,3%)	9/16 (56,3%)
BRCA2-/- TP53mut ; PTEN-/-	15	12/15 (80%)	12/18=5 (80%)	12/15 (80%)	10/15 (66,7%)
TP53mut ; PTEN-/-	6	4/6 (67%)	4/6 (67%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)

Tableau 2 : Lésions retrouvées sur les différents modèles murins de Perets et al

TP53mut : gène *TP53* porteur soit d'une mutation délétère, soit délété. -/- : inactivation du gène

La proportion d'apparition de lésions STIC et HGSC était importante pour tous les modèles, ce qui confirme l'hypothèse de l'origine tubaire. Les auteurs ont également montré qu'après ablation des trompes de Fallope au début de la vie des souris, aucune ne développait de HGSC, alors qu'elles continuaient à en développer après hystérectomie isolée ou ovariectomie isolée.

C. Hypothèse de l'échappement des précurseurs :

Cette troisième hypothèse est complémentaire de la précédente (origine tubaire). Elle stipule qu'un processus de cancérisation peut survenir à partir des lésions tubaires non dysplasiques sans passer par un stade intermédiaire dysplasique (STIC ou STIL)(21). **ESP→HGSC**

Les lésions dysplasiques sont retrouvées dans environ **70% des cas** chez les femmes atteintes de HGSC(19). L'absence de lésions dysplasiques chez 30% des femmes atteintes de ces tumeurs peut s'expliquer :

- Par un défaut de détection, (défaut de matériel ou envahissement tumoral trop important)(7).
- Par l'absence de lésions dysplasiques chez certaines patientes.

Soong et al (21) ont analysé des trompes de Fallope extraites après chirurgie chez des patientes atteintes de HGSC. Certaines de ces analyses n'ont pas retrouvé de lésions dysplasiques mais uniquement des lésions non dysplasiques (« ESP » ou « p53 signature »). Pour ces prélèvements, l'analyse génétique des ESP et HGSC a montré une clonalité dans 9 cas sur 12 (mutations délétères du gène *TP53* similaires).

Cependant, les mutations du gène *TP53* ne semblent pas suffisantes à elles seules pour expliquer le développement des HGSC, comme semble le montrer l'exemple du syndrome de Li-Fraumeni. En effet, ce syndrome est caractérisé par une mutation constitutionnelle à l'état hétérozygote du gène *TP53*, conférant un sur risque tumoral pour de nombreux autres carcinomes et sarcomes mais pas pour les HGSC(23) . De plus, Xian et al (23) ont montré que les trompes de Fallope de patientes atteintes du syndrome de Li-Fraumeni portent de très nombreuses lésions de type ESP (non dysplasiques), mais qui ne semblent pas évoluer en HGSC. Ceci signifie selon les auteurs que d'autres altérations génétiques sont indispensables pour faire évoluer ces lésions, notamment sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Une des critiques qui pourrait être avancée face à ces conclusions serait de mettre en doute l'absence de susceptibilité des patientes atteintes de syndrome de Li-Fraumeni de développer des HGSC. En effet, les HGSC se déclarent en médiane à 65-70 ans y compris chez les patientes porteuses d'une susceptibilité génétique, et il peut y avoir une sous-représentation de ces tumeurs dans les populations de Li-Fraumeni due à une espérance de vie courte.

1.4 HGSC et hérédité

1.4.1 Généralités :

Le risque cumulé de développer un cancer de l’ovaire à 70 ans est de **1,6% dans la population générale** (24). Ce risque est augmenté par la présence d’apparentées au premier degré atteintes d’un cancer de l’ovaire (3% avec une seule apparentée atteinte, 7% avec deux apparentées atteintes) (24) (figure 6).

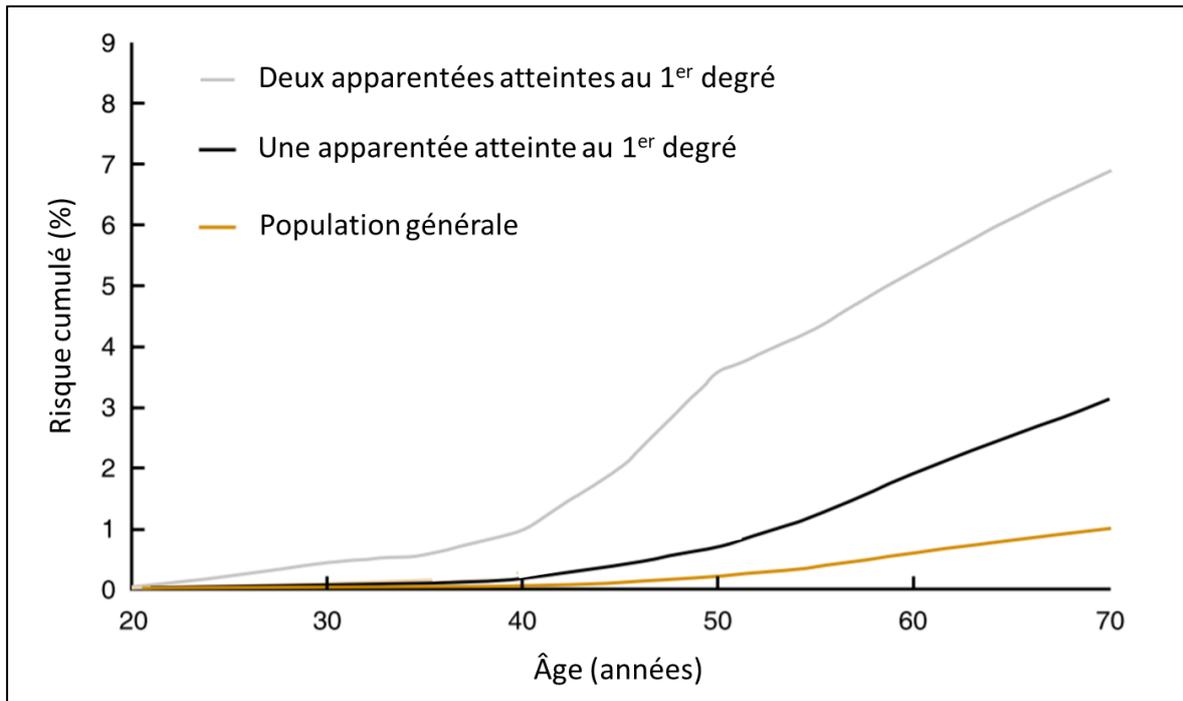


Figure 6 : Risques cumulés de développer un cancer de l’ovaire en fonction de l’histoire familiale

(adapté de Pharoah et al, 2002)

Il existe des formes familiales de HGSC, pour lesquelles des mutations délétères de certains gènes suppresseurs de tumeurs sont retrouvées. Walsh et al(25) ont séquencé par NGS l’ADN leucocytaire de 360 femmes atteintes d’une tumeur de type HGSC. Le panel de 21 gènes suppresseurs de tumeur a permis de retrouver une mutation délétère pour 23% des patientes. À noter que 31% des patientes porteuses d’une mutation n’avaient pas d’histoire familiale, soit par un défaut de pénétrance soit à cause de mutations *de novo*.

Lorsqu’une histoire familiale est disponible, les cancers de l’ovaire héréditaires surviennent principalement dans deux contextes distincts :

- **Le syndrome familial sein – ovaire**, dit syndrome « **HBOC** » (**H**ereditary **B**reast and **O**varian **C**ancer), qui se caractérise par la survenue sur un mode autosomique dominant dans une famille de cancers de l’ovaire **de type HGSC** et de cancers du sein. Certaines formes de syndrome HBOC peuvent associer à ce tableau des cancers du pancréas et de la prostate. On retrouve dans le syndrome HBOC des mutations germinales délétères des gènes *BRCA1*, *BRCA2* (pour **BR**east **CA**ncer) et *PALB2* (**P**artner **A**nd **L**ocalizer of **BRCA2**) (26–28).
- **Le syndrome de Lynch**, dit syndrome « **HNPCC** » (**H**ereditary **N**on **P**olyposis **C**olorectal **C**arcinoma), se caractérise par la survenue sur un mode autosomique dominant d’un spectre

hétérogène de tumeurs incluant en premier lieu des cancers colorectaux et de l'endomètre, puis d'autres localisations : ovaires, tractus uro-génital, voies biliaires, estomac, cerveau et rein. Le syndrome de Lynch est associé à des mutations germinales des gènes impliqués dans le mécanisme de réparation des mésappariements (Mismatch Repair ou « MMR » en anglais). Les gènes les plus impliqués sont par ordre de fréquence : *hMLH1* (*human MutL homolog 1*), *MSH2* (*MutS homolog 2*), *MSH6* (*MutS homolog 6*) et *PMS2* (*PMS1 homolog 2*)(29). Le sous type le plus fréquent de tumeurs épithéliales ovariennes développé dans le syndrome de Lynch est de type endométrioïde (29), c'est pourquoi nous ne développerons pas cette prédisposition ici.

1.4.2 Syndrome familial sein – ovaire HBOC et gènes *BRCA1* - *BRCA2* :

On retrouve pour 20% des familles atteintes d'un syndrome familial sein - ovaire au moins une mutation délétère sur le gène *BRCA1* ou sur le gène *BRCA2* (30,31). Ces deux gènes ont été découverts par clonage positionnel et associés aux cancers du sein et de l'ovaire respectivement en 1994 pour *BRCA1* (26) et en 1995 pour *BRCA2* (27).

- **BRCA1** :

BRCA1 est un gène situé sur le chromosome 17 en position chromosomique 17q21 (figure 7.A.1) .Il existe 34 transcrits détectés ou prédits dans la base de données Ensembl.org. Le transcrit principal contient 24 exons (32) dont 23 mesurent entre 41 paires de bases (pb) et 311pb (33) et l'exon 11 qui mesure 3426pb. La protéine BRCA1 compte 1863 acides aminés et différents domaines fonctionnels présentés ici de la partie N-terminale à C-terminale (figure 7.A.2) (34) :

- Un domaine **RING** (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene) en partie N-terminale, qui porte une activité ubiquitine ligase (=catalyse la fixation d'ubiquitine sur d'autres protéines). Cette activité nécessite l'interaction sur ce même domaine de la protéine **BARD1** (**BRCA1** **A**ssociated **R**ING **D**omain protein **1**). Le rôle exact de cette activité ubiquitine ligase de la protéine BRCA1 est mal connu. En revanche, des mutations localisées sur ce domaine confèrent un risque accru de tumeurs du syndrome HBOC, notamment celles modifiant des cystéines indispensables à la fixation de l'ion Zinc par le domaine RING(35).
- Deux domaines **NLS** (**N**uclear **L**ocalization **S**equence) pour la localisation nucléaire de la protéine BRCA1.
- Un domaine « **coiled coil** » qui permet l'interaction avec la protéine PALB2.
- Deux domaines **BRCT** (**BRCA1** **C**-terminal) en partie C-terminale, qui permettent des interactions avec les protéines suivantes : **ABRAXAS** (**BRCA1** **A** complex **S**ubunit), **CtIP** (**C**-terminal binding protein 1 (CtBP1) **I**nteracting **P**rotein) et **BRIP1** (**BRCA1** **I**nteracting **P**rotein **C**-terminal helicase **1**) ; toutes jouent un rôle dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.

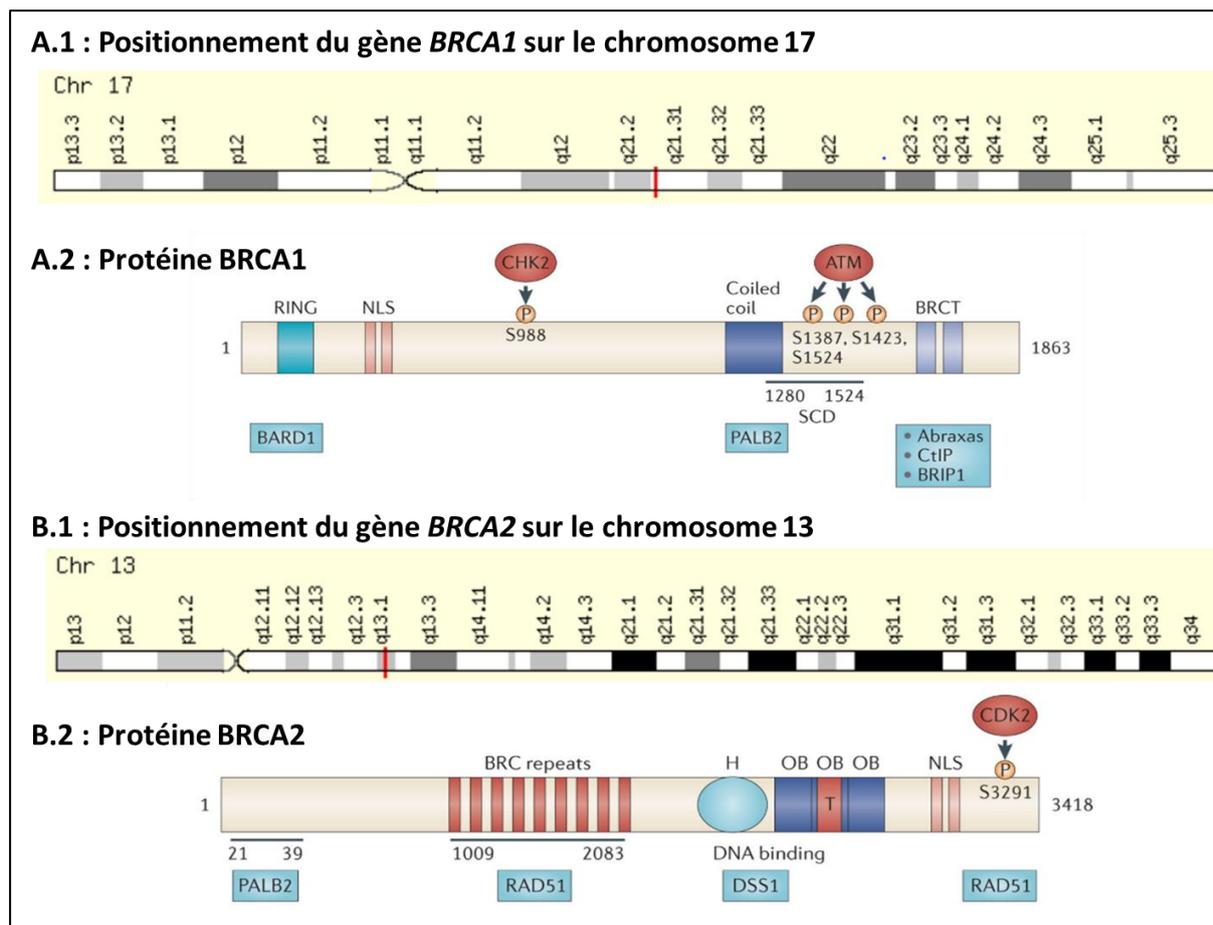


Figure 7 : *BRCA1* et *BRCA2* : positions chromosomiques des gènes et structures des protéines.

(A.1 et B.1) Positions chromosomiques des gènes *BRCA1* et *BRCA2* adaptées de genecards (32) ; (A.2 et B.2) Schémas des protéines *BRCA1* et *BRCA2* adaptés de Roy et collègues 2011 (34), la numérotation représente les positions d'acides aminés, les encadrés bleus représentent des interacteurs protéiques, les ovales rouges représentent des protéines kinases phosphorylant des acides aminés ciblés, Les lettres « P » entourées de jaune représentent la phosphorylation de l'acide aminé indiqué sous la marque. Abréviations : RING : Really Interesting New Gene, NLS : Nuclear localization sequence, SCD : SQ/TQ cluster domain (motifs phosphorylés par la protéine ATM), "H" : Hélicase, "OB" : Oligonucleotide Binding, "T" : Tower domain; BRCT : *BRCA1* C terminal; BARD1 : *BRCA1* Associated RING Domain protein 1; PALB2 : Partner And Localizer of *BRCA2*; ABRAXAS : *BRCA1* A complex Subunit; CtIP : C-terminal binding protein 1 (CtBP1) interacting protein; BRIP1 : *BRCA1* Interacting Protein C-terminal helicase 1; CHK2 : Checkpoint kinase 2; ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated; RAD51 : RAD51 homolog (cinq paralogues existent : RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3); CDK2 : Cyclin Dependant Kinase 2

Près de **2200 variants génétiques pathogènes** ont été répertoriés à ce jour dans le gène *BRCA1* (35). La plupart de ces variants provoquent l'apparition d'un codon stop prématuré tronquant la protéine (décalage du cadre de lecture, non sens ou épissage); d'autres variants altèrent la protéine *BRCA1* par substitution d'acide aminé (faux sens) ou par délétion / insertion respectant le cadre de lecture.

Ces variants délétères correspondent très souvent à des mutations « privées » (restreintes à une famille unique), mais il existe des variants récurrents retrouvés dans certaines populations suite à un effet fondateur. Des analyses de génétique des populations permettent d'émettre des hypothèses quant à l'historique de ces variants récurrents. Voici deux exemples de variants délétères récurrents sur le gène *BRCA1* :

- *BRCA1* c.185delAG (36) : Sur le continent Eurasien, ce variant délétère serait apparu il y a 61 générations dans les populations de juifs Ashkénazes (intervalle de confiance à 95% : 47-77). Il aurait été disséminé plus récemment dans les populations d'hispaniques (650 ans) et de juifs Iraquiens (450 ans). Ce variant est également retrouvé dans des populations mélanésiennes en Asie du sud-est. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une apparition indépendante pour cette population car les haplotypes sont très différents des porteurs Eurasiens.
- *BRCA1* c.5266dupC (37) : La mutation c.5266dupC est actuellement retrouvée dans de nombreux pays d'Europe, avec une plus forte fréquence dans les pays de l'est. L'étude des haplotypes conclut que cette mutation serait apparue au sein d'une population soit Russe il y a 72 générations (49-107 à 95%) soit Scandinave il y a 61 générations (40-89 à 95%). La mutation se serait ensuite disséminée progressivement dans les autres populations européennes.

- **BRCA2 :**

BRCA2 est un gène situé sur le chromosome 13 en position chromosomique 13q13.1 (figure 7.B.1) avec 11 transcrits détectés ou prédits dans la base de données Ensembl.org. Le transcrit principal contient 28 exons dont 26 codants (33). L'exon 11 est le plus grand avec 4932 paires de bases (pb), les 27 autres exons font de 41 pb à 1116 pb (33). La protéine *BRCA2* compte 3418 acides aminés avec plusieurs domaines fonctionnels présentés ici de la partie N-terminale à C-terminale (figure 7.B.2)(34) :

- Un **site d'interaction avec la protéine PALB2** en N-terminal.
- Huit **domaines BRC** (Breast Cancer) consécutifs, qui interagissent avec les protéines *RAD51*.
- Un domaine de fixation à l'ADN composé d'une partie possédant une activité **hélicase** (ouverture de la chromatine), de trois domaines **OB** (Oligonucleotide Binding) qui fixent l'ADN simple brin et d'un domaine **TD** (tower domain) qui fixe l'ADN double brin.
- Deux domaines **NLS** (Nuclear Localization Sequence) pour la localisation nucléaire de la protéine *BRCA2*.
- Un **site d'interaction avec les protéines RAD51 en partie C terminale**, l'interaction étant sous la dépendance de la phosphorylation de la sérine 3291 par la protéine kinase *CDK2* (Cyclin Dependant Kinase 2).

Plus de 2600 variants pathogènes ont été répertoriés dans le gène *BRCA2* à ce jour(35). Tout comme le gène *BRCA1*, les variants du gène *BRCA2* sont en grande majorité privés avec quelques rares mutations récurrentes trouvées dans certaines populations(38).

- **Réparation des cassures double brin de l'ADN et protéines BRCA :**

Les cassures double brin (CDB) de l'ADN peuvent être causées par l'action des radiations ionisantes (rayons X et gamma), des radicaux libres (métabolisme cellulaire ou agents chimiques exogènes), d'une cassure simple brin non réparée, et par des médicaments interagissant directement sur l'ADN (ex : cisplatine, mitomycine)(39).

Les CDB sont réparées par l'un des trois mécanismes suivants :

- **Réparation homologue** (en anglais : Homologous Recombination « **HR** »). La réparation s'effectue à partir d'une séquence homologue retrouvée dans un chromosome identique.
- **Jonction d'extrémités non homologues** (en anglais : Non Homologous End Joining « **NHEJ** »). La réparation s'effectue par ligation entre les deux extrémités de la CDB.
- **Microhomology Mediated End Joining (MMEJ)**, appelé aussi "A-NHEJ" (alternative NHEJ). La réparation s'effectue par recherche de micro-homologies au niveau des extrémités 3'(40).

Le système NHEJ est préférentiellement actif durant les phases G0 et G1 du cycle cellulaire, le système MMEJ durant l'intégralité du cycle cellulaire, tandis que le système HR intervient pendant les phases S et G2 (39). En effet, en fin de phase S et en phase G2, le système HR dispose d'une séquence homologue sur la copie répliquée du chromosome où a lieu la cassure.

Le système HR aboutit à une reconstitution sans erreur de la séquence d'ADN, alors que les systèmes NHEJ et MMEJ ne reconstituent pas la séquence initiale à l'identique (tableau 3) (39).

Mécanisme de réparation des CDB	Fidélité de la réparation(39)	Instabilité génétique générée(41)	Moment de survenue durant le cycle cellulaire(39)
Réparation homologue (HR)	Oui	Non	S/G2
Jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)	Non (Insertion / délétion de quelques paires de bases)	Oui	G0/G1
Microhomology Mediated End Joining (MMEJ)	Non (délétion de grandes tailles)	Oui	G0/G1/S/G2

Tableau 3 : Caractéristiques comparées des principaux mécanismes de réparation des cassures doubles brins

Lorsque le système HR n'est plus fonctionnel les CDB sont réparées par les systèmes NHEJ ou MMEJ, ce qui provoque une instabilité génétique et l'accumulation de mutations au sein de la cellule. Cette accumulation participe au processus de cancérisation des cellules(41). L'instabilité génétique est responsable des aneuploïdies retrouvées dans l'ADN des HGSC.

La protéine BRCA1 joue un rôle important dans la **détection des CDB** et dans l'orientation des mécanismes de réparation **vers le système HR** (figure 8A) :

- **Détection des CDB** : Les CDB sont reconnues par les protéines kinases ATM, ATR, CHEK2 puis le complexe H2AX-RNF8-MDC1 dont l'activité est modulée par le complexe BRCA1-Abraxas-RAP80.
- **Sélection du système de réparation lors d'une CDB** : La réparation des CDB est modulée par la protéine BRCA1 vers le système HR, via l'inhibition de la protéine 53BP1 (Tumor suppressor p53 Binding Protein 1).

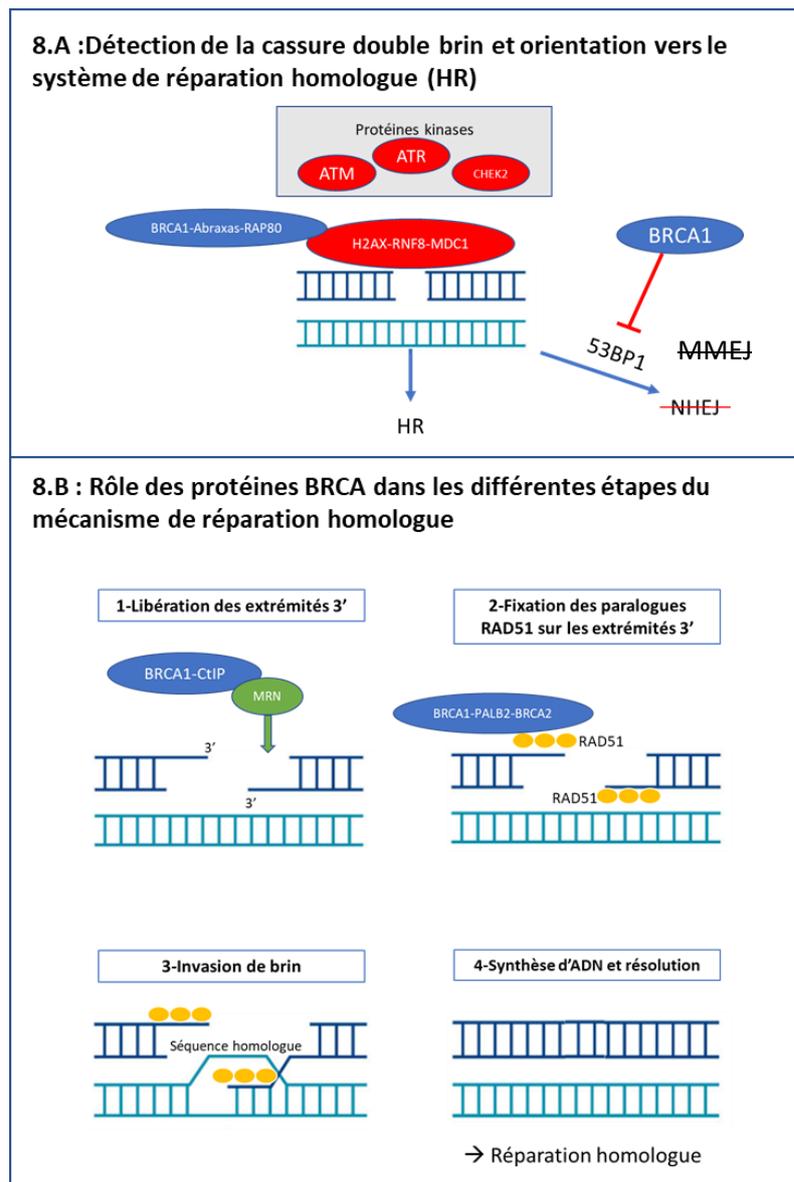


Figure 8 : Fonctionnement du système de réparation homologue et rôle des protéines BRCA.

Les protéines BRCA1 et BRCA2 participent aux différentes étapes du mécanisme HR, qui se déroule schématiquement en quatre étapes (figure 8.B) (39) :

1. **Libération des extrémités 3'**: Formation d'extrémités 3' simples brin au niveau de la cassure, médiée par le complexe MRN (composé de trois protéines : MRE11A, RAD50, NBS1) et régulée par le complexe BRCA1-CtIP qui stimule l'activité nucléase du complexe MRN.
2. **Fixation des paralogues RAD51 sur les extrémités 3'** : les cinq protéines paralogues RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC3, XRCC4) se fixent sur les extrémités 3' simples brin pour former un complexe nucléoprotéique. Le complexe protéique BRCA1-PALB2-BRCA2 favorise cette étape via l'interaction entre les domaines BRC de BRCA2 et les paralogues RAD51.
3. **Invasion de brin** : Le complexe RAD51-ADN simple brin envahit l'ADN double brin à la recherche d'une séquence homologue.
4. **Synthèse d'ADN et résolution** : L'ADN est synthétisé à partir à partir du brin homologue retrouvé, puis les deux doubles brins d'ADN finaux enchevêtrés sont séparés par action enzymatique.

L'altération des protéines BRCA1 et BRCA2 favorise l'instabilité génétique et le processus de carcinogenèse car le système HR n'est plus fonctionnel, au profit des systèmes NHEJ et MMEJ (30,34,35,39,41).

- **Autres fonctions cellulaires des protéines BRCA :**

D'autres fonctions cellulaires des protéines BRCA1 et BRCA2 ont été mises en évidence et peuvent jouer un rôle dans le processus de carcinogenèse en cas de mutations délétères (30) :

- **Protection de la fourche de réplication de l'ADN** : l'ADN simple brin néosynthétisé est protégé par la fixation des paralogues RAD51 en cas d'arrêt de la fourche de réplication (par exemple si l'ADN polymérase rencontre une base altérée). Les protéines BRCA ont un rôle majeur dans la fixation des paralogues RAD51 sur l'ADN simple brin.
- **Activité ubiquitine ligase de BRCA1** : Cette activité enzymatique nécessite l'interaction avec la protéine BARD1.
- **Régulation du cycle cellulaire par BRCA1** : BRCA1 aurait un rôle dans la régulation des checkpoints cellulaire G1/S et G2/M.

- **Mutations délétères des gènes *BRCA* et risque de HGSC :**

Des études rétrospectives et prospectives ont été menées pour déterminer le risque de cancer de l’ovaire chez les femmes porteuses d’une mutation délétère sur *BRCA1* ou *BRCA2*.

Pour un ensemble d’études rétrospectives citées, les risques à 70 ans sont de 16% à 68% pour *BRCA1* et 11% à 30% pour *BRCA2* (42). Ces études sont soumises à un biais d’échantillonnage important, ce qui peut expliquer la forte variabilité des résultats obtenus.

Une étude prospective a regroupé en 2017 les données de suivi d’un échantillon de 5066 femmes porteuses d’une mutation délétère dans le gène *BRCA1* ou *BRCA2* (42). Ce suivi a duré en moyenne 4 ans, et les survenues de cancers de l’ovaire invasifs ont pu être notifiées. Les risques cumulés de développer un cancer de l’ovaire à 80 ans sont de **44%** pour les porteuses *BRCA1* (IC à 95% : 36%-53%) et de **17%** pour les porteuses *BRCA2* (IC à 95% : 11%-25%) (Figure 9). Le risque de déclencher un cancer de l’ovaire invasif apparaît vers l’âge de 40 ans pour les porteuses *BRCA1* et vers l’âge de 50 ans pour les porteuses *BRCA2* (figure 9).

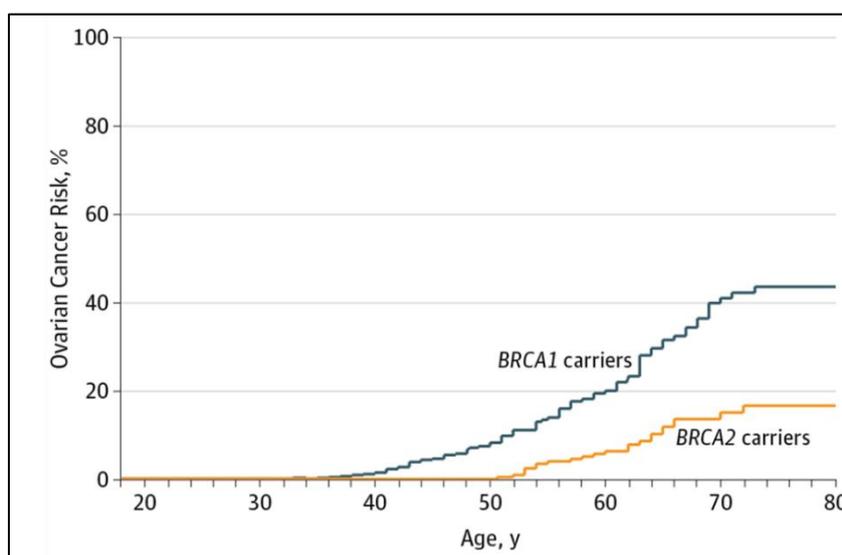


Figure 9 : Risques cumulés de développer un cancer de l’ovaire invasif en fonction de l’âge pour les porteuses d’une mutation délétère sur le gène *BRCA1* ou sur le gène *BRCA2*.

(d’après Kuchenbaecker et al (42))

1.4.3 Autres gènes impliqués dans la prédisposition héréditaire des HGSC

- **Gènes *RAD51C* et *RAD51D* :**

Les gènes *RAD51C* et *RAD51D* ont un rôle reconnu dans la prédisposition aux cancers de l'ovaire et font partie des gènes analysés dans ce contexte clinique en France (recommandations du Groupe Génétique et Cancer). Le rôle de ces protéines dans le système de réparation homologue de l'ADN a déjà été évoqué dans la description du système HR.

Le gène *RAD51C* est localisé sur le chromosome 17 au sein de la bande chromosomique 17q22 (32) et compte 18 transcrits détectés ou prédits dans la base de données Ensembl.org. Le transcrit principal possède 9 exons pour un total de 1494 paires de bases codantes et 376 acides aminés(33).

Une première étude rapportait en 2010 la présence de mutations délétères du gène *RAD51C* au sein de familles atteintes de cancers de l'ovaire et du sein, avec un statut *BRCA* non muté (43). D'autres études ont par la suite retrouvé un lien spécifique avec les HGSC :

- Loveday et al (44) : 12 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et porteuses d'une mutation délétère sur le gène *RAD51C* pour un échantillon de 1404 patientes malades (0,85%), avec ou sans histoire familiale. L'analyse sur une population contrôle ne montrait qu'un cas sur 1156, et le **risque cumulé est de 9% à 80 ans**.
- Song et al (45) : 14 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire porteuses d'une mutation délétère sur le gène *RAD51C* pour un échantillon de 3429 patientes malades (0,41%), dont 10 HGSC confirmés histologiquement. L'analyse sur la population contrôle a montré 2 cas positifs sur 2772 (0,07%).

Le gène *RAD51D* est localisé sur le chromosome 17 au sein de la bande chromosomique 17q12(32) et compte 23 transcrits détectés ou prédits dans la base de données Ensembl.org. L'isoforme principale est constituée de 11 exons dont 10 codant pour 328 acides aminés(33). Deux publications ont rapporté un rôle de *RAD51D* dans la prédisposition aux cancers de l'ovaire :

- Loveday et al (46): 8 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire sont porteuses d'une mutation délétère du gène *RAD51D* sur un échantillon de 911 patientes malades (0,9%). L'analyse de la population contrôle a retrouvé une altération délétère pour 1/1060 individus (0,09%). Le **risque relatif calculé est de 6,3 (IC à 95% : 2,86-13,85)**.
- Song et al (45) : 12 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et mutées *RAD51D* pour un échantillon de 3429 patientes malades (0,35%). 9 cas sur 12 étaient des HGSC confirmés histologiquement.

- **Gène BRIP1 :**

Le gène *BRIP1* (**BRCA1 Interacting C-terminal helicase Protein 1**) est localisé sur le chromosome 17 en position 17q23.2 (32) et compte 6 transcrits détectés ou prédits dans la base de données Ensembl.org. Le transcrit principal est constitué de 20 exons, 8182 nucléotides codant et 1249 acides aminés (33). La protéine BRIP1 interagit avec le domaine BRCT de la protéine BRCA1 et a un rôle dans le système HR (47). Plusieurs publications ont rapporté la survenue de mutations du gène *BRIP1* chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire :

- Rafnar et al (48) : 3 patientes atteintes et mutées dans un échantillon de 656 individus (population Islandaise).
- Weber-Lassalle et al (49) : Odds ratio de 20,97 (IC à 95% : [12,02-36,57]) pour un échantillon de 706 patientes atteintes et un échantillon contrôle de 2189 individus.
- Walsh et al (25) : 4 patientes atteintes et mutées dans un échantillon de 360 individus, dont deux HGSC.

Actuellement, le groupe génétique et cancer ne recommande pas de suivi particulier des femmes porteuses d'une mutation délétère sur le gène *BRIP1* car les arguments scientifiques sont jugés trop fragmentaires pour le moment.

1.4.4 Consultations d'oncogénétique

La découverte de formes héréditaires de cancers est un enjeu important pour les individus atteints (cas index) mais aussi particulièrement pour les apparentés asymptomatiques. En effet, la découverte d'une mutation causale permet de confirmer le diagnostic de prédisposition chez le cas index, puis de proposer un test génétique ciblé aux apparentés asymptomatiques. Les porteurs de la mutation pourront ainsi bénéficier d'une stratégie de dépistage adaptée à la prédisposition.

La recherche d'une mutation délétère sur les gènes prédisposant aux cancers du sein et l'ovaire s'effectue devant **tout cas de cancer de l'ovaire avant 60 ans ou quel que soit l'âge lorsqu'il s'agit d'un HGSC.**

A l'institut Bergonié, l'analyse est effectuée par séquençage NGS des cas index, ce qui permet d'obtenir la séquence de plusieurs gènes simultanément, on parle de « panel de gènes ». Le panel des gènes analysés en France dans le cadre d'une suspicion de prédisposition héréditaire aux cancers du sein ou de l'ovaire est défini par le Groupe Génétique et Cancer et évolue en fonction des connaissances. En cas de syndrome sein – ovaire, le dernier rapport du GGC recommande d'analyser les gènes suivants (50) : *BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, CDH1, PTEN, RAD51C, RAD51D, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM*. L'analyse par NGS proposée permet de détecter les mutations ponctuelles au sein des régions exoniques ainsi que des jonctions intron-exon, mais aussi d'analyser les anomalies de nombre (délétions ou insertions de grandes tailles) qui peuvent aussi être responsables d'altérations des gènes. Lorsqu'une mutation délétère ou une anomalie de nombre est retrouvée chez le cas index, elle est ensuite confirmée sur un prélèvement indépendant afin d'éviter les erreurs d'identité. Par la suite, un test génétique ciblé sur la mutation familiale sera proposé aux apparentés du cas index.

1.5 Chirurgie prophylactique des patientes mutées et risque résiduel de HGSC

Lorsqu'une mutation délétère sur un des gènes de prédisposition aux HGSC est détectée, une ablation chirurgicale des ovaires et des trompes de Fallope est proposée aux patientes (= annexectomie bilatérale). La chirurgie prophylactique permet de diminuer de 80% le risque d'apparition de HGSC (51). Les recommandations préconisent d'effectuer l'annexectomie bilatérale à des âges cohérents avec le risque conféré par chacun des gènes (tableau 4). Ces recommandations sont aussi modulables en fonction de l'histoire familiale des patientes.

Gène muté	Age d'annexectomie bilatérale recommandé	Source
BRCA1	40 ans	Institut national du cancer (52)
BRCA2	45 ans	Institut national du cancer(52)
RAD51C et RAD51D	45 ans	Groupe génétique et cancer(53)

Tableau 4 : Recommandations de l'âge d'annexectomie bilatérale en fonction du gène muté

Toutefois, la chirurgie prophylactique (annexectomie bilatérale ou ovariectomie) ne réduit pas le risque de HGSC au même niveau que celui de la population générale comme le montrent ces trois publications :

- Finch et al (51) : Risque de **4,3%** de développer un HGSC de localisation péritonéale **20 ans** après ovariectomie pour des patientes porteuses d'une mutation *BRCA1* ou *BRCA2*.
- Casey et al (54) : risque de **3,5% 20 ans** après ovariectomie.
- Domcheck et al (55) : risque de 1 à 2% après annexectomie prophylactique (pas de calcul du risque à 20 ans, le risque est ici estimé avec une période de suivi médiane de 6 ans).

La présence d'un risque significatif de HGSC en post-annexectomie et la sévérité du pronostic justifient la mise en place d'un suivi périodique pour dépister précocement l'apparition de ces tumeurs chez les femmes à risque génétique.

Peut-on effectuer ce suivi par les marqueurs classiques tels que l'antigène CA125 et l'échographie trans-vaginale ?

1.6 Dépistage des HGSC par Antigène CA-125 et échographie trans-vaginale

L'antigène-émie CA-125 et l'échographie trans-vaginale sont des techniques de dépistages ou de suivi des tumeurs pelviennes ou digestives utilisées depuis plusieurs dizaines d'années. Cependant leur efficacité dans le cadre du dépistage des HGSC a été remise en cause par plusieurs études épidémiologiques. Henderson et collègues (56) ont compilé les données de trois grandes études qui comparaient l'efficacité du suivi de patientes non malades par l'antigène-émie CA-125 et / ou par l'échographie trans-vaginale versus une absence de suivi. Le critère final de jugement retenu était la mortalité par tumeur ovarienne comparée entre les groupes de patientes suivies et les groupes témoins non suivis. Les données montrent que le suivi par antigène-émie CA-125 et/ou par échographie trans-vaginale ne modifient pas la mortalité par tumeur ovarienne (tableau 5).

Méthode de suivi	Étude(s)	Effectifs (femmes suivies / femmes non suivies)	Différence de mortalité par tumeur ovarienne (suivies vs non suivies) (IC à 95%)	Efficacité du suivi (Oui / Non)
CA-125	UK pilot 1999	10 958 / 10 977	RR : 0,5 (0,82-1,71)	Non
	UKCTOCS 2016	50 624 / 101 299	HR : 0,89 (0,74-1,08)	Non
ETV	UKCTOCS 2016	50 624 / 101 299	HR : 0,91 (0,76-1,09)	Non
CA-125 + ETV	PLCO 2011	34 253 / 34 204	RaR : 1,18 (0,82-1,71)	Non

Tableau 5 : Effets du suivi par antigène-émie CA-125 et par échographie trans-vaginale sur la mortalité par cancer de l'ovaire (adapté de Henderson et collègues 54)

ETV : Échographie trans-vaginale UK : United Kingdom, UKCTOCS : UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening, PLCO : Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening, HR : Hazard Ratio, RR : Risque Relatif, RaR : Rate Ratio

L'absence d'efficacité implique de rechercher d'autres méthodes de dépistage des HGSC.

Est-ce que l'ADN tumoral circulant pourrait-être utilisé comme marqueur de détection précoce des HGSC ?

Nous discuterons dans la partie suivante de la découverte puis de l'analyse de l'ADN tumoral circulant dans la littérature scientifique.

1.7 ADN tumoral circulant

1.7.1 Découverte

Les premiers dosages d'ADN circulant plasmatique (cfDNA) ont été publiés par Mandel et Métais en 1948 dans les comptes rendus des séances de la société de biologie et de ses filiales(57).

En 1977, Leon et collègues (58) montrent que les concentrations de cfDNA sont plus élevées chez des patients atteints d'affections tumorales par rapport à des patients non atteints. Parmi les patients atteints, la présence de métastases augmente les concentrations détectées. Les dosages de cfDNA ont été rendus plus précis par une technique de radio-immuno-dosage mise au point grâce à des sérums de patients lupiques (riches en anticorps anti-ADN double brin).

En 1983 Shapiro et collègues mesurent des concentrations de cfDNA plus élevées dans le cas d'affections gastro-intestinales malignes versus des affections gastro-intestinales bénignes(59).

En 1989, Stroun et collègues caractérisèrent pour la première fois la présence d'ADN tumoral circulant (ctDNA) dans le cfDNA de patients atteints de tumeur (60). Les propriétés de l'ADN tumoral se distinguent de l'ADN non tumoral in vitro :

- Température de déshybridation (T_m) plus faible après exposition à la mitomycine in vitro
- Réaction de synthèse d'ADN plus rapide après exposition à la mitomycine in vitro.

C'est la détection de ces propriétés dans le cfDNA qui a permis de démontrer la présence de ctDNA dans le plasma pour la première fois.

En 1994, deux études décrivent la détection de mutations ponctuelles tumorales dans le cfDNA. Il s'agissait de mutations ponctuelles activatrices d'oncogènes soit sur le gène *NRAS* chez des patients atteints d'hémopathies (61) soit sur le gène *KRAS* chez des patients atteints de cancers du pancréas (62). Ces mutations ont été détectées par amplification spécifique d'allèle en PCR (Polymerase Chain Reaction).

1.7.2 Aspects biologiques

En condition physiologique, le cfDNA provient majoritairement de la moelle hématopoïétique (63,64).

En condition tumorale la présence de ctDNA présente les caractéristiques suivantes :

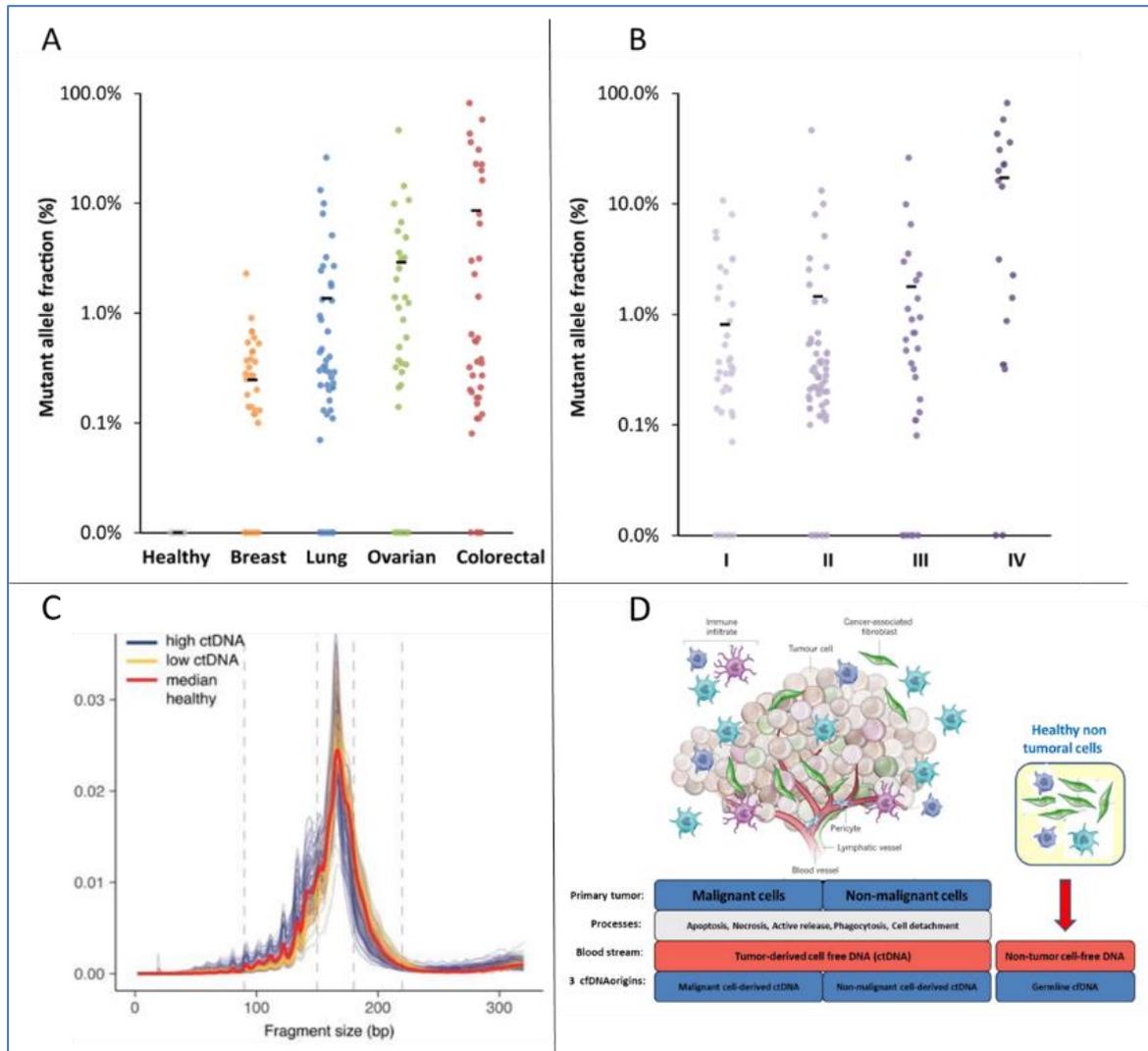


Figure 10 : Éléments biologiques concernant l'ADN circulant tumoral

(A) Fractions de ctDNA dans le cfDNA dans plusieurs types de tumeurs et **(B)** pour plusieurs grades de sévérité allant de I (peu sévère) à IV (très sévère), mesurées par séquençage NGS à 30 000X de profondeur et adapté de Phallen et al (65). Les barres noires représentent la moyenne des fractions de ctDNA et chaque point coloré représente un patient. **(C)** Distribution des tailles de fragments d'ADN circulant plasmatique entre 0 et 300 pb pour 3 catégories d'échantillons : les tumeurs à fort taux de ctDNA (bleu), les tumeurs à faible taux de ctDNA (jaune) et les patients non malades (rouge) adapté de Mouliere et al (66) **(D)** Schéma représentant les différentes origines de ctDNA, adapté de Thierry et al (67).

- **Proportions de ctDNA dans le cfDNA:**

En contexte tumoral, la proportion de ctDNA dans le cfDNA est **très variable** et peut représenter de 0,1% à plus de 10%(65).

Les proportions de ctDNA varient en fonction :

- du **type de tumeur** (figure 10.A), les tumeurs peuvent être à « faible » ou à « fort » taux de ctDNA (66),
- du **grade de sévérité** (figure 10.B), les tumeurs en stades précoces présentent de plus faibles taux de ctDNA (65,68)
- des **patients** (figures 10A et 10B, voir les étendues de distributions).

- **Taille des fragments de cfDNA et de ctDNA :**

cfDNA : L'analyse de la taille des fragments a montré que le cfDNA est majoritairement constitué de **courts fragments**, distribués autour de **167pb** (63,66,67). Ces tailles sont compatibles avec une origine apoptotique des molécules d'ADN (figure 10.D). En effet, lors de l'apoptose les exonucléases coupent l'ADN entre les nucléosomes, qui contiennent 147 paires de bases enroulées autour des octamères d'histone, en plus des fragments d'ADN qui les relient (67).

ctDNA : Il a été montré récemment que le ctDNA se distribue à des tailles de fragments plus faibles, autour de 100pb (figure 10.C) (66,69). Ces études rapportent qu'une sélection de taille permettrait d'augmenter la proportion de ctDNA et la sensibilité des techniques de détections. De plus, des fragments d'ADN de grandes tailles (0,5-2kb) ont déjà été rapportés chez des patients porteurs de tumeurs (70) ce qui pourrait correspondre à une libération par nécrose (figure 10.D).

Comme nous le verrons dans la partie suivante, le cfDNA a déjà été testé comme marqueur de détection des HGSC.

1.7.3 Test de détection des HGSC par l'analyse de cfDNA dans la littérature scientifique :

Voici trois exemples de mises au point de tests de dépistage des HGSC par l'analyse du cfDNA de patientes malades. Ces exemples analysent respectivement dans le cfDNA : la séquence de gènes cibles, l'évaluation quantitative de miRNAs circulants et des marqueurs de méthylation.

- **Séquençage ciblé :**

Cohen et collègues (71) ont mis au point un test de dépistage des tumeurs (« CANCERSEEK ») qui combine le dosage d'une série de protéines et l'analyse par réactions spécifiques de PCR du cfDNA. Ces réactions permettent d'amplifier les séquences de 16 gènes impliqués dans les cancers puis de les analyser par séquençage par synthèse (illumina). La sensibilité du test pour détecter les HGSC était proche de 100%, avec la détection d'une mutation du gène *TP53* dans 46 cas sur 54 (85%).

- **Quantification des miRNAs circulants :**

Yokoi et collègues (72) ont mis au point un test de quantification de certains miRNAs circulants dans le plasma pour dépister les HGSC. La sélection des miRNAs à tester a été effectuée en trois étapes : 1/Sélection de miRNAs discriminants patientes atteintes d'un HGSC (n=14) et patientes témoins (n=6) (set d'entraînement). 2/Confirmation de la sélection des miRNAs discriminants sur une seconde cohorte (30 patientes malades et 15 témoins)(set de validation). 3/Validation du test sur une grande cohorte de témoins (n=63) versus patientes malades (155 atteintes malignes, 43 atteintes bénignes). Au final, le test quantifie 8 miRNAs différents dans le plasma : miR-142-3p, miR-26a-5p, let-7d-5p, miR-374a-5p, miR-766-3p, miR-200a-3p, miR-328-3p, miR-130b-3p.

- **Méthylation de cfDNA :**

Widschwendter et collègues (73) ont analysé la méthylation du cfDNA pour le dépistage de HGSC. L'analyse a comporté trois phases : 1/Phase de détection des marqueurs de méthylation présents au sein des tissus tumoraux des HGSC (n=699), 2/Phase de détection de ces marqueurs de méthylation dans le cfDNA de patientes atteintes de HGSC (n=151), 3/Phase de validation sur trois cohortes indépendantes (n=250, 75, 172). Au final, le test utilise trois marqueurs de méthylation.

- **Discussion :**

Après la phase de mise au point, ces tests doivent être évalués en condition réelle de dépistage, afin d'évaluer leur efficacité clinique.

De plus, d'autres marqueurs peuvent être recherchés dans le cfDNA de patientes atteintes de HGSC et notamment les **aneuploïdies (ou anomalies de nombres)**. En effet, les données du TCGA(74) (The Cancer Genome Atlas) montrent que l'ADN des HGSC comporte deux types d'anomalies :

- Une mutation délétère du gène *TP53* dans 95% des HGSC.
- Des aneuploïdies (gains, pertes, amplifications de larges régions génomiques)

Ce travail de thèse vise à rechercher la présence d'aneuploïdies dans le cfDNA de patientes atteintes de HGSC comme présenté dans les objectifs ci-après.

2 Objectifs du travail de thèse :

Objectif principal :

Évaluer la faisabilité d'un test de dépistage des patientes à risque de HGSC par l'analyse des aneuploïdies et de mutations *TP53* d'origines tumorales dans le cfDNA, via la technique « NGS Oneseq ».

La démarche expérimentale peut se résumer en trois étapes :

1. Mise au point de la technique NGS Oneseq pour la détection des aneuploïdies tumorales, par l'analyse d'échantillons d'ADN FFPE de tumeurs HGSC et comparaison des résultats obtenus avec une technique de SNP array.
2. Application de la technique NGS Oneseq sur les échantillons de cfDNA de patientes atteintes de HGSC pour y rechercher des aneuploïdies et une mutation sur le gène *TP53*.
3. Analyse des résultats obtenus sur cfDNA et ADN FFPE et évaluation de la faisabilité pour dépister les patientes à risque de HGSC.

3 Matériels et méthodes

3.1 Résumé :

Un groupe de patientes atteintes de HGSC en phase active a été constitué (groupe « Malades » n = 16). Pour chaque patiente, un échantillon d'ADN FFPE tumoral et un échantillon de cfDNA ont été recueillis. Sur ces deux types d'échantillons, nous avons analysé les aneuploïdies (pangénome) ainsi que les mutations exoniques du gène *TP53* par la technique NGS Oneseq.

La première phase du travail a consisté à mettre au point la technique d'analyse NGS Oneseq sur ADN FFPE tumoral (comparaison avec une technique de référence de SNP array).

La deuxième phase d'analyse a consisté à tester la technique NGS Oneseq sur les échantillons de cfDNA, en comparant les éventuelles anomalies obtenues avec celles détectées sur les échantillons d'ADN FFPE, pour en définir l'origine tumorale ou non.

Un groupe de témoins non malades (prélevés pour le cfDNA) a servi de référence diploïde dans l'analyse des aneuploïdies.

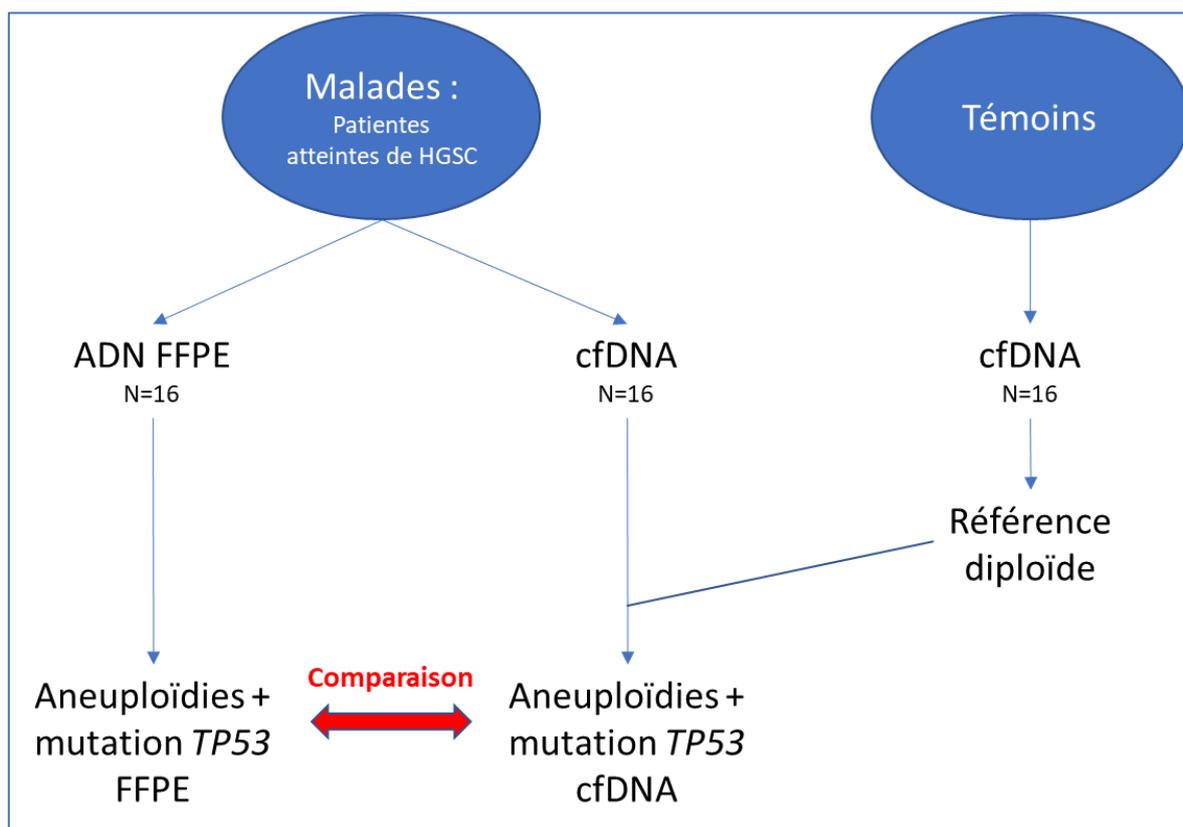


Figure 11 : Stratégie expérimentale

3.2 Échantillonnage :

Deux groupes ont été constitués :

- **Patientes atteintes de HGSC (notées 1.)** pour lesquelles nous disposons des échantillons suivants :
 - Sanguins (prélevés en consultation d'oncogénétique à visée théranostique, 1 à 2 mois après le diagnostic initial ou diagnostic de rechute).
 - ADN FFPE (extrait préalablement de la biopsie au moment du diagnostic)
- **Témoins (notés 2.)** pour lesquels nous disposons des échantillons suivants :
 - Sanguins (prélevés en consultations d'oncogénétique, d'apparentés asymptomatiques vus pour recherche de mutations familiales prédisposante)

Les prélèvements sanguins ont été recueillis à partir de deux tubes EDTA de 7 mL par individu, prélevés durant les consultations d'oncogénétique sur une période s'étendant du 08/02/2019 au 21/06/2019.

Les ADN FFPE proviennent des exérèses chirurgicales effectuées chez les patientes atteintes lors du diagnostic anatomo-pathologique initial ou de rechute de HGSC. L'échantillon d'ADN FFPE provenant de la patiente 1.3 avait été documenté à tort dans les comptes rendus « HGSC » alors qu'il s'agissait d'un carcinome séreux de bas grade selon les conclusions de l'anatomo-pathologie.

Au total, 21 patientes ont été incluses dans le groupe de patientes atteintes (1.1 à 1.21) et 25 dans le groupe témoins (2.1 à 2.25). La quantité de patientes prélevées a dépassé le seuil de taille prévu par groupe afin d'obtenir *in fine* 16 échantillons analysables dans chacun des deux groupes.

Un **consentement éclairé** a été signé par chaque patient(e), autorisant l'utilisation des prélèvements à des fins de recherche et de développements techniques.

L'annexe 1 résume les principales caractéristiques clinico-biologique des patientes atteintes de HGSC.

3.3 Phase pré-analytique :

- **Aliquotage du plasma :**

Voici le protocole utilisé par le laboratoire de biologie de l'institut Bergonié pour l'aliquotage du plasma à partir des prélèvements sanguins :

1. Centrifugation douce (2000g) des tubes EDTA pendant 10 minutes à 4°C.
2. Récupération du surnageant (plasma + débris cellulaires).
3. Centrifugation forte du surnageant (3800g) pendant 10 minutes à 4°C.
4. Récupération du surnageant (plasma)
5. Conservation en micro-tubes des plasmas doublement centrifugés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

Le délai entre le prélèvement sanguin et la congélation du plasma a été inférieur à 4h pour tous les échantillons afin de minimiser la contamination par de l'ADN issu de lyse cellulaire *in vitro* (75).

- **Extraction de l'ADN plasmatique circulant (cfDNA) :**

L'extraction des ADN plasmatiques a été effectuée par le kit QIAamp « Circulating Nucleic acid kits » (Qiagen) et élué dans des tubes « LoBind » (Eppendorf AG) pour un volume d'éluat de 30µL.

- **Quantification des échantillons de cfDNA et d'ADN FFPE :**

Les éluats d'extractions ont été quantifiés par **Nanodrop** (ThermoFisher), **Qubit** (Illumina) et **Tapestation** (Agilent) (résultats Tableau 6) :

- **Nanodrop** : les ADN simple et double brin sont confondus dans le dosage. L'appareil Nanodrop est un spectrophotomètre qui mesure les absorbances de 230 à 350 nm, ce qui permet de doser les acides nucléiques (260nm) et d'estimer la contamination des échantillons par des protéines (280 nm, rapport 260/280 optimal= 1,8-2,0) et par l'EDTA ou des solvants (230nm, rapport 260/230 optimal = 2,0-2,2).
- **Qubit** : seuls les ADN double brin sont dosés. L'appareil Qubit est un fluorimètre qui quantifie le signal d'un agent intercalant fluorescent.
- **Tapestation** : les ADN sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse et les ADN double brin sont quantifiés par fluorimétrie grâce à un agent intercalant fluorescent.

Les échantillons de cfDNA sont plus concentrés dans le groupe des patientes malades que dans le groupe des témoins, par la méthode Qubit ($p < 0,0001$) et par la Tapestation pour les ADN compris entre 100 et 500pb ($p = 0,0031$) (Tableau 6).

Méthode de quantification d'ADN (ng/mL de plasma)	Patientes malades (n = 21)	Témoins (n =25)
Nanodrop	54 [44,17 - 87,91]	50,3 [40,43 - 66,67]
Qubit	10,6 [5 - 23,8]	2,9 [2,3 - 4,4]
Fragments d'ADN de 100 à 500pb (Tapestation)	1,5 [0,4 - 6,9]	0,31 [0,18 - 0,45]

Tableau 6 : Quantification des échantillons de cfDNA

Concentrations en ng/mL de plasma. Les valeurs indiquées en gras sont les médianes, les valeurs entre crochets représentent l'intervalle de confiance à 95%.

Les échantillons d'ADN FFPE étaient déjà dosés par le laboratoire de pathologie moléculaire de l'institut Bergonié.

- **Analyse des tailles de fragments de cfDNA et ADN FFPE:**

La séparation des ADN par la taille a été effectuée par **Tapestation Agilent** (kit High sensitivity D1000 pour les cfDNA et kit Genomic DNA pour les ADN FFPE) (exemples en figure 12). Les fragments d'ADN double brins sont quantifiés par intégration de pic.

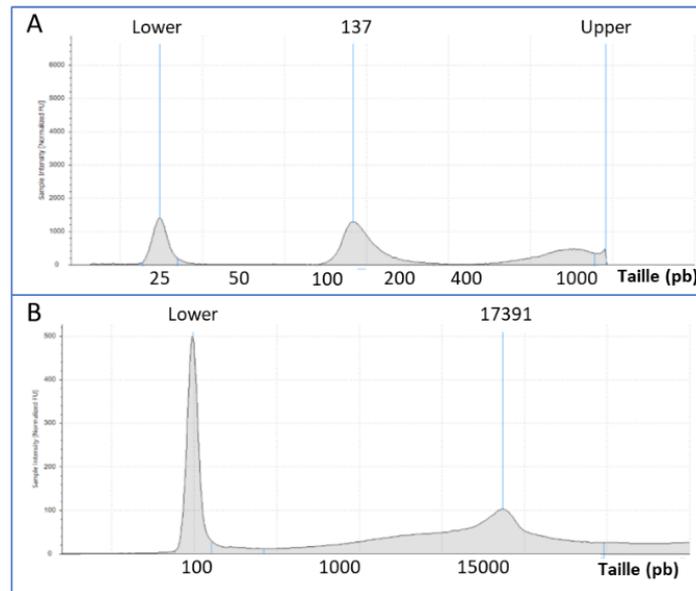


Figure 12 : Analyse de taille par TapeStation Agilent

(A) Exemple du cfDNA 1.15 (kit HS D1000) **(B)** Exemple d'un ADN FFPE 1.4 (kit Genomic DNA). La taille des fragments est en abscisse (en paires de bases), l'intensité des pics est en ordonnée (valeurs de fluorescences), les marqueurs de tailles sont indiqués « lower » et « upper », la taille au niveau du sommet du pic d'ADN extrait est indiquée (137pb pour (A) et 17391pb pour (B))

- **Sélection des échantillons pour la phase analytique :**

La quantité d'échantillon à inclure dans la partie analytique se limitait à 48 échantillons (figure 11), soit **16 cfDNA** et **16 ADN FFPE** pour le groupe de patientes atteintes et **16 cfDNA** pour le groupe témoins. La limitation du nombre d'échantillons permet d'obtenir une profondeur de séquençage théorique plus élevée par patient (cf description de la technique NGS). Nous avons inclus dans la phase analytique les échantillons contenant les plus grandes concentrations de cfDNA (fragments entre 100 et 500 pb), voir Annexe 1.

3.4 Phase analytique : NGS Oneseq

Le séquençage NGS des échantillons de cfDNA et d'ADN FFPE a été effectué en utilisant une banque de capture dont le nom commercial est « Oneseq » (société Agilent). La première étape a consisté à construire la banque de capture Oneseq pour les besoins de l'étude.

- **Banque de capture Oneseq :**

La banque de capture Oneseq comporte deux ensembles de sondes distincts (figure 13A) :

- **Un enrichissement du génome entier à faible couverture appelé « backbone »** (non modifiable). Ces sondes permettent de détecter les événements de types variations du nombre de copies (amplifications, gains, délétions) sur le génome entier. La résolution de détection est de 1Mb en moyenne (variable selon la richesse en gènes).
- **Un enrichissement ciblé sur des zones choisies appelé « custom »** (modifiable). Les zones enrichies ont été choisies après analyse bibliographique :

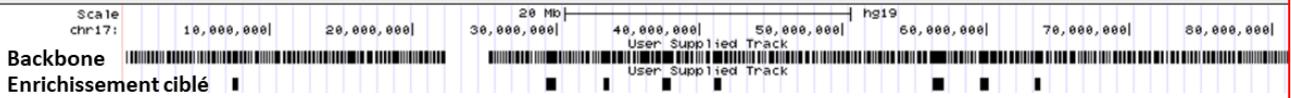
Le travail bibliographique a permis de compiler les études de génétique tumorale concernant les HGSC, afin d'inclure dans l'enrichissement ciblé les zones fréquemment touchées par des aneuploïdies (tableau 2/2 en annexe). Voici les principaux articles utilisés :

- **The Cancer Genome Atlas (TCGA) 2011(74)** : 316 échantillons de HGSC ont été analysés par NGS afin de recueillir des données génomiques (mutations ponctuelles et aneuploïdies de l'ADN), transcriptomiques (niveaux d'expression) et de méthylation de l'ADN. Ces données sont en libre accès sur le site internet du TCGA et servent de référence à de nombreuses études.
- **Patch et collègues (76) en 2015** : 114 échantillons de HGSC ont été analysés chez 92 patients, par NGS.
- **Wang et collègues (77) en 2017** : Analyse par séquençage NGS d'ADN extraits de différents histotypes de cancers de l'ovaire épithéliaux (n = 113), dont 59 échantillons de HGSC.

A- Banque de capture Oneseq : Sondes Backbone + enrichissement ciblé

Ex : chromosome 17

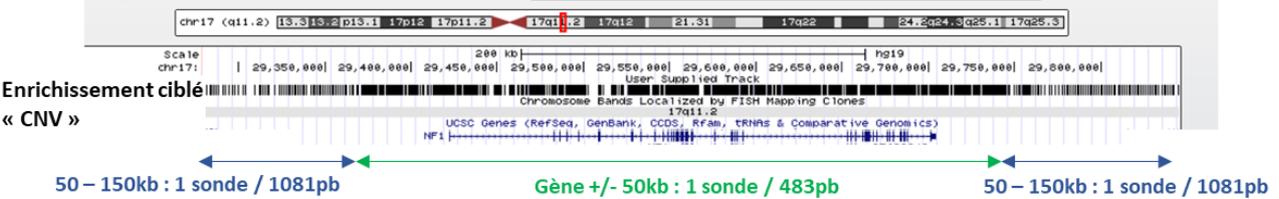
chr17 (p13.3-q25.3) 13.313.2p13.1 17p12 17p11.2 17q11.2 17q12 21.31 17q22 q24.3q25.1 17q25.3



B- Enrichissement ciblé « aneuploïdies » :

→ Gènes : *BRCA1*, *BRCA2*, *NF1*, *RB1*, *CDK12*, *CCNE1*, *MYC*, *CCND1*, *EMSY*, *PAK1*, *MECOM*, *Notch3*, *NF1*, *RB1*, *PTEN*)

Ex : gène *NF1*



C- Enrichissement ciblé « exons » :

→ Gène : *TP53*

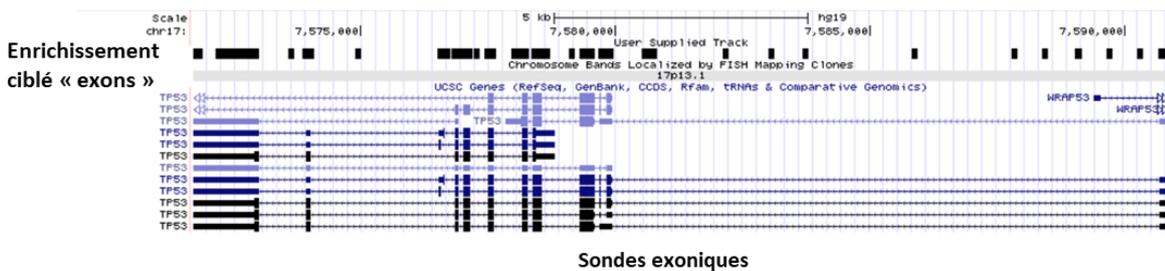


Figure 13 : Banque de capture NGS Oneseq

A-Backbone + enrichissement ciblé représenté par exemple sur le chromosome 17 (chaque barre noire représente une zone capturée).

B- Enrichissement ciblé « aneuploïdies » représenté par exemple sur le gène *NF1*.

C-Enrichissement ciblé « exons » sur le gène *TP53*.

Au final l'enrichissement ciblé « custom » comporte :

- **Un enrichissement ciblé « aneuploïdies »**, qui permet de capturer les gènes choisis et les régions proches, sans recherche d'une capture exonique en particulier puisque l'objectif était d'améliorer la détection d'aneuploïdies localement. Cette partie contient les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *NF1*, *RB1*, *CDK12*, *CCNE1*, *MYC*, *CCND1*, *EMSY*, *PAK1*, *MECOM*, *Notch3*, *NF1*, *RB1* et *PTEN*. Il y a une sonde toute les 483pb dans le gène et 50kb autour ; une sonde toute les 1081pb entre 50 et 150kb autour du gène (figure 13B).
- **Un enrichissement ciblé « exons »** pour le gène *TP53* car ce gène porte des mutations ponctuelles exoniques ou introniques proches dans 96% des HGSC (figure 13C).

La taille finale de la banque de capture Oneseq est de 3,154 Mégabp (10^6).

- **Préparation des échantillons d'ADN pour le séquençage :**

Cette phase est aussi appelée « préparation de librairie ». La méthode de préparation de librairie Sureselect^{XT}Low Input (Agilent) a été choisie car elle permet de partir de faibles quantités d'ADN au départ (les échantillons de cfDNA sont peu concentrés). Les principales étapes sont décrites successivement dans ce paragraphe et représentées en figure 14A.

- **Fragmentation de l'ADN FFPE :** La fragmentation des ADN FFPE par ultrasons a été effectuée sur un automate Covaris E220 (Thermofisher).
Les échantillons de cfDNA n'ont pas subi de traitement par sonication car ils sont déjà à l'état fragmenté au vu des analyses de taille par TapeStation (figure 12A).
- **Quantités de départ :**
 - **cfDNA :** 25 ng sur la base des fragments de tailles comprises entre 100 et 500pb. Pour les échantillons qui contenaient moins de 25 ng, nous avons inclus la totalité de l'extrait.
 - **ADN FFPE :** 200 ng sur la base des dosages d'ADN par Qubit.
- **Préparation de librairie SureSelect^{XT}Low input (Agilent) (figure 14A):**
 1. **Indexation :** Cette étape consiste à accoler des séquences connues appelées « index » aux extrémités des fragments d'ADN. Ces index contiennent :
 - a. Un barcode moléculaire (séquence de 8 nucléotides), qui permet de marquer l'échantillon d'origine des fragments d'ADN. Chaque échantillon se voit attribuer un barcode singulier. Ceci permettra de séquencer plusieurs échantillons ensemble.
 - b. Des séquences qui fixeront les amorces universelles durant les étapes d'amplification.
 - c. Des séquences qui permettront l'attache des fragments d'ADN sur le support de séquençage appelé « flowcell ».

L'indexation s'effectue en plusieurs étapes : Réparation des extrémités d'ADN, ajout d'une adénine en 3', ligation des adaptateurs.
 2. **Amplification « pré-capture » par PCR :** L'amplification permet d'augmenter les quantités d'ADN disponibles. Les amorces de PCR se fixent sur les index. Le nombre de cycle de PCR conseillés dans le protocole dépendait de la quantité de départ ainsi que de la nature de l'ADN (FFPE ou non FFPE). Nous avons choisi d'effectuer **12 cycles**, car ceci convenait à la fois pour les quantités initiales de 25ng (ou moins) de cfDNA et pour 200ng d'ADN FFPE.
 3. **Purification des fragments de 100 – 500 pb:** La purification par bille permet d'éliminer les fragments de grandes tailles. Puis la librairie est qualifiée par TapeStation pour vérifier la PCR et la purification.
 4. **Capture par hybridation à la banque Oneseq :** A cette étape, **1000ng de librairie d'ADN** par échantillon ont été utilisés. Il y a une première phase d'hybridation entre les librairies d'ADN et la banque Oneseq, puis une phase de capture par bille. En effet, la banque de capture est marquée à la biotine, ce qui permet de purifier les fragments d'ADN hybridés par des billes marquées à la streptavidine.
 5. **Amplification « post-capture » par PCR :** Nous avons effectué **11 cycles** d'amplification post-capture comme indiqué dans le protocole. Une étape de qualification par TapeStation a été effectuée par la suite.

Au total 48 bibliothèques d'ADN ont été préparées :

- 16 cfDNA de patientes atteintes d'un HGSC (groupe « malades »).
- 16 ADN FFPE du groupe « malades ».
- 16 cfDNA de témoins dépourvus de tumeur maligne (groupe « témoins »).

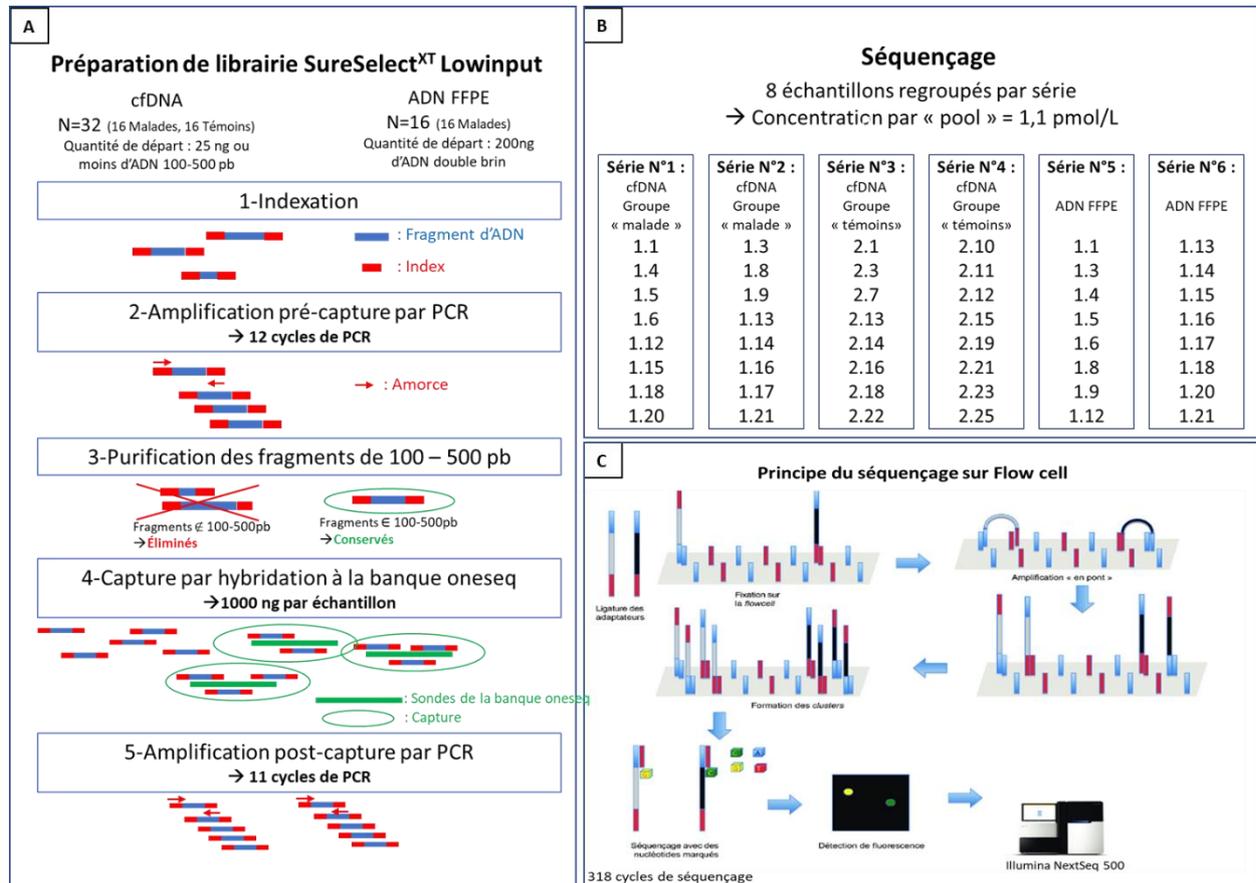


Figure 14 : Étapes de la préparation de bibliothèque SureSelect^{XT}Low Input et séquençage Illumina

(A) Préparation de bibliothèque Sureselect^{XT}Low Input. (B) Séquençage : 6 séries de 8 échantillons (« 1. » = échantillon du groupe des patientes atteintes, « 2. » = échantillon du groupe des témoins) (C) Principe du séquençage sur Flow Cell (adapté de Dortet et al 2017, Feuillet de Biologie 354)

- **Étape de séquençage :**

Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Nextseq 500 (Illumina) avec les supports de séquençage « Flow cell High Output » (capacité de 120 gigabases et 400 millions de reads pour 300 cycles de séquençage). Le système Illumina effectue un séquençage à lectures appariées (« paired-end »). **2x150 cycles de séquençage** ont été effectués.

Il y a au total six séries de séquençage, contenant chacune 8 échantillons (figure 14B). Chaque préparation de librairie est concentrée à 1,1 pM au moment du séquençage.

Principe de la technologie de séquençage Illumina (figure 14C) :

- Fixation des fragments d'ADN sur la Flow Cell High Output.
- Amplification des fragments (« Clusterisation »).
- Séquençage : Les bases nucléotidiques sont incorporées par cycles et émettent une fluorescence spécifique lors de l'incorporation. Une caméra détecte les fluorescences émises sur la Flow Cell. Les bases incorporées n'ont pas d'extrémité 3'OH, ce qui permet de stopper l'élongation à une base. À la fin du cycle la fonction OH est rajoutée aux bases incorporées, et le cycle suivant commence avec l'incorporation de la base suivante.

La limitation à 8 échantillons par Flowcell High output permet d'obtenir un nombre de séquences théoriques (ou « reads » → voir glossaire) plus important par patient, en considérant la flowcell remplie à 100% :

$$\text{Nombre de reads par patient} = \frac{\text{Capacité de la Flowcell}}{\text{nombre d'échantillons}} = \frac{400 \cdot 10^6}{8} = 50 \cdot 10^6 \text{ reads par patient}$$

- **Analyse des données de NGS Oneseq :**

- **Traitement informatique des données de séquençage :**

A la fin du séquençage, un fichier au format FASTQ est disponible pour chaque échantillon séquencé. Le format FASTQ permet de compiler les données de séquences nucléotidiques et les scores de qualité pour chaque base.

Afin de localiser les séquences sur des locus génétiques, les FASTQ sont alignés avec le génome de référence humain (version GRCh37 hg19) grâce aux algorithmes BWA-aligner Illumina. Au final, les fichiers des données alignées sont au format BAM (Binary Alignment Map).

➤ **Analyse des aneuploïdies :**

Trois solutions ont été utilisées pour rechercher les aneuploïdies dans les fichiers BAM :

1. DECon (Detection of exon copy number) :

DECon(78) est un programme de détection d'aneuploïdies rares qui utilise comme référence un pool d'échantillons statistiquement proches en terme de profondeur de lectures. Les profondeurs de lectures sont comparées avec l'échantillon à tester et les aneuploïdies détectées sont associées à un score de probabilité (Bayes Factor).

Références utilisées :

- Pour l'analyse des ADN FFPE : Le pool d'ADN FFPE entier (16 échantillons).
- Pour l'analyse des cfDNA : le pool de cfDNA provenant des témoins (16 échantillons).

L'outil DECon effectue par la suite un choix adapté de références pour chaque échantillon test parmi ceux du pool fourni.

2. Surecall (Agilent) :

Surecall est un logiciel proposé par la société Agilent, adapté à l'analyse de données de NGS Oneseq. Les aneuploïdies sont obtenues par comparaison de l'échantillon test avec une référence choisie par l'utilisateur.

Référence utilisée : L'échantillon d'ADN FFPE de la patiente 1.3, car il ne s'agissait pas d'un prélèvement de HGSC. La diploïdie de cet échantillon a été objectivée par SNP array.

3. CNAclinic :

CNAclinic(66) est un outil d'analyse des aneuploïdies pan-génome en libre accès. Les aneuploïdies sont obtenues par comparaison de l'échantillon test avec une référence choisie par l'utilisateur. Les paramètres suivants ont été définis au préalable pour l'analyse :

- **Taille des zones génomiques comparées = 100kbp.**
- $Log_2 Ratio = \log_2\left(\frac{Nombre\ de\ reads\ test}{Nombre\ de\ reads\ référence}\right)$
- Normalisation du nombre de reads en fonction des taux de GC.
- **Seuil de détection des gains ou pertes : Log2 ratio +/-0,15 (soit <1,8 copies ou >2,2 copies)**
- **Interprétation des Log2 ratio par les méthodes HMM (Hidden Markov Model) et CBS (Circular Binary Segmentation),** afin de détecter des zones d'aneuploïdies statistiquement significatives.
- **Utilisation de trois échantillons de référence pour chaque test :** Seules les aneuploïdies détectées pour les trois références ont été retenues, afin d'éviter les faux positifs.
 - Références utilisées : deux échantillons cfDNA témoins et l'échantillon d'ADN FFPE de la patiente 1.3.

➤ **Analyse des mutations *TP53* :**

La séquence nucléotidique du gène *TP53* a été analysée sur le logiciel Alamut Visual à partir des données de NGS Oneseq. Seuls les variants probablement pathogène ou pathogène ont été retenus. Il s'agit respectivement des classes 4 et 5 selon les critères de l'American College of Medical Genetics and Genomics(79).

Les patientes du groupe malade ont été analysées par le panel NGS de diagnostic du laboratoire de génétique constitutionnelle de l'institut Bergonié, sur les échantillons d'ADN FFPE et sur des échantillons d'ADN leucocytaire. Ce panel NGS contient entre autres le gène *TP53*, ce qui a permis de vérifier la concordance des mutations détectées sur ce gène avec la technique NGS Oneseq.

3.5 Phase analytique : SNP-array (Oncoscan)

Oncoscan est une technique de SNP-array proposée par la société Affymetrix(80). Cette technique est utilisée en pratique courante à l'institut Bergonié pour analyser les aneuploïdies sur les échantillons d'ADN FFPE. La quantification des aneuploïdies s'effectue grâce à des sondes « MIP » (Molecular Inversion Probe) spécifiques d'allèles sur 220 000 SNP, et quantifiées sur une puce à ADN (Figure 15).

Au total, les 16 échantillons d'ADN FFPE et 4 échantillons de cfDNA ont été analysés par SNP array. L'analyse des données de SNP array a été effectuée par l'intermédiaire du logiciel CHAS analysis (Affymetrix). **Cette technique de SNP array sert de référence pour mettre au point l'analyse des aneuploïdies sur ADN FFPE tumorales par NGS Oneseq.**

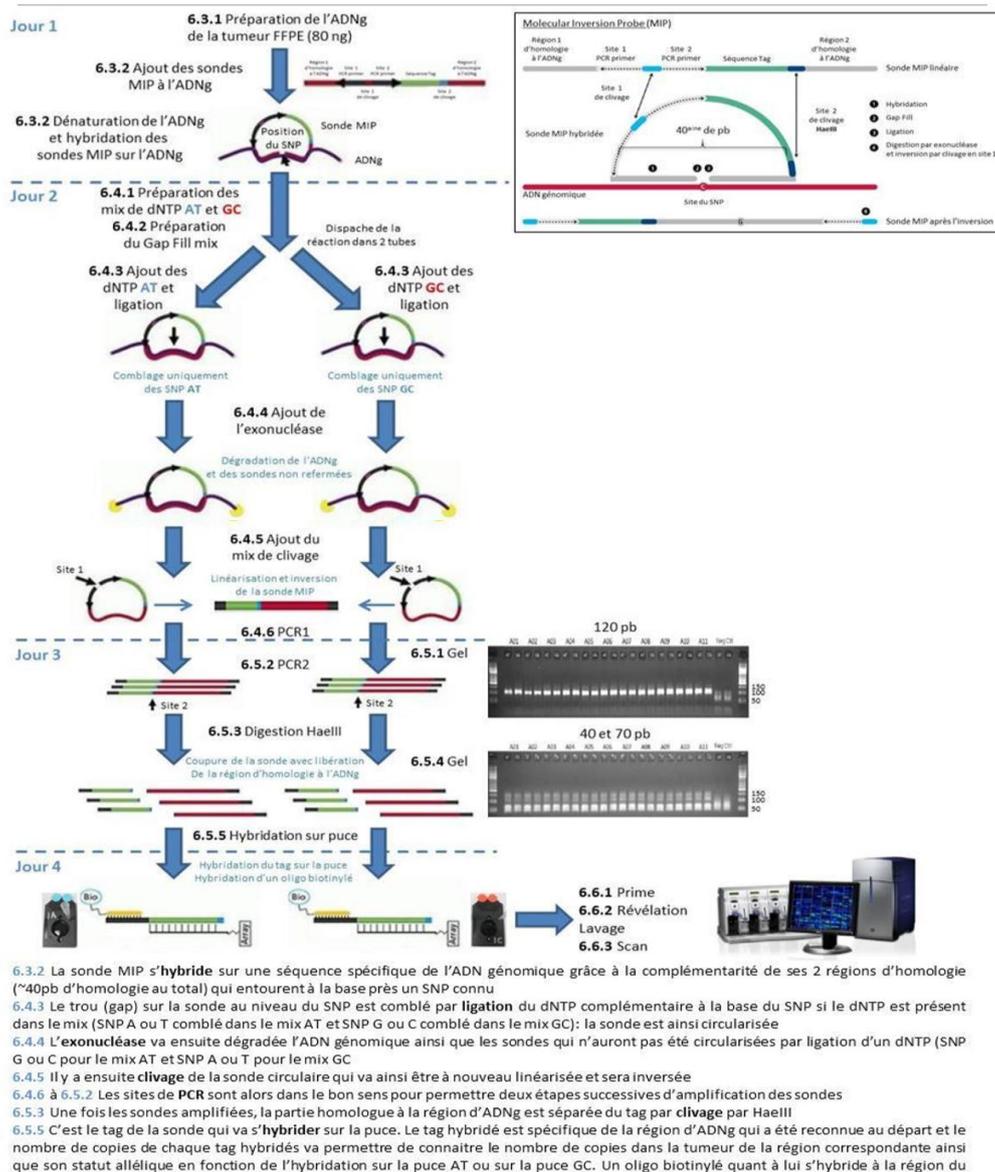


Figure 15 : Descriptif de la technique de SNP array Oncoscan

La comparaison des aneuploïdies obtenues par SNP array et par NGS Oneseq a été effectuée sur le site usegalaxy.com en utilisant l'outil bedtools intersect.

4 Résultats

Nous décrivons successivement :

- ➔ Les résultats de mise au point du NGS Oneseq sur ADN FFPE, par comparaison avec la technique de SNP array.
- ➔ Les résultats du NGS Oneseq sur les échantillons de cfDNA des patientes atteintes de HGSC (recherche d'aneuploïdie et de mutation *TP53*), et une analyse in silico de la sensibilité de détection des aneuploïdies tumorales dans le cfDNA.

Concernant les aneuploïdies, Les échantillons sont dits **fortement remaniés** lorsque la taille des aneuploïdies dépasse **10% de la taille du génome**.

4.1 Mise au point de la technique NGS Oneseq sur ADN FFPE :

- **Méthode de référence : SNP array (Oncoscan) :**

L'analyse des ADN FFPE par SNP array montre que 15 échantillons sont fortement remaniés (figure 16) et un échantillon présente un profil diploïde. Il s'agit de l'échantillon 1.3 qui correspond histologiquement à un carcinome séreux de **bas grade**.

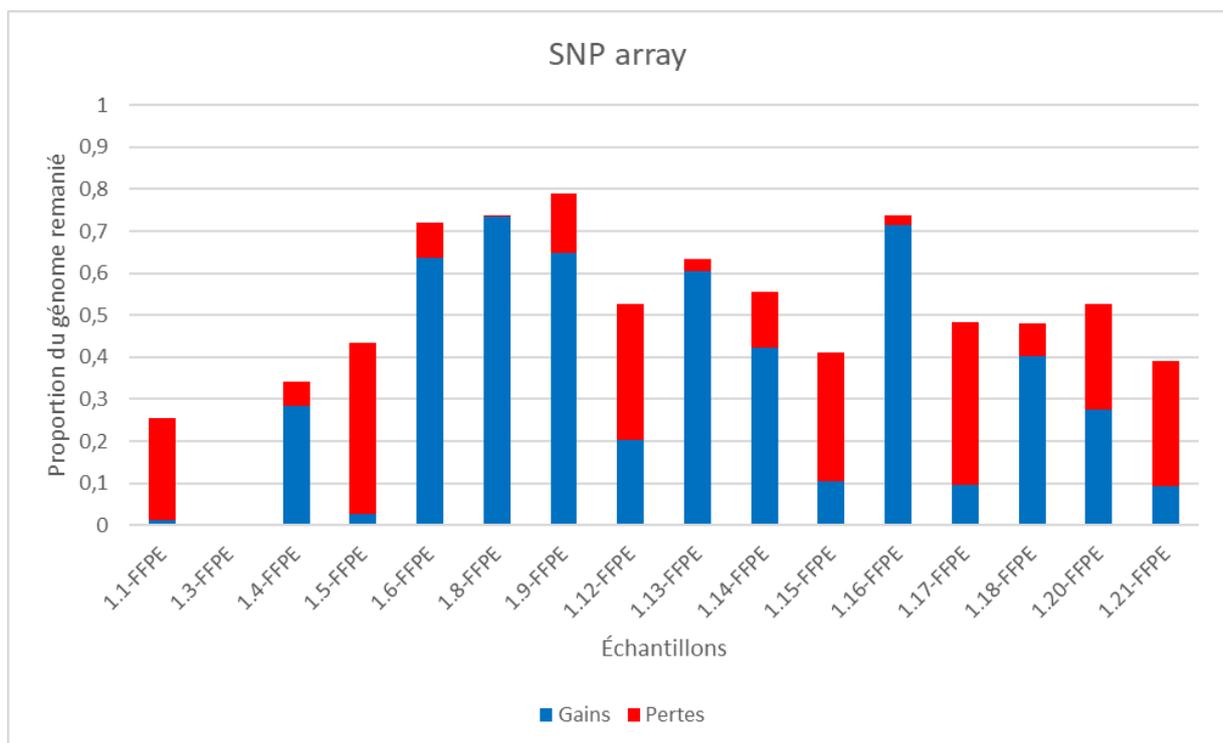


Figure 16 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d'ADN FFPE par SNP array

La couleur bleue représente des gains d'ADN et la couleur rouge des pertes d'ADN. En ordonnée la proportion du génome remanié.

Les aneuploïdies observées au niveau des 16 gènes fréquemment modifiés dans les HGSC sont représentées en figure 17. L'ensemble des échantillons d'ADN FFPE provenant de HGSC présente une délétion ou une perte d'hétérozygotie au niveau du gène *TP53*. Les autres anomalies retrouvées concordent avec les données du TCGA (voir discussion).

	<i>CCNE1</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>MYC</i>	<i>MECOM</i>	<i>TP53</i>	<i>BRCA1</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>NF1</i>	<i>CDK12</i>	<i>BRCA2</i>	<i>RB1</i>	<i>PTEN</i>	<i>CCND1</i>	<i>EMSY</i>	<i>PAK1</i>
1.1-Oncoscan					+											
1.3-Oncoscan																
1.4-Oncoscan					+											
1.5-Oncoscan					+								+			
1.6-Oncoscan					+											
1.8-Oncoscan					+											
1.9-Oncoscan					+											
1.12-Oncoscan					+											
1.13-Oncoscan					+											
1.14-Oncoscan					+											
1.15-Oncoscan					+											
1.16-Oncoscan					+											
1.17-Oncoscan					+	+										
1.18-Oncoscan					+											
1.20-Oncoscan					+											
1.21-Oncoscan					+											

Figure 17 : Aneuploïdies par gène d'intérêt dans les ADN FFPE analysés par SNP array

Le bleu représente un gain du gène, le rouge une perte (délétion ou perte d'hétérozygotie). Le symbole « + » indique la présence d'une mutation ponctuelle délétère sur le gène (détectée sur le panel NGS diagnostic du laboratoire d'oncogénétique constitutionnelle).

- **Méthode à mettre au point : NGS Oneseq :**

Les données issues du séquençage des échantillons d'ADN FFPE par NGS Oneseq ont été analysées par trois logiciels de détection des aneuploïdies : DECon, Surecall et CNAclinic. Nous présentons les résultats pour chacun de ces logiciels.

- **Analyse par DECon (figure 18) :**

L'analyse par le logiciel DECon n'a pas permis de détecter de grands remaniements, aucun des 16 échantillons ne présente plus de 10% du génome remanié.

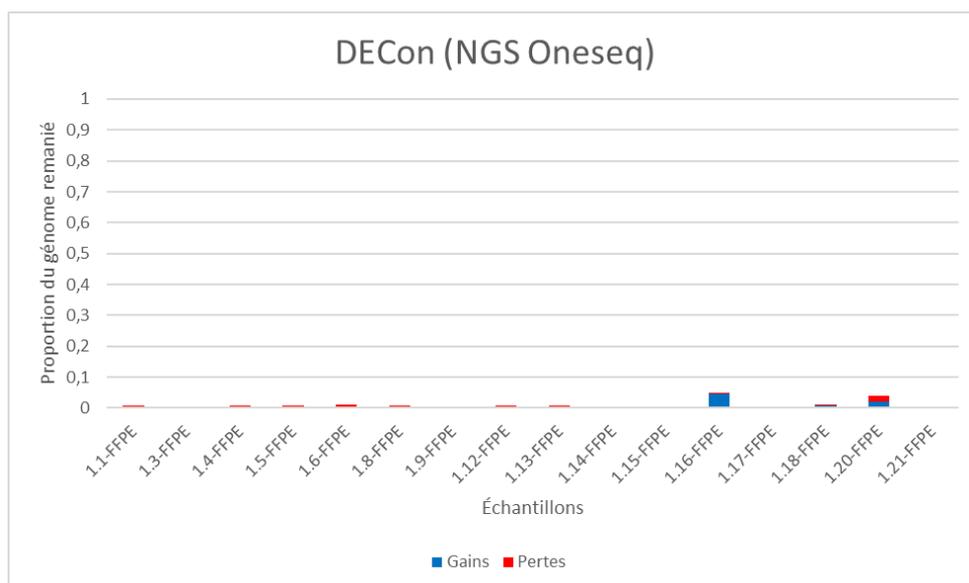


Figure 18 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d'ADN FFPE par DECon (NGS Oneseq).

➤ **Analyse par Surecall (figure 19) :**

L'analyse par le logiciel Surecall des échantillons d'ADN FFPE montre **12 échantillons sur 15 analysés fortement remaniés**. L'échantillon 1.15 FFPE n'a pas été analysé suite à une erreur technique.

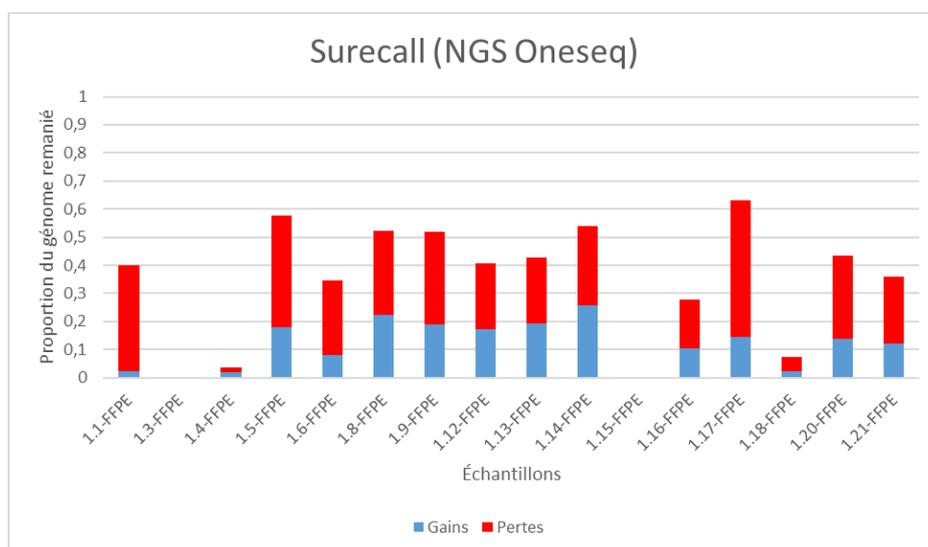


Figure 19 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d'ADN FFPE par Surecall (NGS Oneseq)

➤ **Analyse par CNAclinic (figure 20) :**

L'analyse par CNAclinic des échantillons d'ADN FFPE montre **13 échantillons sur 15 analysés fortement remaniés**. L'échantillon 1.6 FFPE n'a pas été analysé suite à un problème technique.

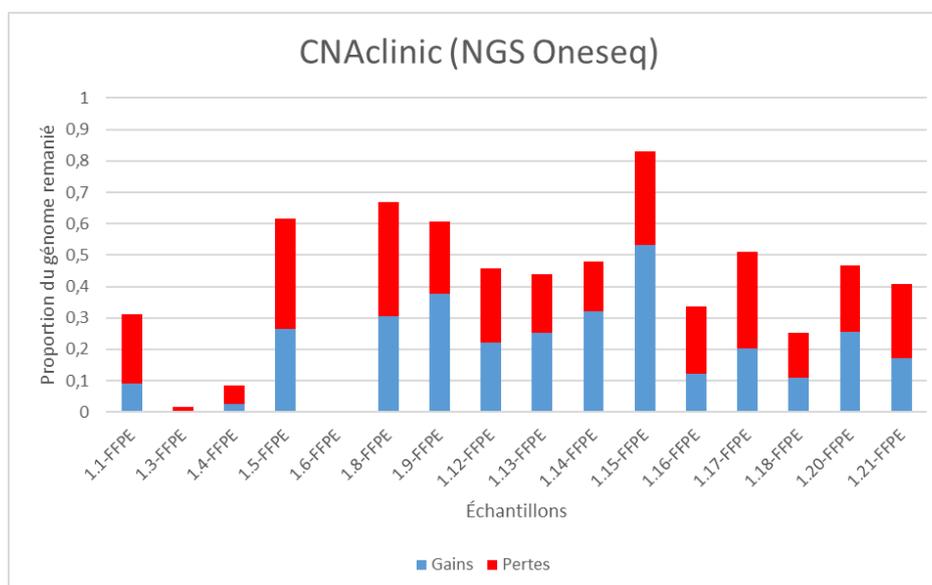


Figure 20 : Aneuploïdies détectées sur les échantillons d'ADN FFPE par CNAclinic (NGS Oneseq).

Afin de confronter les efficacités des trois logiciels (DECon, Surecall et CNAclinic), les aneuploïdies ont été précisément comparées avec la méthode de référence (SNP-Array).

- **Comparaison des aneuploïdies tumorales détectées par SNP array et NGS Oneseq :**

L'outil bedtools intersect a permis de comparer les coordonnées génomiques des aneuploïdies obtenues par SNP array (référence) et par chacun des trois logiciels d'analyse des données NGS Oneseq (figure 21).

Plusieurs échantillons ont été exclus de l'analyse de comparaison : 1.3 car non HGSC, 1.6 car pas de résultat sur CNAclinic, 1.15 car pas de résultat sur Surecall.

Les aneuploïdies détectées par CNAclinic présentent le plus de similitudes avec la référence (70% de similitude en médiane). Surecall et DECon montrent respectivement 25 et 0,3% de concordances médianes.

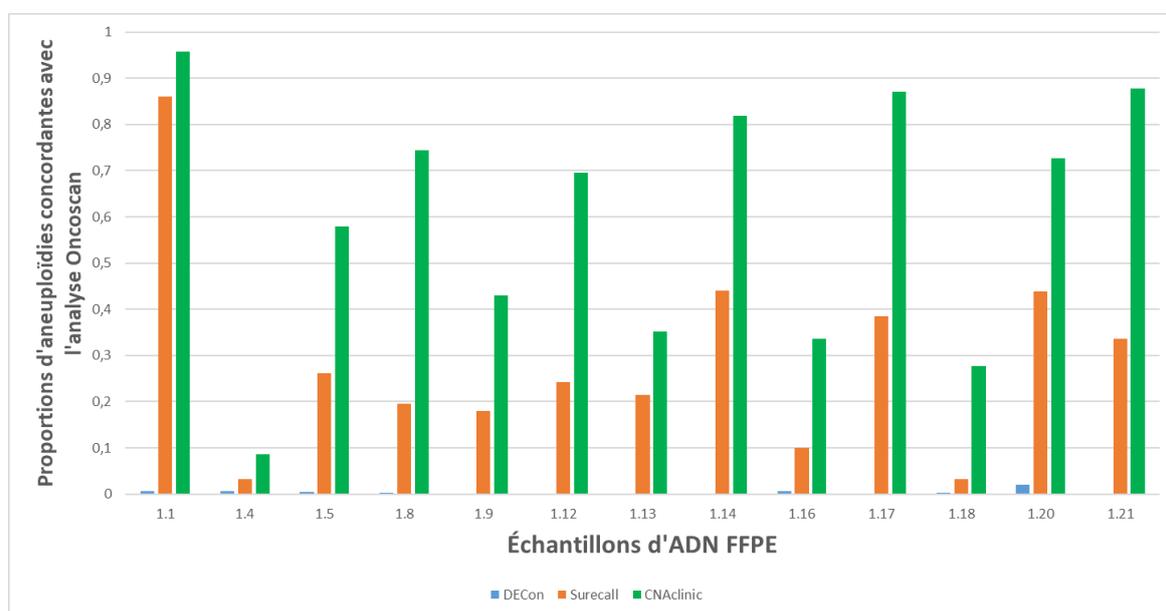


Figure 21 : Concordances des aneuploïdies sur ADN FFPE par NGS Oneseq et par SNP array

En ordonnée les proportions d'aneuploïdies similaires avec le SNP array. En bleu DECon, en orange Surecall et en vert CNAclinic.

Afin de confirmer l'origine tumorale des aneuploïdies détectées par l'analyse NGS Oneseq - CNAclinic, ces dernières ont été comparées avec les données du TCGA.

- **Comparaison des aneuploïdies tumorales détectées par NGS Oneseq CNAclinic avec le TCGA :**

Les aneuploïdies retrouvées par CNAclinic ont été comparées aux données d'aneuploïdies de 572 ADN tumoraux de HGSC compilées par le TCGA(81). A noter que seuls les autosomes sont analysés par CNAclinic (figure 22).

La comparaison montre que les anomalies retrouvées par l'analyse NGS Oneseq - CNAclinic concordent visuellement avec les données du TCGA. Des anomalies récurrentes sont retrouvées, telles que les gains au niveau des chromosomes 1, 2, 3, 8q et 20 ; et des pertes au niveau des chromosomes 4, 5, 6, 9, 16, 17 et 18. Les données du TCGA et celles du NGS Oneseq - CNAclinic montrent néanmoins une importante hétérogénéité inter-échantillons des aneuploïdies.

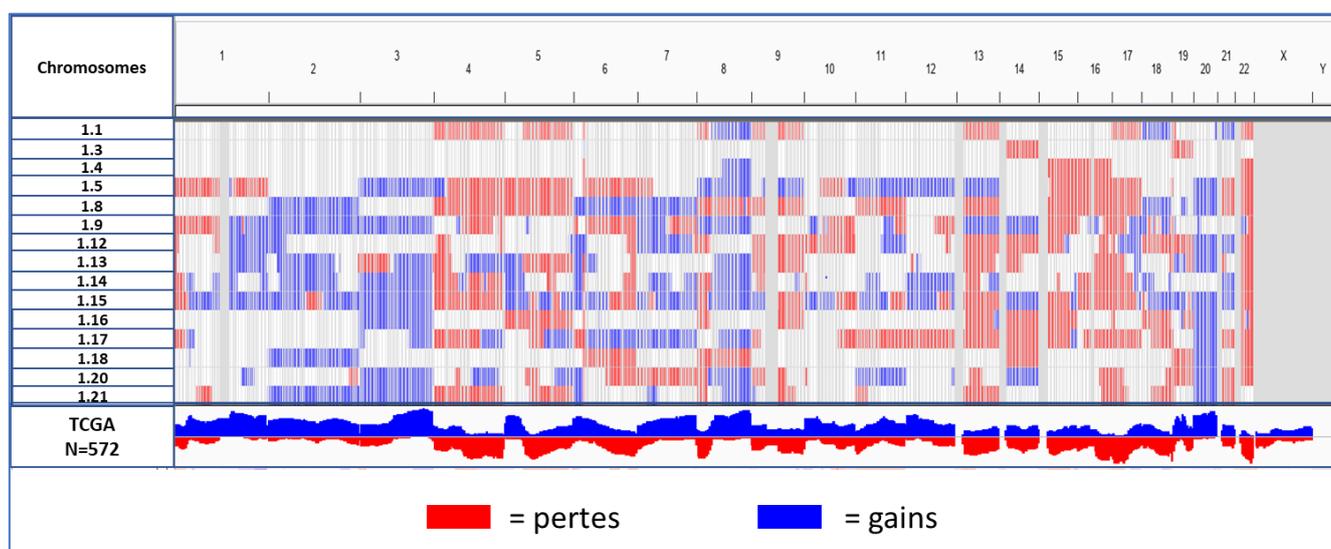


Figure 22 : Comparaison des aneuploïdies retrouvées sur les ADN FFPE des HGSC par CNAclinic avec les données du TCGA

Le bleu représente un gain, le rouge une perte (délétion). Les données de CNAclinic sont représentées pour 15 échantillons (une ligne = 1 échantillon). Les données du TCGA sont représentées en cumulé pour les 572 patientes (proportion de gains / pertes à chaque position).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'analyse des données de NGS Oneseq par CNAclinic permet de détecter les aneuploïdies d'origine tumorale de manière satisfaisante sur les échantillons d'ADN FFPE des HGSC (voir discussion).

La deuxième partie des résultats est consacrée à l'analyse des échantillons de cfDNA des patientes atteintes.

4.2 Analyse des échantillons de cfDNA des patientes atteintes de HGSC

Ce chapitre est divisé en deux parties : la recherche des aneuploïdies et le recherche de mutation *TP53*.

4.2.1 Recherche d'aneuploïdies :

- **Résultat du NGS Oneseq et SNP array sur les échantillons de cfDNA :**

La recherche d'aneuploïdies dans le cfDNA a été effectuée par NGS Oneseq, et également par SNP array pour les échantillons restants en quantités suffisantes.

Les 16 échantillons de cfDNA des patientes atteintes ont été analysés par NGS Oneseq via les trois logiciels : DECon, Surecall et CNAclinic. **Aucune aneuploïdie significative n'a été retrouvée.**

Quatre échantillons d'ADN plasmatiques circulants ont été analysés par SNP array (1.4, 1.5, 1.6, 1.20). **Aucun d'entre eux n'a montré d'aneuploïdie significative.**

Afin d'étudier la faisabilité de la technique sur les échantillons de cfDNA malgré l'absence de résultat, une évaluation de la sensibilité de détection des aneuploïdies in silico a été effectuée.

- **Évaluation in silico de la sensibilité de détection des aneuploïdies dans le cfDNA par NGS Oneseq / CNAclinic :**

La **première étape** a consisté à modéliser les limites de détection par NGS Oneseq - CNAclinic des aneuploïdies tumorales dans le cfDNA. La **deuxième étape** a consisté à utiliser cette modélisation pour calculer les proportions de ctDNA minimales qui auraient permis de détecter les aneuploïdies tumorales dans la cohorte des 15 patientes malades. La **troisième étape** correspond à l'analyse par CNAclinic d'une gamme de dilution in silico de l'ADN FFPE 1.8 avec de l'ADN diploïde pour confirmer les résultats de la modélisation.

1. Modélisation des limites de détection de ctDNA dans les échantillons de cfDNA :

La sensibilité de détection des aneuploïdies tumorales dans le cfDNA dépend principalement de trois critères :

- Les pourcentages de ctDNA dans l'échantillon de cfDNA, de 0% à 100%
- Les valeurs de ploïdies des gains et pertes dans l'ADN tumoral (échelle choisie de 0 à 30 copies).
- Les seuils de détections des outils de recherche d'aneuploïdies, avec pour CNAclinic respectivement >2,2 copies pour les gains et <1,8 copies pour les pertes.

La ploïdie d'un échantillon de cfDNA possède une **composante tumorale** (ctDNA) et une **composante non tumorale**, que l'on peut exprimer comme suit :

$$\text{Ploïdie cfDNA} = \%ctDNA \times \text{ploïdie T} + (1 - \%ctDNA) \times 2$$

Avec ploïdie T = ploïdie tumorale

On applique les limites de détection respectives des **pertes (1,8)** et gains (2,2) pour obtenir deux fonctions :

$$\text{Pertes}_{]0 \rightarrow 2[} \rightarrow \%ctDNA = \frac{-0,2}{(\text{ploïdie T} - 2)} \quad \text{Gains}_{]2 \rightarrow +\infty[} \rightarrow \%ctDNA = \frac{0,2}{(\text{ploïdie T} - 2)}$$

Ces deux fonctions modélisent les limites de détection des aneuploïdies **l'une applicable pour les pertes (aneuploïdies strictement inférieures à 2 copies)**, l'autre applicable pour les gains (aneuploïdies strictement supérieures à 2 copies) (figure 23).

La figure 23 montre que pour un échantillon de cfDNA comportant 10% de ctDNA, seules les aneuploïdies supérieures à 4 copies sont détectées.

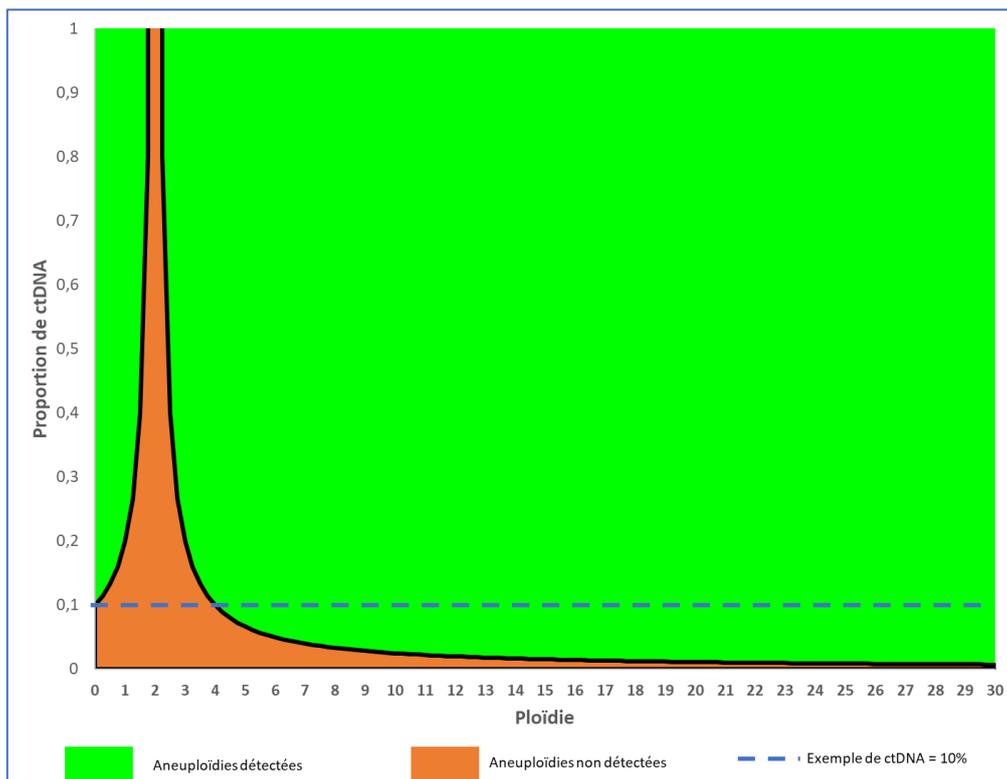


Figure 23 : Modélisation des zones d'aneuploïdies détectables dans les échantillons de cfDNA

En fonction de la proportion de ctDNA (abscisse) et en fonction des valeurs d'aneuploïdies de l'ADN tumoral (ordonnée). En vert, la zone où sont détectées les aneuploïdies ; en orange la zone où les aneuploïdies ne sont pas détectées.

2. Proportions de ctDNA requis pour détecter les aneuploïdies chez les 15 patientes atteintes de HGSC :

Le tableau 7 regroupe les valeurs de ploïdies maximales et minimales détectées pour chaque échantillon d'ADN FFPE. Ces valeurs ont été ajustées proportionnellement au pourcentage de cellules tumorales dans l'échantillon FFPE (évalué par l'algorithme Tuscan lors de l'analyse par SNP array)(82). Aucun ajustement n'a été effectué pour les échantillons 1.4, 1.9, 1.12, 1.13, 1.15, 1.18 et 1.20 car l'algorithme Tuscan n'a pu calculer les proportions de cellules tumorales de ces échantillons.

Pour chaque échantillon, les ploïdies maximales et minimales ont permis de calculer les proportions de ctDNA minimales requises pour atteindre le seuil de détection.

Échantillon	Gains		Pertes	
	Ploïdie max	%ctDNA requis	Ploïdie min	%ctDNA requis
1.1	4,74	7,3	0,34	12,0
1.4	3,69	11,8	0,45	12,9
1.5	11,07	2,2	0,77	16,3
1.6	3,64	12,2	3,64	12,2
1.8	30,82	0,7	0,87	17,7
1.9	5,28	6,1	0,03	10,2
1.12	5,88	5,2	0,47	13,1
1.13	2,81	24,8	0,63	14,6
1.14	4,59	7,7	0,32	11,9
1.15	10,55	2,3	0,19	11,1
1.16	9,77	2,6	0,80	16,7
1.17	6,85	4,1	0,38	12,4
1.18	3,70	11,8	0,40	12,5
1.20	4,56	7,8	0,25	11,4
1.21	13,50	1,7	1,13	23,0
Médiane		6,1		12,5

Tableau 7 : Pourcentages de ctDNA requis pour détecter les ploïdies maximale et minimale par échantillon d'ADN tumoral.

En orange la proportion de ctDNA la plus basse détectable pour chaque échantillon.

Les proportions de ctDNA minimales requises pour détecter les aneuploïdies tumorales dans la cohorte des 15 patientes atteintes de HGSC vont de 0,7% à 12,2%. Les gains permettent d'obtenir un seuil de détection plus bas que les pertes (médiane de 6,1% contre 12,5% pour les pertes).

3. Dilution in silico d'un ADN FFPE

Une gamme de dilution in silico de l'échantillon d'ADN FFPE de la patiente 1.8 a été effectuée. L'ADN diploïde « diluant » est l'ADN FFPE de la patiente 1.3. Sept points de dilutions ont été testés : 1%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90% et 99%.

Les dilutions et les assemblages de BAM dilués ont été effectués grâce aux outils « Downsample SAM/BAM » du pack « Picard tools » et « Samtools merge » du pack « Samtools ». L'analyse des aneuploïdies a été effectuée par l'outil CNAclinic.

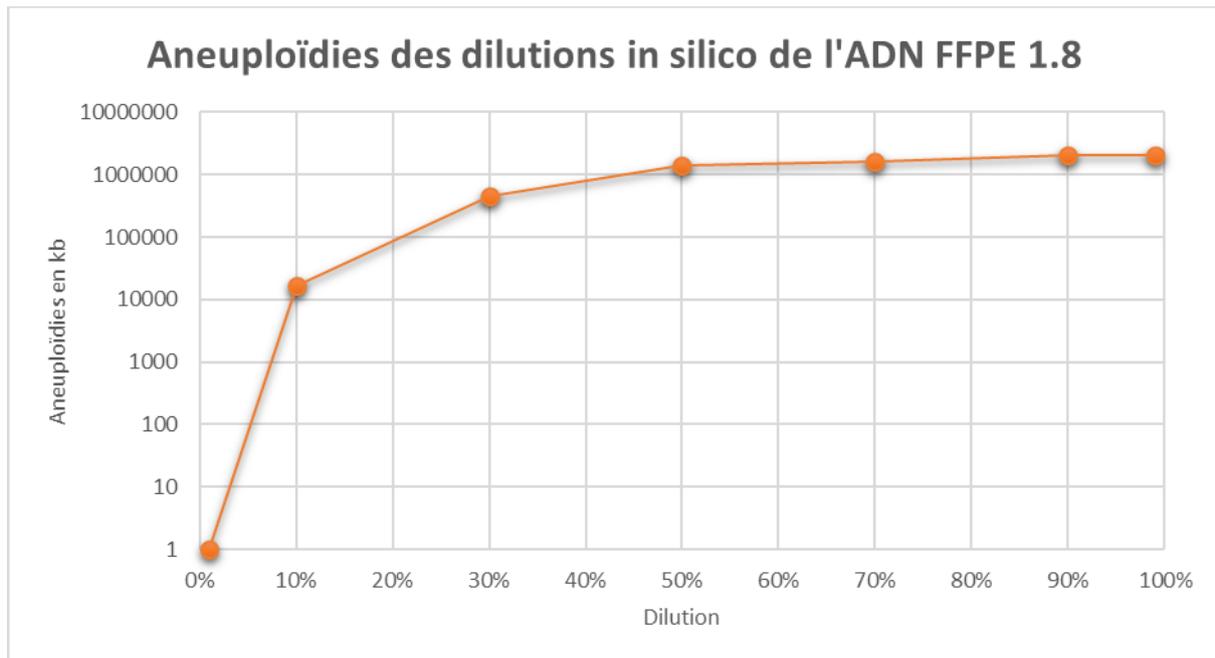


Figure 24 : Sensibilité de détection des aneuploïdies après dilutions in silico de l'ADN FFPE 1.8.

L'échantillon 1.8 présente des aneuploïdies détectables à 10% de dilution. Il s'agit des amplifications au niveau des gènes *CCNE1* (ploïdie non ajustée = 14 copies) et *MYC* (ploïdie non ajustée = 10 copies). Il n'est pas détecté d'amplifications pour une dilution à 1% ce qui est également prédit par la modélisation où une ploïdie de 14 ne se détecte pas en dessous de 1,6% de ctDNA :

$$\rightarrow \%ctDNA = \frac{0,2}{(14 - 2)} = 0,016$$

A noter que dans le tableau 7, le seuil requis de ctDNA pour l'ADN tumoral de la patiente 1.8 descend à 0,7%. Il s'agit du seuil ajusté au pourcentage de cellules tumorales (évalué à 45%). Les échantillons de BAM dilués in silico ne peuvent pas être ajustés car les outils utilisés ne différencient pas les séquences provenant d'ADN tumoral de celles provenant d'ADN non tumoral. C'est pourquoi aucune aneuploïdie n'est détectée à 1% dans l'expérience de dilution in silico.

4.2.2 Recherche de mutation *TP53* dans les échantillons de cfDNA

Les analyses des exons du gène *TP53* par NGS Oneseq permettent de retrouver :

- **Quatorze échantillons d'ADN FFPE (sur quinze HGSC) qui montrent la présence d'une mutation somatique délétère du gène *TP53*.** Les 14 mutations *TP53* avaient également été détectées dans ces mêmes échantillons par le panel NGS du laboratoire d'oncogénétique constitutionnelle (non montré).
- **Trois échantillons de cfDNA avec une mutation *TP53* délétère non leucocytaire** (patientes 1.5, 1.6, 1.18). Les mutations délétères du gène *TP53* somatique sont retrouvées dans le cfDNA sur 3 lectures pour les échantillons 1.5 et 1.18 et sur 2 lectures pour l'échantillon 1.6. Cependant, le faible nombre de lecture ne permet pas de discriminer une vraie mutation d'un artefact. En effet, le bruit de fond du séquençage par synthèse sur NextSeq550 est d'environ 1%(83).
- **Deux échantillons de cfDNA avec une mutation *TP53* délétère retrouvée dans l'ADN leucocytaire** (patientes 1.14 et 1.17). Probable hématoïèse clonale (cf discussion).

Patientes	Mutations <i>TP53</i> (ADN FFPE / cfDNA ou ADN Leucocytaire)	Fraction allélique ADN FFPE	Fraction allélique cfDNA	ADN leucocytaire
1.1	c.818G>A	81%	0% (0/592X)	0%
1.4	c.818G>A	31%	0% (0/652X)	0%
1.5	c.770T>A	88%	0,12% (3/2322X)	0%
1.6	c.797G>A	55%	0,45% (2/447X)	0%
1.8	c.824G>A	64%	0% (0/661X)	0%
1.9	c.586C>T	97%	0% (0/593X)	0%
1.13	c.536A>G	67%	0% (0/701X)	0%
1.14	c.814G>A	83%	0% (0/491X)	0%
	c.488A>G	1%	5% (42/843X)	6%
1.15	c.673-3T>G	80%	0% (0/591X)	0%
1.16	c.517G>A	46%	0% (0/670X)	0%
1.17	c.818G>T	56%	0% (0/722X)	0%
	c.637C>G	0%	2% (16/807X)	2%
1.18	c.742C>T	26%	0,19% (3/1512X)	0%
1.20	c.102delC	62%	0% (0/574X)	0%
1.21	c.853G>A	33%	0% (0/928X)	0%

Tableau 8 : Fréquences alléliques des mutations délétères du gène *TP53* retrouvées dans les échantillons d'ADN FFPE de cfDNA et d'ADN leucocytaire.

Profondeurs de lecture entre parenthèses. Les données concernant l'ADN leucocytaire ont été récupérés des analyses NGS par panel effectuées lors de l'activité de routine du laboratoire.

5 Discussion

Nous discuterons d'abord de la mise au point des recherches d'aneuploïdies tumorales par NGS Oneseq via l'analyse des ADN FFPE, où le logiciel CNAclinic montre les résultats les plus fiables.

En deuxième partie nous confrontons notre analyse des échantillons de cfDNA avec la bibliographie, afin de discuter de la faisabilité de ces tests en conditions de dépistage des HGSC chez les femmes à risque.

La dernière partie sera consacrée aux perspectives d'améliorations de ce travail.

5.1 Mise au point de l'analyse NGS Oneseq sur ADN FFPE :

La technique de référence utilisée pour la mise au point a été l'analyse des 16 échantillons d'ADN FFPE par SNP-array (Oncoscan). Les 15 échantillons provenant de tumeurs HGSC sont remaniés (figure 16), tandis que l'échantillon 1.3 provenant d'une tumeur séreuse de bas grade est diploïde. L'analyse des gènes fréquemment remaniés (figure 17) retrouve les pertes au niveau de *TP53* (14/15) et d'autres anomalies courantes dans ces tumeurs : gains des gènes *CCNE1* (7/15), *MECOM* (14/15), *MYC* (12/15) ou perte des gènes *RB1* (11/15) *PTEN* (5/15).

L'analyse des données de NGS Oneseq a été effectuée par trois logiciels : DECon, Surecall et CNAclinic. Les aneuploïdies ont été représentées pour chaque échantillon d'ADN FFPE (figures 18, 19 et 20) puis comparées aux résultats de SNP array (figure 21).

Le logiciel DECon n'a pas permis de détecter d'aneuploïdies tumorales (figures 18 et 21). Ce résultat a été étudié à la lumière du mode de fonctionnement du programme. DECon a été conçu pour rechercher des anomalies rares dans des échantillons proches en terme de profondeurs de lectures tels que des exomes d'ADN leucocytaire(84). Un pool d'échantillon est choisi par l'utilisateur et la corrélation entre les éléments du pool doit être supérieure à 0,98 pour détecter des anomalies significatives. En constituant les pools d'ADN FFPE, les corrélations entre échantillons étaient trop basses (<0,9). Ceci s'explique par le fait que les tumeurs HGSC sont porteuses d'aneuploïdies sur de larges portions du génome, avec une variabilité inter-échantillon importante. Au final, le logiciel DECon ne semble pas utilisable sur des échantillons aussi remaniés que des tumeurs HGSC.

Le logiciel Surecall a donné de meilleurs résultats que DECon, avec 25% d'anomalies similaires à l'analyse en SNP array (figures 19 et 21). Cependant, les résultats pourraient être améliorés en multipliant les références, puisque le logiciel restreint l'analyse à l'usage d'un seul échantillon de référence. De plus, l'analyse Surecall retrouve quantitativement moins d'aneuploïdies que par SNP array, ce qui peut être causé par des seuils de détections trop élevés.

Le logiciel CNAclinic a donné les résultats les plus prometteurs en retrouvant des remaniements sur 13 des 15 échantillons de HGSC (figure 20) et en montrant 70% de similitude avec les résultats de SNP array. L'origine tumorale des aneuploïdies a été confirmée lorsque les 15 échantillons d'ADN FFPE ont été comparés aux données du TCGA comportant les aneuploïdies de 572 échantillons de HGSC (figure 22). Les profils se superposent et confirment que l'analyse par CNAclinic des données de NGS Oneseq est fiable pour détecter les aneuploïdies tumorales des HGSC dans l'ADN FFPE.

5.2 Analyses sur cfDNA (mutations *TP53* / aneuploïdies) dans le contexte des HGSC

Les principales anomalies génétiques retrouvées dans les HGSC sont représentées par une mutation *TP53* délétère et des aneuploïdies. Nous discutons ici de la pertinence de la recherche de ces anomalies dans le cfDNA pour constituer un test de dépistage des HGSC chez les femmes à risque.

- **Concernant la recherche de mutations somatiques *TP53* dans le cfDNA :**

Au maximum, trois échantillons de cfDNA sur les 16 analysés montrent la présence de ctDNA à de faibles fréquences alléliques (tableau 8). Ces résultats ne sont cependant pas exploitables car ils sont détectés dans la gamme du signal du bruit de fond. Afin de documenter la faisabilité de telles recherches, nous analysons une revue bibliographique des articles ayant recherché la présence de ctDNA par analyse du gène *TP53* chez des patientes atteintes de HGSC (avant, pendant ou après la chimiothérapie selon les articles) (tableau 9).

Études	Technique	Contexte clinique	Détection de mutation somatique <i>TP53</i> (cfDNA)
Piskorz et al 2017(85)	NGS ciblé (6916X)	Avant chimiothérapie	18/18 (FA médiane = 5,1%)
Christie et al 2017(86)	NGS ciblé (> 15000X)	Avant chimiothérapie	1/1 (FA = 1%)
		Pendant la chimiothérapie	2/3 (FA médiane < 1%)
Radke et al 2019(87)	NGS ciblé (586 à 6026X)	Rechute avant chimiothérapie	107/112 (FA médiane de 3,1%)
Phallen et al(65)	NGS ciblé (30000X)	Avant chimiothérapie (Présence de formes non disséminées)	44/71 (FA de 0,1 à > 10%)
Pereira et al(88)	ddPCR	Avant chimiothérapie	8/10 (médiane de 50 événements/μL)
		Après chimiothérapie	5/10 (médiane de 2,5 événements/μL)
Parkinson et al(89)	ddPCR	Suivi pendant la chimiothérapie	NADIR = 37 jours (26 patientes)
Kim et al(90)	ddPCR	Suivi pendant la chimiothérapie	15/16 patientes avec FA <0,5% (Après le 2 ^e cycle de chimiothérapie)
Projet de thèse	NGS Oneseq (665X)	Avant chimiothérapie	1/1 ou 0/1
		Pendant la chimiothérapie	2/14 ou 1/14 ou 0/14

Tableau 9 : Travaux scientifiques portant sur la recherche de mutation somatique du gène *TP53* dans des échantillons de cfDNA chez des patientes atteintes de HGSC

*FA = Fréquence Allélique, X = profondeur de lecture médiane sur le gène *TP53**

Les taux de mutations somatiques du gène *TP53* détectés dans le cfDNA **avant la chimiothérapie** sont très significatifs pour les patientes atteintes de HGSC, quel que soit la technique utilisée (NGS ou ddPCR). Les travaux de Phallen et al présentent un taux de détection plus faible avant chimiothérapie par rapport aux autres publications (**44/71** vs 107/112 ou 18/18 ou 8/10) (65). Ceci s'explique par le fait que ces travaux incluent des atteintes tumorales non disséminées de HGSC (stades I et II) contrairement aux autres.

Le travail de thèse ne comporte qu'un seul échantillon de cfDNA provenant d'une patiente avant la chimiothérapie (patiente 1.18), pour lequel une mutation *TP53* a été retrouvée à 0,19% par NGS Oneseq. Cependant nous ne pouvons exclure un artefact devant le faible nombre de lectures (tableau 8).

Les taux de mutations somatiques du gène *TP53* détectés dans le cfDNA **pendant ou après chimiothérapie** sont faibles. En NGS ciblé à haute profondeur (>15000X), les travaux de Christie et al détectent des fractions alléliques résiduelles inférieures à 1% pour 2/3 patientes en cours de chimiothérapie. En ddPCR, les travaux de Pereira et al retrouvent des traces de ctDNA après chimiothérapies, cependant le nombre d'évènement par μL se réduit considérablement par rapport aux analyses en pré-chimiothérapies (50 évènements/ μL avant et 2,5 évènements / μL après). De plus, deux publications ont effectué un suivi par ddPCR pendant les traitements par chimiothérapie de patientes atteintes de HGSC :

- Travaux de Parkinson et al(89) : la circulation d'allèles mutés *TP53* atteint un minimum 37 jours après le début de la chimiothérapie (NADIR) ;
- Les travaux de Kim et al(90) : Après le 2^e cycle de chimiothérapie, les fréquences alléliques des mutations *TP53* dans le cfDNA sont très faibles (< 0,5%) pour 15/16 patientes.

Ces données indiquent que les taux de ctDNA diminuent rapidement après le début de la chimiothérapie. Le travail de thèse comporte 14 échantillons de cfDNA prélevés chez des patientes en cours de chimiothérapie. L'analyse n'a permis de retrouver au maximum que 2/14 patientes avec une mutation *TP53* somatique dans le cfDNA. Ce faible taux de détection peut s'expliquer par de faibles taux de ctDNA chez les patientes à cause des traitements. En effet, la profondeur de lecture médiane des échantillons de cfDNA par NGS Oneseq est de 665X, ce qui limite la sensibilité de détection des mutations ponctuelles à faibles fréquences alléliques.

Ces faibles profondeurs de lecture sont inhérentes à la stratégie par banque de capture Oneseq. En effet, la banque Oneseq permet la capture de plus de 3 Mégabases du génome pour obtenir un profil d'aneuploïdies « pan-génome ». Cette grande taille de capture limite la profondeur pour une position donnée, et donc la sensibilité de détection de mutations ponctuelles à faibles fréquences alléliques. Les analyses NGS qui permettent une grande sensibilité de détection de mutations ponctuelles restreignent la capture sur quelques gènes pour augmenter la profondeur médiane, comme par exemple dans les publications de Christie et al, (>15000X) et Phallen et al (30000X).

Par ailleurs, la ddPCR est une approche pertinente pour rechercher de faibles fréquences alléliques, car la sensibilité dépend principalement de la quantité d'ADN apporté dans l'analyse. Cependant, cette technique n'est pas applicable en condition de dépistage puisqu'il faut connaître les mutations à rechercher a priori. La récurrence des anomalies somatique du gène *TP53* dans les HGSC n'est pas suffisante malgré quelques hotspots (figure 22).

Au final, l'utilisation du NGS Oneseq pour l'analyse des mutations somatiques *TP53* dans le cfDNA ne semble pas pertinente du fait de la faible sensibilité, nous discuterons d'améliorations possibles dans la partie « perspectives ». Les approches utilisant une profondeur de lecture importante doivent être préférées. C'est le cas par exemple du test « CANCERSEEK » proposé par l'équipe de Cohen et al en

2018. Ce test utilise un séquençage ciblé à très haute profondeur de *TP53* avec un résultat d'étude pilote montrant 100% de détection pour les patientes testées atteintes de HGSC en pré-chimiothérapie(71). Ces résultats doivent néanmoins être confirmés en conditions réelles de dépistage.

- **Concernant la recherche d'aneuploïdies dans le cfDNA :**

Les analyses des échantillons de cfDNA n'ont pas permis de détecter d'aneuploïdie, tant par la technique de SNP array (4 échantillons) que par la technique NGS Oneseq (16 échantillons testés, dont 15 provenant de patientes atteintes de HGSC). Aucun des trois logiciels n'a détecté d'aneuploïdie, y compris CNAclinic qui avait montré sa pertinence pour détecter les anomalies tumorales dans l'ADN FFPE. Comme discuté dans le paragraphe précédent, ce résultat peut s'expliquer par une fraction de ctDNA faible ou absente dans le plasma des patientes atteintes en cours de chimiothérapie.

Afin de discuter de la méthode d'analyse et de sa pertinence, une modélisation de la sensibilité de détection des aneuploïdies a été effectuée (voir résultats). Elle se base sur trois variables : le pourcentage de ctDNA, la ploïdie tumorale et les seuils de détection des aneuploïdies par les outils bioinformatiques (figure 22). L'analyse montre que les pertes les plus importantes (0 copie) ne permettent de détecter des aneuploïdies dans le cfDNA qu'à partir de 10% de ctDNA. De plus, seuls les gains de plus de 4 copies (tétraploïdie) permettent la détection de proportions de ctDNA inférieures à 10%. La dilution in silico de l'échantillon d'ADN FFPE 1.8 est cohérente avec ces résultats, puisqu'on ne détecte plus d'aneuploïdie à 1% d'ADN tumoral pour une ploïdie non ajustée égale à 14 copies.

En considérant les gains et pertes les plus importants détectés dans les ADN FFPE des 15 patientes atteintes de HGSC, le seuil médian de ctDNA requis pour détecter des aneuploïdies est de **6,1%** (tableau 7). Dans la plupart des cas ce sont les gains qui permettent d'améliorer la sensibilité de détection (14 sur 15).

La sensibilité de détection des aneuploïdies dans le cfDNA est-elle adéquate pour la mise en place d'un test de dépistage des HGSC chez les patientes à risque ?

Pour répondre à la question, nous discutons des éléments qui influent sur la sensibilité de détection des aneuploïdies dans le cfDNA : les proportions de ctDNA, la ploïdie tumorale et les seuils de détection d'aneuploïdies.

1. **Les proportions de ctDNA dans le plasma des patientes atteintes de HGSC en pré-traitement sont variables.** En effet les données bibliographiques montrent de grandes variations inter-patientes allant de <0,1% à >10% de ctDNA (65,66), et de 10 à 100000 allèles mutés / 5mL de plasma(68) (figure 25).

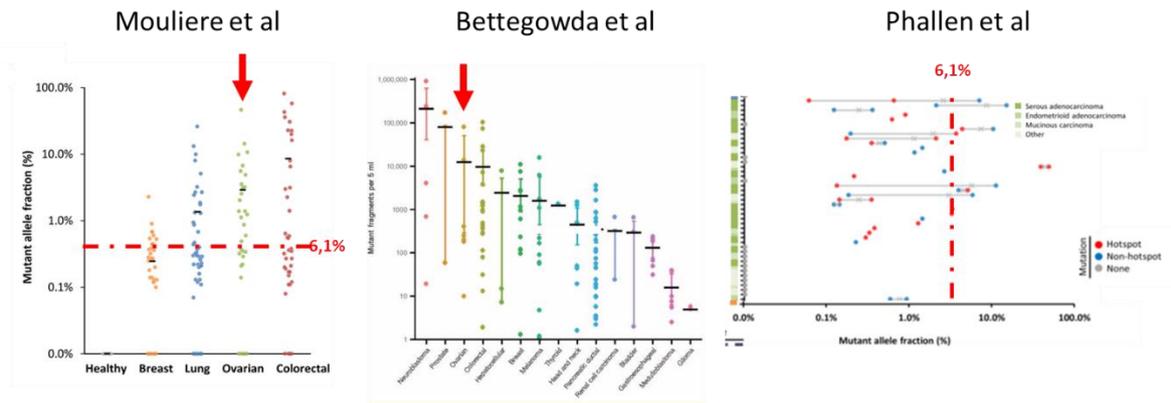


Figure 25 : Variabilité des proportions de ctDNA dans le plasma de patientes atteintes d'HGSC (avant traitement).

Adapté de trois études : Moulière et al (ddPCR), Bettegowda et al (ddPCR), Phallen et al (NGS ciblé à haute profondeur). Les données présentent la variabilité inter-échantillons des proportions de ctDNA soit par la fraction allélique (Moulière et al et Phallen et al) soit par la quantité de mutants par mL de plasma (Bettegowda et al). Chaque point représente les résultats d'une patiente. Les flèches rouges indiquent les données des tumeurs ovariennes (HGSC). Les tirets rouges représentent la limite de 6,1% de ctDNA pour les graphes des études de Moulière et Phallen.

2. **La ploïdie tumorale est variable selon les tumeurs de HGSC.** Les intensités de gains ou pertes de copies varient en fonction des tumeurs, comme l'attestent les données obtenues après l'analyse des ADN FFPE des 15 patientes. Selon les échantillons, les gains maximums vont de 2,81 à 30 copies et les pertes vont jusqu'à près de 0 copie (tableau 7). Ces valeurs font considérablement varier le seuil de ctDNA détectable par l'analyse des aneuploïdies d'un échantillon à l'autre (0,7 à 14,6%).

La littérature scientifique rapporte également une grande variabilité des anomalies génétiques retrouvées dans les tumeurs HGSC avec : **deux types de profils génomiques de HGSC** différenciés par la nature des gènes modifiés et par le pronostic(77), **sept signatures tumorales d'aneuploïdies** différenciées par une analyse en cluster sur 253 échantillons tumoraux(91). La variabilité des aneuploïdies est également visible sur les données du TCGA (figure 22 et annexe 2 où les aneuploïdies récurrentes concernent au maximum 30% des échantillons).

3. **Les seuils de détection d'aneuploïdies par l'outil CNAclinic sont validés par la mise au point.** En effet, ces seuils (<1,8 copies pour les pertes et >2,2 copies pour les gains) ont permis de détecter des aneuploïdies proches de la référence sur 13/15 échantillons d'ADN FFPE provenant de HGSC (vrais positifs), et de ne pas en détecter sur les 16 cfDNA témoins ainsi que sur l'ADN FFPE 1.3 (vrais négatifs).

Au final, les proportions de ctDNA et la ploïdie tumorale sont des éléments très variables sans le cas des HGSC, ce qui rend la détection d'aneuploïdies inconstante. La sensibilité d'un test de dépistage doit être la plus élevée possible afin d'éviter les « faux négatifs ». Pour éviter les faux négatifs dans la cohorte des 15 patientes, il faudrait que chaque échantillon comporte une proportion de ctDNA supérieure au seuil requis (tableau 7), la médiane étant de **6,1%**. Ces seuils semblent trop élevés pour éviter les faux négatifs si l'on compare la valeur de 6,1% avec les données de la littérature qui montrent que beaucoup de patientes ont des valeurs de ctDNA plus basses au diagnostic (Tableaux 8 et 9).

De plus, les données de la littérature scientifique s'accordent avec la faible sensibilité de la détection d'aneuploïdies dans le cfDNA de patientes atteintes d'HGSC. L'analyse d'aneuploïdies par shallow WGS (WGS à faible profondeur) a été testée dans le cfDNA de patientes HGSC en préopératoire :

- par Nakabayashi et collègues(92) qui retrouvent des aneuploïdies pour 6/36 patientes,
- par Vanderstichele et collègues(93) qui retrouvent des aneuploïdies pour 38/45 patientes.

Ces deux résultats diffèrent à cause des échantillonnages (21 stades précoces pour Nakabayashi contre 4 pour Vanderstichele). Néanmoins, ces données confirment que la sensibilité de détection des aneuploïdies par ces techniques est insuffisante en l'état dans un contexte de dépistage des patientes à risque de HGSC.

Nous discutons en dernière partie des améliorations possibles de l'analyse par NGS Oneseq dans le contexte de la détection d'aneuploïdies du cfDNA et de mutations ponctuelles à faible fréquence allélique.

5.3 Perspectives :

- **Analyse complémentaire par PCR digitale :**

La technique de PCR digitale pourrait être utilisée dans nos échantillons de cfDNA pour vérifier l'absence ou la présence à faible fraction de ctDNA. La détection de ctDNA à faible fréquence allélique permettrait d'objectiver la faible sensibilité de détection de la technique NGS Oneseq pour relever les aneuploïdies et les mutations ponctuelles. De plus, nous pourrions conclure quant à la nature artéfactuelle ou non des mutations *TP53* à très faibles fréquence alléliques retrouvées dans les échantillons 1.5, 1.6 et 1.18 (tableau 8).

La construction des sondes de ddPCR est possible pour 14/15 échantillons, puisque les mutations tumorales ont été retrouvées dans les analyses d'ADN FFPE.

Enfin, l'analyse pourrait aussi permettre de comparer les proportions de ctDNA dans les échantillons de cfDNA « bruts » en post-extraction, c'est-à-dire avant sélection de taille par la préparation de librairie, et les échantillons de cfDNA modifiés par la préparation de librairie (pour lesquelles les grands fragments ont été éliminés par purification). Cette comparaison pourrait permettre une confrontation avec les données de la littérature qui montrent un enrichissement en ctDNA lorsque l'on sélectionne les fragments courts.

- **Améliorations méthodologiques :**

1. **Échantillonnage :** L'échantillonnage des patientes atteintes de HGSC a abouti à prélever une majorité de patientes déjà traitées par chimiothérapie (voir annexe 1), ce qui a probablement diminué les quantités de ctDNA circulant. À contrario, les phases pilotes des tests de dépistage publiés dans l'indication des HGSC comportent des patientes en primo-diagnostic ou en rechute avant traitement(71). Ces dispositions leur ont probablement permis d'obtenir des résultats significatifs.

Les futures évaluations de tests de dépistage appliqués à la détection de HGSC doivent se faire en priorité sur des patientes prélevées avant la chimiothérapie.

En cas de difficulté d'échantillonnage, une solution alternative peut consister à effectuer des dilutions d'ADN FFPE tumoral in vitro pour évaluer la sensibilité technique. Dans cette étude, nous nous sommes limités à des dilutions de données de séquençage in silico pour un échantillon et une approche par le calcul. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés avec des échantillons réels.

2. Amélioration de la sensibilité de détection de ctDNA dans les échantillons de cfDNA :

- **Diminuer le nombre d'échantillons par run de séquençage** pour augmenter la profondeur par échantillon. L'inconvénient majeur est l'augmentation du coût de l'analyse.
- **Utiliser des barcodes moléculaires** (UMI en anglais pour Unic Molecular Index). Les barcodes moléculaires marquent chaque molécule d'ADN avant les étapes d'amplifications par PCR. Ils permettent de savoir si les lectures d'allèles porteurs d'une mutation ponctuelle proviennent d'une même molécule d'ADN de départ (probable artefact) ou d'au moins deux molécules d'ADN (signe de mutation « vraie »). L'utilisation d'UMI peut permettre d'obtenir une sensibilité de 1/25000 (83). Ceci aurait permis par exemple de conclure quant à la nature artéfactuelle ou non des 3 échantillons de cfDNA porteurs d'une mutation somatique.
- **Sélection de taille des fragments courts de cfDNA pour enrichir en ctDNA** : Les données de séquençage montrent que sans fragmentation la valeur médiane des tailles de fragments est de 147pb pour les échantillons de cfDNA. Cependant, les fragments tumoraux pourraient se trouver enrichis à des tailles inférieures à 100pb comme le suggèrent plusieurs études(66,69). Dans cette hypothèse, la sélection permettrait d'améliorer la sensibilité de détection de mutations ponctuelles et d'aneuploïdies. Cette sélection peut être effectuée par billes in vitro durant la préparation de librairie, ou in silico sur les données de NGS(66). Des données préliminaires testées sur 7 de nos échantillons de cfDNA provenant de patientes malades ne montrent pas d'aneuploïdie supplémentaire après sélection in silico des fragments inférieurs à 150pb (résultats non montrés).

- **Autres applications du NGS Oneseq possibles dans le cadre des HGSC :**

L'analyse des échantillons de cfDNA par NGS Oneseq ne semble pas assez sensible pour satisfaire les conditions au développement d'un test de dépistage chez les femmes à risque de HGSC. Néanmoins d'autres applications sont envisageables :

1. **Évaluation du pronostic des HGSC** : Le NGS Oneseq pourrait être testé en conditions pronostic chez les patientes atteintes de HGSC. Vanderstichele et collègues(93) ont déjà montré un lien entre la présence d'aneuploïdies et le pronostic dans le cfDNA de patientes atteintes de tumeur pelvienne. Cette évaluation avait utilisé un score d'aneuploïdie global appelé « genome wide Z score ». De plus, la nature des aneuploïdies est susceptible d'avoir un intérêt pronostic, comme l'on montré plusieurs études génomiques des HGSC(91,94)
2. **Analyses des HGSC à partir d'ADN provenant de lavages utérins** : La présence d'ADN tumoral provenant de HGSC été démontré dans le liquide de lavage utérin(83). La publication décrit la détection de mutations *TP53* mais ne recherche pas d'aneuploïdies. L'utilisation du NGS Oneseq dans un tel essai, en conditions de dépistage ou de suivi, pourrait être testée. L'apport de la recherche d'aneuploïdies pourrait être significatif dans la mesure où les seules mutations du gène *TP53* ne sont pas suffisantes pour confirmer la présence d'une tumeur car la sénescence naturelle conduit à la présence de formes *TP53* mutés dans les tissus sains(83).

- **Digression concernant les deux échantillons pour lesquels des mutations du gène TP53 ont été détectées à de faibles fréquences alléliques dans le cfDNA et dans l'ADN leucocytaire :**

Les patientes 1.14 et 1.17 présentent des mutations du gène *TP53* à faible fréquence allélique dans l'ADN leucocytaire et dans le cfDNA (tableau 8). La présence d'artefact est exclue car les nombres de lectures sont significatifs (>1%) et les fréquences alléliques sont similaires entre l'ADN leucocytaire et le cfDNA.

Trois hypothèses sont proposées pour expliquer ces mutations :

- **ctDNA présent dans les échantillons.** Cette hypothèse est peu probable car les échantillons de cfDNA ne montrent pas de signe de présence tumorale (absence de la mutation somatique retrouvée sur ADN FFPE et absence d'aneuploïdie).
- **Mosaïcisme constitutionnel**
- **Hématopoïèse clonale**

La première hypothèse exclue, ce sont les deux dernières qui doivent être discutées. Pour différencier les deux cas, une méthode consiste à analyser séparément l'ADN monocytaire et l'ADN lymphocytaire grâce à un tri cellulaire initial(95). Si la mutation est présente uniquement dans l'ADN lymphocytaire, la probabilité d'une hématopoïèse clonale est forte. Nous n'avons pas effectué cette technique, nous devons donc nous baser sur un faisceau d'arguments pour conclure :

- Les patientes 1.14 et 1.17 ne présentaient aucun signe clinique de syndrome de Li-Fraumeni (survenue de cancer précoce), ce qui aurait pu être le cas s'il s'agit de mosaïcisme constitutionnel.
- Il existe des exemples étayés d'hématopoïèse clonale provoquée par les chimiothérapies et notamment l'oxaliplatine (utilisé en première ligne de traitement dans les HGSC). Il s'agit du cas du gène *PPM1D*. Une publication(96) décrit des mutations délétère à faible fréquence allélique du gène *PPM1D* dans l'ADN leucocytaire chez des patientes atteintes de HGSC. De plus, des analyses in vitro(97) rapportent une pression de sélection très forte de l'oxaliplatine (utilisé en première ligne de traitement des HGSC) sur des lignées cellulaires favorisant les mutants *PPM1D* et *TP53*.
- On retrouve d'autres patientes atteintes de HGSC analysées à l'institut Bergonié par un panel NGS contenant de nombreux gènes dont *TP53*, et porteuses d'anomalies délétères à faibles fréquences alléliques sur ce gène (données non montrées).

Sous réserve de l'analyse de l'ADN monocytaire et lymphocytaire après tri cellulaire, les arguments énoncés ci-dessus sont en faveur d'une hématopoïèse clonale, probablement favorisée par l'âge (59 et 74 ans) et par les chimiothérapies.

6 Conclusion :

L'objectif principal était d'évaluer la faisabilité de la détection d'aneuploïdies dans les échantillons de cfDNA des patientes atteintes de HGSC comme test de dépistage précoce.

La première phase de mise au point montre que la technique NGS Oneseq est fiable pour détecter les aneuploïdies tumorales sur échantillons d'ADN FFPE. En effet, les anomalies retrouvées sont très proches de celles détectées par SNP array et sont compatibles avec les données du TCGA et de la littérature scientifique.

L'analyse des échantillons de cfDNA des patientes malades n'a pas permis de détecter d'aneuploïdie, probablement en raison d'une faible sensibilité de détection du NGS oneseq ainsi que des traitements de chimiothérapie déjà débutés. Cependant, l'évaluation de la sensibilité in silico et les données de la bibliographie ne sont pas en faveur de l'efficacité d'un tel test en conditions de dépistage même en l'absence de chimiothérapie préalable. La recherche d'aneuploïdie dans le cfDNA ou dans d'autres prélèvements par NGS Oneseq chez les patientes atteintes de HGSC peut néanmoins être envisagée dans d'autres conditions (pronostic, suivi thérapeutique).

7 ANNEXES

7.1 ANNEXE (1/2) : Informations sur les patientes atteintes de HGSC .

Patiente	âge au diagnostic (années)	Délai diagnostic - prélèvement du plasma pour extraction de cfDNA (jours)	Chimiothérapie avant le prélèvement sanguin	Localisation tumorale	IHC p53	Mutation TP53 tumorale	% cellules tumorales (lecture anapath)	% cellules tumorales (algorithme WT1 Tuscan)	IHC WT1	IHC PAX8	Mutation constitutionnelle prédisposante	[ADN plasmatique] (ng/mL)	[ADN plasmatique db] (ng/mL)	[ADN 100-500pb plasmatique] par TapeStation (ng/mL)
1.1	71,4	422	Oui	Ov, TF, P	accumulée	c.818G>A; p.(Arg273His)	90	100	+	NC		76,9	51,8	33,2
1.2	74,1		Oui	Ascite, TF	NC	NC	20	Non testé	NC	NC		48,0	10,1	0,1
1.3	62,7	67	Oui	Ov	normale	NC	80	100	+	+		34,1	14,3	2,3
1.4	65,4	60	Oui	Ov, P	accumulée	c.818G>A; p.Arg273His	10	NC	+	+		99,5	64,0	33,8
1.5	69,8	78	Oui	Ov, P	accumulée	c.770T>A; p.(Leu257Gln)	90	45	+	+		66,3	27,6	6,7
1.6	60,7	168	Oui	P	normale	c.797G>A p.(Gly266Glu)	NC	55	+	+		141,9	70,6	43,5
1.7	66,9		Oui	NC	NC	c.405C>G p.(Cys135Trp)	90	Non testé	NC	NC		26,2	2,2	0,2
1.8	62,7	116	Oui	Ov, TF	accumulée	c.824G>A; p.Cs275T	80	45	+	NC		44,7	4,0	0,3
1.9	80,4	281	Oui	eNComètre	absente	c.586C>T; p.(Arg196X)	80	NC	+	+		44,2	7,0	0,6
1.10	65,5		Oui	Ov, P	accumulée	c.721T>G; p.Ser241Ala	40	Non testé	+	+		99,8	23,8	0,0
1.11	72,1		Oui	NC	NC	c.332T>A; p.(Leu111Gln)	60	Non testé	NC	NC		87,9	8,2	0,4
1.12	75,3	371	Oui	Ov, P	normale	NC	75	NC	+	+	BRCA2 c.2612C>A; p.Ser871*	54,0	5,0	6,9
1.13	64,6	226	Oui	Ascite, P	accumulée	c.536A>G; p.(His179aG)	80	NC	+	+		58,4	4,9	1,2
1.14	59,7	204	Oui	Ov, P	accumulée	c.814G>A; p.(Val172Met)	70	85	+	NC		27,0	3,8	0,8
1.15	63,3	3150	Oui	Ov, P	NC	c.673-3T>G; p.?	80	NC	NC	NC	BRCA2 c.5351delA	51,4	10,6	14,9
1.16	66,9	49	Oui	Ov, P	accumulée	c.517G>A p.(Val173Met)	80	45	+	NC		44,7	11,0	1,8
1.17	74,3	42	Oui	Ov, P	accumulée	c.818G>T; p.(Arg273Leu)	80	70	+	NC		43,0	11,3	1,5
1.18	77,3	46	Non	P	NC	c.742C>T; p.Arg248Thr	30	NC	+	NC		63,9	14,7	4,5
1.19	70,1		Oui	Ov, P	NC	NC	NC	Non testé	+	NC		159,5	7,0	0,0
1.20	69,9	114	Oui	P	NC	c.102delC; p.(Phe1088fs)	80	NC	NC	+		176,8	54,7	17,8
1.21	73,6	547	Oui	Ov, P	NC	c.835G>A; p.(Glu285Lys)	90	45	NC	+		28,5	2,9	0,5

En grisé les patientes incluses dans l'analyse NGS Oneseq.

Abréviations : Ov = Ovaire, P = péritoine, TF = Trompes de Fallope, NC = non connu

7.2 ANNEXE (2/2) : Anomalies génétiques fréquentes des HGSC publiées par trois articles.

Échantillons de HGSC	Gène	Région chromosomique	Pourcentage d'échantillons avec l'anomalie		
			TCGA 2011 (74) N =316	Patch 2015(76) N = 114	Wang 2015(77) N = 59
Mutations ponctuelles délétères	<i>TP53</i>	17p13.1	91,51	98,75	93,22
	<i>BRCA1</i>	17q21.31	5,5	6,25	1,7
	<i>BRCA2</i>	13q13.1	4,59	3,75	3,39
	<i>NF1</i>	17q11.2	7,57	3,75	8,47
	<i>RB1</i>	13q14.2	4,59	2,5	1,7
	<i>CDK12</i>	17q12	4,82	-	-
Aneuploïdies	<i>CCNE1</i>	19q12	34.53%	28,80%	28,81%
	<i>MYC</i>	8q24.21	56.41%	-	35,59%
	<i>CCND1</i>	11q13.3	23.76%	-	13,56%
	<i>EMSY (=C11orf30)</i>	11q13.5	28.89%	-	13,56%
	<i>PAK1</i>	11q13.5-q14.1	30.43%	-	13,56%
	<i>MECOM</i>	3q26.2	57.09%	-	40,68%
	<i>Notch3</i>	19p13.12	30.43%	28,80%	15,25%
	<i>NF1</i>	17q11.2	14.36%	30%	-
	<i>RB1</i>	13q14.2	21.03%	-	6,78%
<i>PTEN</i>	10q23.31	19.32%	-	16,95%	

Les fréquences des anomalies en fonction des gènes sont présentées par type d'anomalie : mutation ponctuelle délétère ou aneuploïdies).

8 Bibliographie

1. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remontet L, Colonna M. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 / 2019 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 30]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2019/Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018>
2. Grossman DC, Curry SJ, Owens DK, Barry MJ, Davidson KW, Doubeni CA, et al. Screening for Ovarian Cancer. JAMA [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2019 Mar 12];319(6):588. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29450531>
3. Cowppli-Bony A, Uhry Z, Remontet L, Guizard A-V, Voirin N, Monnereau A, et al. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2013 - Partie 1 : tumeurs solides [Internet]. Institut de veille sanitaire; 2016 [cited 2019 Apr 24]. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2016/Survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-France-metropolitaine-1989-2013-Partie-1-tumeurs-solides>
4. Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019) - Ref : ETKAFR19 [Internet]. [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2018-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-edition-2019>
5. Kurman R, Carcangiu M, Herrington S, Young R. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 2014;
6. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. 2017 [cited 2019 Mar 12]; Available from: www.cancerbiomed.org
7. Soong TR, Howitt BE, Horowitz N, Nucci MR, Crum CP. The fallopian tube, "precursor escape" and narrowing the knowledge gap to the origins of high-grade serous carcinoma. Gynecol Oncol [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 May 7];152(2):426–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30503267>
8. Fathalla MF. INCESSANT OVULATION—A FACTOR IN OVARIAN NEOPLASIA ? Lancet [Internet]. 1971 Jul 17 [cited 2019 Apr 26];298(7716):163. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067367192335X>
9. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. Facts, views Vis ObGyn [Internet]. 2013 [cited 2019 Apr 26];5(4):292–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753957>
10. Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, et al. Oral Contraceptive Pills as Primary Prevention for Ovarian Cancer. Obstet Gynecol [Internet]. 2013 Jul [cited 2019 May 18];122(1):139–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743450>
11. Kim J, Park E, Kim O, Schilder J, Coffey D, Cho C-H, et al. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. Cancers (Basel) [Internet]. 2018 Nov 12 [cited 2019 May 7];10(11):433. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30424539>

12. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol* [Internet]. 1999 Mar 1 [cited 2019 Apr 26];72(3):437–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10053122>
13. Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med* [Internet]. 2005 May 10 [cited 2019 May 6];11(5):531–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1230>
14. Tanwar PS, Mohapatra G, Chiang S, Engler DA, Zhang L, Kaneko-Tarui T, et al. Loss of LKB1 and PTEN tumor suppressor genes in the ovarian surface epithelium induces papillary serous ovarian cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 6];35(3):546–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941742/pdf/bgt357.pdf>
15. Piek JMJ, Verheijen RHM, Kenemans P, Massuger LF, Bulten H, van Diest PJ. BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2003 Aug [cited 2019 Oct 19];90(2):491. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12893227>
16. Meserve EE, Brouwer J, Crum CP. Serous tubal intraepithelial neoplasia: the concept and its application. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 14];30:710–21. Available from: www.modernpathology.org
17. Piek JMJ, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* [Internet]. 2001 Nov [cited 2019 May 3];195(4):451–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1000>
18. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci M, Medeiros F, Saleemuddin A, et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2019 May 3];211(1):26–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17117391>
19. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2019 May 3];31(2):161–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255760>
20. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, Niknafs N, Adleff V, Noe M, et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun* [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 27];8(1):1093. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29061967>
21. Soong TR, Howitt BE, Miron A, Horowitz NS, Campbell F, Feltmate CM, et al. Evidence for lineage continuity between early serous proliferations (ESPs) in the Fallopian tube and disseminated high-grade serous carcinomas. *J Pathol* [Internet]. 2018 Nov [cited 2019 May 9];246(3):344–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30043522>
22. Perets R, Wyant GA, Muto KW, Bijron JG, Poole BB, Chin KT, et al. Transformation of the Fallopian Tube Secretory Epithelium Leads to High-Grade Serous Ovarian Cancer in Brca;Tp53;Pten Models. *Cancer Cell* [Internet]. 2013 Dec 9 [cited 2019 May 13];24(6):751–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610813004595?via%3Dihub>
23. Xian W, Miron A, Roh M, Semmel DR, Yassin Y, Garber J, et al. The Li-Fraumeni syndrome (LFS): a model for the initiation of p53 signatures in the distal Fallopian tube. *J Pathol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2019 May 18];220(1):17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834951>

24. Pharoah PD., Ponder BA. The genetics of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2019 May 29];16(4):449–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693402902968?via%3Dihub>
25. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2019 May 29];108(44):18032–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006311>
26. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* [Internet]. 1994 Oct 7 [cited 2019 May 31];266(5182):66–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545954>
27. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* [Internet]. 1995 Dec [cited 2019 May 31];378(6559):789–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524414>
28. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, et al. Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in *PALB2*. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Aug 7 [cited 2019 Jun 15];371(6):497–506. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1400382>
29. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, et al. Cancer Risks Associated With Germline Mutations in *MLH1* *MSH2* *MSH6* Genes in Lynch Syndrome. *JAMA* [Internet]. 2011 Jun 8 [cited 2019 May 25];305(22):2304. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2011.743>
30. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 2];10. Available from: <http://www.jcancer.org>
31. Noh JM, Choi DH, Baek H, Nam SJ, Lee JE, Kim JW, et al. Associations between BRCA Mutations in High-Risk Breast Cancer Patients and Familial Cancers Other than Breast or Ovary. *J Breast Cancer* [Internet]. 2012 Sep [cited 2019 Jun 2];15(3):283–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23091540>
32. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. In: *Current Protocols in Bioinformatics* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016 [cited 2019 Jun 2]. p. 1.30.1-1.30.33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpbi.5>
33. Gaudet P, Michel P-A, Zahn-Zabal M, Britan A, Cusin I, Domagalski M, et al. The neXtProt knowledgebase on human proteins: 2017 update. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2019 Jun 2];45(D1):D177–82. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1062>
34. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection HHS Public Access. [cited 2019 May 25]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4972490/pdf/nihms806050.pdf>
35. Cline MS, Liao RG, Parsons MT, Paten B, Alquaddoomi F, Antoniou A, et al. BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. Eng C, editor. *PLOS Genet* [Internet]. 2018 Dec 26 [cited 2019 Jun 2];14(12):e1007752. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1007752>

36. Laitman Y, Feng B-J, Zamir IM, Weitzel JN, Duncan P, Port D, et al. Haplotype analysis of the 185delAG BRCA1 mutation in ethnically diverse populations. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013 Feb [cited 2019 Jun 2];21(2):212–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763381>
37. Hamel N, Feng B-J, Foretova L, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Imyanitov E, et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2011 Mar [cited 2019 Jun 2];19(3):300–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119707>
38. Heramb C, Wangensteen T, Grindedal EM, Ariansen SL, Lothe S, Heimdal KR, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum - an update on mutation distribution in a large cancer genetics clinic in Norway. *Hered Cancer Clin Pract*. 2018 Jan 10;16(1).
39. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* [Internet]. 2001 May 17 [cited 2019 Jun 15];411(6835):366–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357144>
40. Seol J-H, Shim EY, Lee SE. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly.
41. Chen C-C, Feng W, Lim PX, Kass EM, Jasin M. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* [Internet]. 2018 Mar 4 [cited 2019 Jun 15];2(1):313–36. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050502>
42. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA* [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2019 Mar 4];317(23):2402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28632866>
43. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* [Internet]. 2010 May 18 [cited 2019 Jun 25];42(5):410–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400964>
44. Loveday C, Turnbull C, Ruark E, Xicola RMM, Ramsay E, Hughes D, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2012 May 26 [cited 2019 Jun 23];44(5):475–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2224>
45. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of Germline Mutations in the *RAD51B*, *RAD51C*, and *RAD51D* Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Sep 10 [cited 2019 Jun 25];33(26):2901–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26261251>
46. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2011 Sep 7 [cited 2019 Jun 25];43(9):879–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822267>
47. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* [Internet]. 2001 Apr 6 [cited 2019 Jul 25];105(1):149–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301010>
48. Rafnar T, Gudbjartsson DF, Sulem P, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Jonasdottir A, et al. Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2011 Nov 2 [cited 2019 Jul 25];43(11):1104–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.955>

49. Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J, Richters L, Groß E, Blümcke B, et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2018 Dec 24 [cited 2019 Jul 25];20(1):7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29368626>
50. Moretta J, Berthet P, Bonadona V, Caron O, Cohen-Haguenaer O, Colas C, et al. Recommandations françaises du Groupe Génétique et Cancer pour l'analyse en panel de gènes dans les prédispositions héréditaires au cancer du sein ou de l'ovaire. *Bull Cancer* [Internet]. 2018 Oct [cited 2019 Jul 1];105(10):907–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007455118302248>
51. Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, et al. Salpingo-oophorectomy and the Risk of Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancers in Women With a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* [Internet]. 2006 Jul 12 [cited 2019 Jul 6];296(2):185. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835424>
52. Inca. Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 / Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque - Ref : RECOBRCA17 [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 6]. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Femmes-porteuses-d-une-mutation-de-BRCA1-ou-BRCA2-Detection-precoce-du-cancer-du-sein-et-des-annexes-et-strategies-de-reduction-du-risque>
53. Prédisposition liée à une mutation constitutionnelle des gènes RAD51C et RAD51D [Internet]. [cited 2019 Jul 7]. Available from: [http://www.unicancer.fr/sites/default/files/RAD51C et RAD51D.pdf](http://www.unicancer.fr/sites/default/files/RAD51C%20et%20RAD51D.pdf)
54. Casey MJ, Synder C, Bewtra C, Narod SA, Watson P, Lynch HT. Intra-abdominal carcinomatosis after prophylactic oophorectomy in women of hereditary breast ovarian cancer syndrome kindreds associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2005 May [cited 2019 Jul 6];97(2):457–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863145>
55. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Gareth Evans D, Lynch HT, Isaacs C, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2010 Sep 1;304(9):967–75.
56. Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF. Screening for Ovarian Cancer. *JAMA* [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2019 Feb 28];319(6):595. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29450530>
57. MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* [Internet]. 1948 Feb [cited 2019 Jul 8];142(3–4):241–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18875018>
58. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* [Internet]. 1977 Mar 1 [cited 2018 Dec 24];37(3):646–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/837366>
59. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* [Internet]. 1983 Jun 1 [cited 2018 Dec 24];51(11):2116–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6188527>
60. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* [Internet]. 1989 [cited 2018 Dec

- 27];46(5):318–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2779946>
61. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 1994 Apr 1 [cited 2019 Jan 22];86(4):774–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x>
 62. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao S-L, et al. Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood; [Internet]. 1994 [cited 2019 Feb 27]. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/content/3/1/67.full-text.pdf>
 63. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017 Apr 24 [cited 2019 Jul 18];17(4):223–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233803>
 64. Moss J, Magenheim J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
 65. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* [Internet]. 2017 Aug 16 [cited 2019 Mar 3];9(403):eaan2415. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814544>
 66. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2018 Nov 7 [cited 2019 Mar 26];10(466):eaat4921. Available from: <http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aat4921>
 67. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2016 Sep 8 [cited 2019 Jan 21];35(3):347–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-016-9629-x>
 68. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* [Internet]. 2014 Feb 19 [cited 2019 Feb 28];6(224):224ra24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553385>
 69. Hellwig S, Nix DA, Gligorich KM, O’Shea JM, Thomas A, Fuertes CL, et al. Automated size selection for short cell-free DNA fragments enriches for circulating tumor DNA and improves error correction during next generation sequencing. Adalsteinsson V, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jul 25 [cited 2019 Mar 28];13(7):e0197333. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0197333>
 70. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* [Internet]. 1987 Jun [cited 2018 Dec 26];23(6):707–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3653190>
 71. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* [Internet]. 2018 Feb 23 [cited 2019 Feb 27];359(6378):926–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29348365>

72. Yokoi A, Yoshioka Y, Hirakawa A, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda S-I, et al. A combination of circulating miRNAs for the early detection of ovarian cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 27 [cited 2019 Feb 27];8(52):89811–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163790>
73. Widschwendter M, Zikan M, Wahl B, Lempiäinen H, Paprotka T, Evans I, et al. The potential of circulating tumor DNA methylation analysis for the early detection and management of ovarian cancer. *Genome Med* [Internet]. 2017 Dec 22 [cited 2019 Jul 19];9(1):116. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-017-0500-7>
74. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 29 [cited 2019 Feb 27];474(7353):609–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720365>
75. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. Vol. 450, *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2015. p. 243–53.
76. Patch A-M, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* [Internet]. 2015 May 28 [cited 2019 Feb 27];521(7553):489–94. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature14410>
77. Wang YK, Bashashati A, Anglesio MS, Cochrane DR, Grewal DS, Ha G, et al. Genomic consequences of aberrant DNA repair mechanisms stratify ovarian cancer histotypes. *Nat Genet* [Internet]. 2017 Apr 24 [cited 2019 Jan 26];49(6):856–65. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng.3849>
78. Plagnol V, Curtis J, Epstein M, Mok KY, Stebbings E, Grigoriadou S, et al. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics*. 2012 Nov;28(21):2747–54.
79. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May 8;17(5):405–24.
80. Jung H-S, Lefferts JA, Tsongalis GJ. Utilization of the oncoscan microarray assay in cancer diagnostics. *Appl Cancer Res* [Internet]. 2017 Dec 10 [cited 2020 Mar 28];37(1):1. Available from: <http://appliedcr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41241-016-0007-3>
81. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*. 2018 Apr 5;173(2):291-304.e6.
82. Østrup O, Ahlborn LB, Lassen U, Mau-Sørensen M, Nielsen FC. Detection of copy number alterations in cell-free tumor DNA from plasma. *BBA Clin*. 2017 Jun 1;7:120–6.
83. Salk JJ, Loubet-Seneor K, Maritschnegg E, Valentine CC, Williams LN, Higgins JE, et al. Ultra-Sensitive TP53 Sequencing for Cancer Detection Reveals Progressive Clonal Selection in Normal Tissue over a Century of Human Lifespan. *Cell Rep*. 2019 Jul 2;28(1):132-144.e3.
84. Fowler A, Mahamdallie S, Ruark E, Seal S, Ramsay E, Clarke M, et al. Accurate clinical detection of exon copy number variants in a targeted NGS panel using DECoN. *Wellcome Open Res* [Internet]. 2016 Nov 25 [cited 2020 Mar 26];1:20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459104>

85. Piskorz A, Lin KK, Morris JA, Mann E, Oza AM, Coleman RL, et al. Feasibility of monitoring response to the PARP inhibitor rucaparib with targeted deep sequencing of circulating tumor DNA (ctDNA) in women with high-grade serous carcinoma on the ARIEL2 trial. *J Clin Oncol*. 2016 May 20;34(15_suppl):5549–5549.
86. Christie EL, Fereday S, Doig K, Pattnaik S, Dawson S-J, Bowtell DDL. Reversion of BRCA1/2 Germline Mutations Detected in Circulating Tumor DNA From Patients With High-Grade Serous Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 Apr 20 [cited 2020 Mar 18];35(12):1274–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28414925>
87. Radke MR, Isaacson JD, Lin KK, Vo L-T, Harrell MI, Mann E, et al. BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discov*. 2018;9(2):210–9.
88. Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, Sebra R, Camacho SC, Garnar-Wortzel L, et al. Personalized circulating tumor DNA biomarkers dynamically predict treatment response and survival in gynecologic cancers. *PLoS One*. 2015 Dec 1;10(12).
89. Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, Biggs H, Hodgkin C, Addley H, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. 2016 [cited 2019 Apr 23]; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/>
90. Kim YM, Lee SW, Lee YJ, Lee HY, Lee JE, Choi EK. Prospective study of the efficacy and utility of TP53 mutations in circulating tumor DNA as a non-invasive biomarker of treatment response monitoring in patients with high-grade serous ovarian carcinoma. *J Gynecol Oncol*. 2019 May 1;30(3).
91. Macintyre G, Goranova TE, De Silva D, Ennis D, Piskorz AM, Eldridge M, et al. Copy number signatures and mutational processes in ovarian carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. 2018 Sep 13 [cited 2019 Feb 27];50(9):1262–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41588-018-0179-8>
92. Nakabayashi M, Kawashima A, Yasuhara R, Hayakawa Y, Miyamoto S, Iizuka C, et al. Massively parallel sequencing of cell-free DNA in plasma for detecting gynaecological tumour-associated copy number alteration Correction: Publisher Correction. 2018 [cited 2019 Aug 8];8:11205. Available from: www.nature.com/scientificreports
93. Vanderstichele A, Busschaert P, Smeets D, Landolfo C, Van Nieuwenhuysen E, Leunen K, et al. Chromosomal Instability in Cell-Free DNA as a Highly Specific Biomarker for Detection of Ovarian Cancer in Women with Adnexal Masses. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Aug 8];23(9):2223–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27852697>
94. Creighton CJ, Hernandez-Herrera A, Jacobsen A, Levine DA, Mankoo P, Schultz N, et al. Integrated Analyses of microRNAs Demonstrate Their Widespread Influence on Gene Expression in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. Culhane AC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 29 [cited 2019 Feb 27];7(3):e34546. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034546>
95. Alice Fiévet (Villejuif). Mutations TP53 de faible fréquence allélique : peut-on s'affranchir de la biopsie pour différencier une mosaïque d'une hématopoïèse clonale ? In: Assise de génétique 2020. Assises de génétique 2020 à Tours; 2020.

96. Kim B, Lee S-T, Choi JR. Somatic mosaic truncating mutations of PPM1D in blood can result from expansion of a mutant clone under selective pressure of chemotherapy. 2019 [cited 2020 Apr 25]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217521>
97. Hsu JI, Dayaram T, Tovy A, De Braekeleer E, Jeong M, Wang F, et al. PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Cell Stem Cell*. 2018 Nov 1;23(5):700-713.e6.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

TITLE: Development of a screening test for high-grade serous tumours in at-risk women. Simultaneous analysis of aneuploidy (CNV) and TP53 mutations on tumor FFPE DNA and cell free DNA through Oneseq NGS capture

ABSTRACT: High grade serous carcinomas (HGSC) are poor prognostic cancers that are more likely to occur in women at risk, carrying a deleterious mutation in a predisposition gene. Periodic follow-up of these at-risk women with an adapted screening test could allow early diagnosis to improve the prognosis. The genetics of HGSC is characterized by the association of a mutation on the TP53 gene in 95% of cases, and numerous aneuploidies (amplifications, gains or losses of DNA). Our work consisted in using the Oneseq NGS process to evaluate the feasibility of a screening test detecting these abnormalities in the cell-free DNA (cfDNA) of women at risk of HGSC. The sample consisted of 15 patients with HGSC for whom we have tumor FFPE DNA and a sample of cfDNA. The Oneseq NGS process was first developed on FFPE DNA in comparison with an SNP array technique, and found 14/15 patients (93%) with a TP53 mutation and 13/15 (87%) with tumor aneuploidies. The tumor origin of the aneuploidies was confirmed by comparison with the TCGA datas (The Cancer Genome Atlas). These results show that the Oneseq NGS is relevant for HGSC FFPE DNA analysis, with simultaneous detection of aneuploidies and point mutations. In the second part, the analysis by Oneseq NGS of cfDNA samples from sick patients did not detect genetic abnormalities of tumor origin. An evaluation of the sensitivity of detection of aneuploidies and TP53 mutations in cfDNA suggests that Oneseq NGS is not suitable for the early detection of HGSC in at-risk women.

KEYWORDS: High grade Serous Carcinoma, cancer screening, aneuploidies, cell-free DNA, NGS Oneseq, TP53, oncogenetic

TITRE : Mise au point d'un test de dépistage des tumeurs séreuses de haut grade chez des femmes à risques. Analyse simultanée des aneuploïdies (CNV) et du statut *TP53* sur ADN FFPE tumoral et ADN plasmatisque circulant par capture NGS Oneseq

RÉSUMÉ : Les carcinomes séreux de haut grade (HGSC) sont des cancers de mauvais pronostic plutôt retrouvés chez les femmes à risques, porteuses d'une mutation délétère sur un gène de prédisposition. Le suivi périodique de ces femmes à risque par un test de dépistage adapté pourrait permettre d'effectuer un diagnostic précoce pour améliorer le pronostic. La génétique des HGSC est caractérisée par l'association d'une mutation sur le gène *TP53* dans 95% des cas, et de nombreuses aneuploïdies (amplifications, gains ou pertes d'ADN). Notre travail a consisté à utiliser la technique de NGS Oneseq pour évaluer la faisabilité d'un test de dépistage détectant ces anomalies dans l'ADN plasmatisque circulant (cfDNA) des femmes à risque de HGSC. L'échantillonnage comporte 15 patientes atteintes de HGSC pour lesquelles nous disposons de l'ADN FFPE tumoral et d'un échantillon de cfDNA. La technique NGS Oneseq a tout d'abord été mise au point sur ADN FFPE par comparaison avec une technique de SNP array, et a retrouvé 14/15 patientes (93%) avec une mutation *TP53* et 13/15 (87%) avec des aneuploïdies tumorales. L'origine tumorale des aneuploïdies a été confirmée par comparaison avec les données du TCGA (The Cancer Genome Atlas). Ces résultats montrent que le NGS Oneseq est pertinent pour l'analyse d'ADN FFPE tumoral des HGSC, avec une détection simultanée d'aneuploïdies et de mutations ponctuelles. En deuxième partie, l'analyse par NGS Oneseq des échantillons de cfDNA des patientes malades n'a pas permis de détecter d'anomalies génétique d'origine tumorale. Une évaluation de la sensibilité de détection des aneuploïdies et des mutations du gène *TP53* dans le cfDNA suggère que le NGS Oneseq n'est pas adapté au dépistage précoce des HGSC chez les femmes à risque.

MOTS CLÉS : carcinome séreux de haut grade, cancer de l'ovaire dépistage, aneuploïdies, ADN plasmatisque circulant, NGS Oneseq, *TP53*, oncogénétique

TITRE ET RÉSUMÉ EN ANGLAIS : voir page précédente.

DISCIPLINE : Biologie médicale spécialité génétique moléculaire

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de génétique moléculaire
Unité d'Oncogénétique
Institut bergonié
229 cours de l'Argonne
CS 61283
33076 Bordeaux cedex