HAL
open science

Marqueurs moléculaires de l'envahissement ganglionnaire dans les carcinomes endométrioïdes de l'endomètre

Mathilde Mairé

To cite this version:

Mathilde Mairé. Marqueurs moléculaires de l'envahissement ganglionnaire dans les carcinomes endométrioïdes de l'endomètre. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03388743

HAL Id: dumas-03388743

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03388743v1

Submitted on 20 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2021 Thèse n° 3097

Thèse pour l'obtention du DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE DES GYNÉCOLOGIE OBSTÉTRIQUE

Présentée et soutenue publiquement le 28 Septembre 2021

Par **MAIRÉ Mathilde**, né le 12 Août 1992 à Vitry-sur-Seine (94)

MARQUEURS MOLÉCULAIRES DE L'ENVAHISSEMENT GANGLIONNAIRE DANS LES CARCINOMES ENDOMETRIOÏDES DE L'ENDOMÈTRE

Directrice de thèse

Madame le Docteur Sabrina CROCE

Rapporteur de thèse

Monsieur le Professeur Fabrice LECURU

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Jean Luc BRUN	Président
Monsieur le Professeur Denis QUERLEU	Juge
Madame le Professeur Isabelle RAY-COUQUARD	Juge
Monsieur le Professeur Jean Philippe MERLIO	Juge
Monsieur le Docteur Frédéric GUYON	Juge
Madame le Docteur Sabrina CROCE	Juge

Remerciements

À notre Maitre et Président du Jury,

Monsieur le Professeur Jean-Luc BRUN

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Service de Chirurgie Gynécologique et Médecine de la Reproduction

Coordonnateur du DES de Gynécologie Obstétrique de Bordeaux

Centre Aliénor d'Aquitaine, CHU de Bordeaux

Vous me faites l'honneur de présider ce jury.

Merci pour votre enseignement et votre disponibilité tout au long de mon internat.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À notre Maitre et Juge,

Monsieur le Professeur Denis QUERLEU

Professeur des Universités

Visiting professor, Agostino Gemelli University Hospital, Rome, Italy

Professeur conventionné de l'Université de Strasbourg, France

Ancien President, European Society of Gynaecological Oncology

Merci pour votre aide précieuse tout au long de ce travail qui n'aurait pas vu le jour sans vous.

J'espère que nous pourrons le poursuivre ensemble par la suite.

Je vous remercie également pour votre enseignement en chirurgie oncologique lors de mon passage dans le service, vos connaissances et votre pédagogie sont un exemple pour moi.

Soyez assuré de ma reconnaissance et mon profond respect

À notre Maitre et Juge,

Madame le Professeur Isabelle RAY-COQUARD
Professeure des Universités, Praticien Hospitalier
Service d'Oncologie Médicale
Centre Léon Bérard, Lyon

Vous me faites l'honneur de de juger ce travail et je vous en remercie.
Votre expertise dans le domaine de l'oncologie gynécologique apporte une critique nécessaire à l'évaluation de la qualité de ce travail.
Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À notre Maitre et Juge,

Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO
Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Chef de service de Biologie des Tumeurs et Tumorothèque
Hôpital Pellegrin, CHU Bordeaux

Vous me faite l'honneur de participer au jury de cette thèse.
Votre expérience et vos connaissances dans le domaine précis de la biologie des cancers sont indispensables à l'évaluation de ce travail.
Soyez assuré de mon plus profond respect.

À notre juge

Monsieur le Docteur Frédérique GUYON
Praticien Spécialiste des Centres de Lutte Contre le Cancer
Service de Chirurgie Oncologique et Sénologique
Institut Bergonié, Bordeaux

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Merci pour votre enseignement lors de mon stage de chirurgie oncologique, qui a nourri ma volonté de poursuivre dans cette voie. Merci de me donner la chance d'intégrer le service, j'ai hâte de poursuivre mon apprentissage à vos côtés.
Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À notre Maitre et rapporteur,

Monsieur le Professeur Fabrice LECURU
Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Service de Gynécologie, Sénologie et Plastie Reconstruction
Institut Curie, Paris

Vous me faites l'honneur d'être le rapporteur de ce travail.
Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À notre Directrice de Thèse

Madame le Docteur Sabrina CROCE
Praticien Spécialiste des Centre de Lutte Contre le Cancer
Service d'Anatomopathologie
Institut Bergonié, Bordeaux

Merci pour ton encadrement lors de cet éprouvant travail, je suis contente que nous ayons pu le mener à bien ensemble.
Merci de m'avoir aidé à développer toutes ces connaissances dans un domaine qui n'était initialement pas le mien et de n'avoir pas compté ton temps pour m'aider et m'enseigner.

J'espère que nous pourrons poursuivre ce travail jusqu'au bout ensemble.
Soit assuré de mon admiration et de mon profond respect.

À ma famille :

À *mes parents*, pour leur soutien sans faille même quand mes études interminables m'ont rendue difficile à vivre et difficile à suivre. Aucun doute que je n'en serais pas là sans votre aide, je suis fière d'être votre fille.

À ma sœur *Noémie*, merci d'avoir toujours été là, de me faire rire, de m'écouter pendant des heures. Je suis contente que tu aies trouvé ta voie quoiqu'un peu déçue de ne jamais voir une césarienne de vache. Et merci à *Vincent* de la rendre heureuse tous les jours (sauf quand il faut faire des travaux).

Je suis sûre que notre future aventure Bretonne en famille sera un franc succès.

À *mes grands-parents* et à *ma tante* chez qui je sais que je pourrais toujours trouver du soutien et un macaron.

À mes amis du lycée et à tous les +1 (qui n'en sont plus vraiment maintenant) :

À *l'équipe OPGKLMC* qui ne cesse de s'agrandir, vous êtes toujours là pour moi, même éparpillés aux quatre coins de la France. Vivement les prochaines vacances bretonnes.

À mes copines :

À *Marine*, qui aurait cru au moment de cette coloc qu'elle serait le point de départ d'une si belle amitié. Notre cohabitation pendant ce qui représente pour moi nos pires et nos meilleures années compte beaucoup pour moi. Je serai toujours là pour répondre aux 1000 textos/min que tu m'envoies parfois.

À *Astrid*, mon point de repère à Bordeaux, ma compagne de course très matinale, de rappel pour savoir comment faire une open, de tentative d'apprentissage du surf et tant d'autres. L'année prochaine sera bien vide sans toi.

À *Doriane*, je suis bien contente que nos noms soient si proches, car ils m'ont permis de passer tant de temps avec toi. À tous ces stages, à toutes nos confidences, à toutes nos aventures hospitalières et extra hospitalières. Et à *Anne so* sans qui le trio ne serait pas au complet.

À *Jihane*, comment ne pas évoquer les soirées d'anniversaires mémorables ou les vacances dans les calanques en repensant à la fac, je suis bien contente qu'on ait pu conserver cette amitié. Je sais que les semaines de vacances entre filles se répéterons encore longtemps avec toujours autant de plaisir.

À *Laurine*, à nos années médecine, aux soirées, aux voyages inoubliables, merci d'avoir été à mes côtés toutes ces années, je n'en serais surement pas là sans toi. Et à votre famille avec *Antoine* et *Louise,* vous êtes magnifiques.

À mes amis Parisiens :

À *Jerem, Lampiche, Gaby, Nico, Pauline, François, Daphné, Bruno, Clément*...

A tous les voyages, toutes les soirées, tous les moments à la BU ou sur les quais, tous les rosés en terrasses, tous les déguisements qui ont fait de nous ce que l'on est. Je suis toujours heureuse de vous retrouver.

À mes amis Bordelais :

À *Juliette et Marine*, merci d'être toujours là pour m'emmener surfer, courir, faire de l'escalade, du wake (même si parfois je me blesse). Je ne sais pas comment vous faites pour ne jamais vous arrêter mais j'adore prendre le train en marche.

À *Annabelle, Claire, Christine*, de Mont de Marsan à Bordeaux merci d'être toujours là pour un verre ou un restau, pour vider son sac ou parler d'autre chose. Et à *Maxime, Max et Clément*, merci de les rendre heureuses.

À *Maëlle et Paulin*, grâce à vous je pense que je ne me suis sentie +1 de Joris qu'à peu près 2 minutes après notre rencontre. Merci pour tous ces weekends sur l'île de Ré, vacances, soirées, fêtes de Bayonne. Vous êtes devenus incontournables pour moi et je suis sûre que nos visites à Pontonx et nos projets de vacances ne vont pas s'arrêter là.

À tous les membres d'origine ou d'adoption du Clos*, Popo, Julien et Clara, Mathieu et Sarra, Pierre et Alex, Marie,* merci de m'avoir accepté dans votre team même si je n'étais que +1 à la base. Les diners de fin/début de semaine au Furtado doivent maintenant devenir une tradition.

À *PL*, de meilleur coloc à Bayonne à véritable ami à Bordeaux (enfin j'espère !) je suis très contente de te connaître, et à *Vic'* que tu as de la chance d'avoir trouvé.

À Lucille, de nos cours de yoga aux randonnées à la Réunions je suis contente de cette amitié que nous avons pu développer. J'espère que tes aventures à venir te rendrons heureuse. Tu es faite pour vivre au soleil de toutes les façons le bronzage te va trop bien.

Aux heureux membres du Foyer, à *Nico*, merci pour ta cuisine toujours délicieuse, à *Alex*, pour nos soirées Dragons et pâtes, à *Audrey, Astrid et Paul*, on aura quand même organisé de sacrées soirées dans cette maison.

A *Godefroy, Louise, Benoît, Solweig, Arthur, Camille* (et j'en oublie c'est sûr), les diners, brunchs verres en tout genre ne sont pas près de s'arrêter.

À la team gynéco : pour nos premiers pas à la mat' ensemble qui auront été pleins de rebondissements.

À Laura, merci d'avoir été mon compagnon de travail dès nos premiers pas d'internes, mais aussi de voyage, de restau, de soirée jeux... et merci de continuer à répondre à mes appels à l'aide en obstétrique. Je n'y serais pas arrivée seule. Et merci *à Charles* d'occuper Joris en parlant de sport pour nous laisser discuter tranquillement de gynéco.

À Audrey, meilleure coloc, meilleure déesse en legging, organisatrice hors pair de soirées, je suis contente d'avoir pu partager tous ces moments avec toi.
À Alizée, merci pour ta bonne humeur sans faille, ton soutien pendant cette (petite) année de M2 et d'avoir patiemment répondu à toutes mes questions. Ta petite famille est magnifique (et oui un jour on arrivera à organiser ce diner).
À Marie (alias Haudic'hair), on se souviendra ce cette coupe de cheveux dans la chambre de garde, des verres en terrasse, des cafés au relais, même si tu nous quittes pour plus de soleil tu continueras à nous couvrir de paillettes à distance.
À Olivier, qui dès le départ avait vu juste pour la liste. Si nous n'avions pas voulu faire exactement la même chose, je suis sure qu'on aurait adoré travailler ensemble.
À Fug, même si ça n'est pas en stage qu'on s'est le plus vu, je retiendrai les verres, diners et brunchs qui, je l'espère, se reproduiront maintenant que tu es du côté des chefs.
À Laura H, le premier stage ensemble aura été tardif et pourtant vraiment top, j'ai adoré travailler avec toi et j'espère que tu pourras continuer à faire ce que tu aimes dans un service qui te mérite.

À *Nono*, merci de m'avoir appris avec Benjamin à faire marcher un échographe lors de notre première semaine à Pau. Ça m'a pas mal servi par la suite. Et merci d'avoir toujours été là pour partager un café ou une longue discussion au coin d'un couloir.
À Sophie, merci pour ton soutien au fil de mes années d'internat, pour tous tes conseils en obstétrique, même à distance. J'espère que ta vie dans le Sud-Est te plait et que je pourrai bientôt tester ta piscine.
À Ebru, Tiffany, Louise et Tiff pour ce stage de chirurgie riche en fou rire, boulettes en tout genre, et staff à n'en plus finir.
À *Pauline, Sophie, Julie et Audrey* pour ce DU de colpo à la plage.
Aux plus vieux que j'ai connu interne, qui m'ont transmis énormément au fil des stages et en dehors, merci pour tout, *à Mel, Tiff, Alizée, Amaury, Marie G, LMD, Aurélien, Hugo.*
Au plus jeunes avec qui j'ai pu avoir la chance de partager un stage *Camille, Inès, Élisa, Laurie, Aurélie, Ambre.*

À mes chefs des différents stages qui m'ont tout appris,
À Fred C, merci de m'avoir fait confiance lors de mon premier passage à la maternité, de ne pas avoir laissé les sièges à la relève pour que je puisse apprendre, aucun doute que c'est grâce à tout ça que j'ai failli choisir l'obstétrique.
À Marie S, Fred, MC, Cécile, Clem, Angie, Elsa, Claire, Matthieu Marie H qui m'ont appris à spatuler, et à recoudre des périnées à 4h du matin sans jamais me plaindre.

Au Professeur Sentilhes, merci pour votre encadrement lors de mes passages à la maternité et pour votre aide même quand cela ne concernait pas forcément l'obstétrique. Soyez assuré de mon profond respect.
À Hélène, Christine, Marion, Sophie, Audrey, Thomas et Grégoire, vous m'avez donné le goût de la chirurgie oncologique et de la sénologie. Je suis tellement contente de vous rejoindre en novembre et d'apprendre encore plus à vos côtés.
Et merci tout particulièrement à *Anieska et Pascaline*, (sans) qui m'ont entourée à Bergonié, mais surtout qui m'ont aidée à trouver ce super projet. Je n'en serais pas là sans vous.
À *Marie R et Manon* qui m'ont fait confiance lors de l'un de mes derniers stages de chirurgie.
À *Kevin et Corentin* et tous les chefs d'oncologie de Bergonié qui m'ont permis d'apprendre beaucoup lors de mon passage du côté de la médecine.

À l'équipe de Rennes,
Aux *Professeur Levêque et Professeur Lavoué* et à toute leur équipe, merci de m'avoir accueilli dans votre centre, de m'avoir permis d'apprendre beaucoup et surtout merci de m'avoir fait confiance. Je garde un souvenir ému de mon passage dans votre service.
À mes co-internes *Anne, Alisée, Isis, Myriam et Anne Lise* qui m'ont permis de devenir un peu Bretonne pendant ces quelques mois.

Et à toutes les équipes des différents stages ou je suis passée.
Aux sages-femmes de Pau et de Mont de Marsan qui m'ont tout appris de la physio. Aux infirmières du bloc et du service de Bayonne qui m'ont chouchouté alors que je n'étais pas vraiment dans mon élément en viscéral. Aux sages-femmes, aux AP et aux infirmières de la maternité pour toutes les gardes, journées en salle ou aux urgences, en HDJ passées ensemble et pour tout ce qu'elles m'ont transmis. Aux infirmiers et infirmière du bloc, de chirurgie et d'HDJ de l'Institut Bergonié qui en plus d'être très compétents sont accueillants et ont rendu les journées bien agréables. Merci.

À Joris, sans qui je n'en serais pas là. Merci de ton soutient au quotidien dans tous mes projets un peu fous. J'ai hâte de commencer notre vie sans réveil à 7h pour travailler, sans double écran et sans résumé en anglais à écrire, je suis sûre que tu sauras la rendre parfaite quand même. Je t'aime.

Table des matières

Liste des abréviations 4

Partie 1. Introduction

1 HISTOLOGIE DES CANCERS DE L'ENDOMETRE 13

1.1 HISTOPATHOLOGIE 14
1.2 GRADE TUMORAL.....14
1.3 CARACTERISTIQUES IMMUNOHISTOCHIMIQUES, MOLECULAIRES ET DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL.....15
1.4 EMBOLES VASCULAIRES 16

2 CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES CANCERS DE L'ENDOMETRE.....17

2.1 DESCRIPTION DE LA CLASSIFICATION MOLECULAIRE.....17
2.2 ALGORITHME DIAGNOSTIC INTEGRANT LES CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES 18
2.3 INTEGRATION EN PRATIQUE CLINIQUE.....22
2.4 MARQUEURS MOLECULAIRES HORS TCGA.....23

3 PRISE EN CHARGE DES CANCERS DE L'ENDOMETRE (30,35,36) 23

3.1 BILAN PRE OPERATOIRE 23
3.2 TRAITEMENT CHIRURGICAL 24
3.3 TRAITEMENTS ADJUVANTS 24
3.3.1 Carcinomes endométriaux stade I-II 25
3.3.2 Traitement des carcinomes endométrioïdes de stade III-IV.....26

4 LYMPHADENECTOMIE PELVIENNE ET LOMBOAORTIQUE : TECHNIQUE CHIRURGICALE, INDICATIONS ET COMPLICATIONS.....26

4.1 INDICATIONS 26
4.2 TECHNIQUES CHIRURGICALES 27
4.2.1 Curage pelvien.....27
4.2.2 Curage lomboaortique.....27
4.2.3 Ganglion sentinelle.....28
4.3 COMPLICATIONS DES LYMPHADENECTOMIES.....28

5 SIGNATURE MOLECULAIRE PREDICTIVE DE L'ENVAHISSEMENT GANGLIONNAIRE.....29

5.1 ÉTAT DES CONNAISSANCES 30
5.1.1 Classification TCGA et envahissement ganglionnaire 30
5.1.2 Recherche de signature moléculaire.....30
5.2 OBJECTIF FINAL DE L'ETUDE.....31
5.3 PRINCIPE DU RNA-SEQUENCING 31

6 REFERENCES.....33

Partie 2. Article

ABSTRACT 39
INTRODUCTION 40
METHODS 41
RESULTS 45
DISCUSSION 50
CONCLUSION 52
REFERENCES 53

Partie 3. Perspectives

Table des illustrations

Partie 1. Introduction

Figure 1. Coupes histologiques de carcinomes endométrioïdes de différents grades histopronostiques **15**

Figure 2. Coupes histologiques d'un carcinome endométrioïde de l'endomètre, de haut grade avec MELF pattern, réaction stromale et emboles vasculaires focaux **16**

Figure 3. Coupes histologiques d'un carcinome endométrioïde de l'endomètre, de haut grade avec MELF pattern et emboles vasculaires diffus **17**

Figure 4. Stratification des tumeurs endométriales selon 4 groupes moléculaires.....**18**

Figure 5. Algorithme diagnostique issue de la classification histo-moléculaire des carcinomes de l'endomètre... **19**

Figure 6. Coupe histologique et Immunohistochimie d'un CEE de haut grade du groupe "hypermuté" : MMR déficient avec perte de MLH1/PMS2 et p53 *wild type*..... **20**

Figure 7. Coupe histologique et Immunohistochimie d'un CEE de haut grade du groupe "serous-like" : avec une expression anormale de p53 et une mutation pathogénique de *TP53* associée **20**

Figure 8. Étapes de la classification moléculaire ProMisE **21**

Figure 9. Anatomie lymphatique pelvienne **27**

Figure 10. Étapes de préparation de la librairie **32**

Tableau 1. Classification moléculaire des carcinomes endométrioïdes de l'endomètre..... **19**

Tableau 2 : Définition des groupes pronostiques des carcinomes de l'endomètre **22**

Partie 2. Article

Figure 1. Flow chart, Institut Bergonie, France, 2010-2017 ..... **45**

Figure 2 Result of unsupervised analysis **48**

Figure 3. Summary pathway analysis differentially expressed between the clusters **49**

Table 1. Clinical characteristics of EEC without lymph node involvement (N=12) and with lymph node involvement (N=16), Institute Bergonie, 2010-2017..... **46**

Table 2. Histological characteristics and molecular patterns of EEC without lymph node involvement (N=12) and with lymph node involvement (N=16), Institut Bergonie, 2010-2017..... **47**

Supplementary data 1. Detailed histological and molecular characteristics of patients **57**

Supplementary data 2. Comparison of histopathological characteristics and molecular patterns of cluster A, B and C **59**

Supplementary data 3. Differential gene expression of cluster A and C **59**

Supplementary data 4. Differential gene expression of cluster A and B **60**

Supplementary data 5. Differential gene expression of cluster B and C **60**

Supplementary data 6. Differential gene expression of cluster A and B+C **61**

Supplementary data 7. Differential gene expression of cluster A and C' **61**

Liste des abréviations

IMC : Indice de Masse Corporelle

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique

MSI : Instabilité microsatellitaire

MSS : Stabilité microsatellitaire

TEP-TDM : Scanner par Tomographie à Émission de Positrons

EEC: Endometrioid Endometrial Carcinoma

N+: Presence of lymph node metastasis

N-: Absence of lymph node metastasis

HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer

MMR: MisMatch Repair

TCGA: The Cancer Genomic Atlas

ESGO: European Society of Medical Oncology

ESTRO: European Society of Radiotherapy and Oncology

BMI: Body Mass Index

EMT: Epithelial Mesenchymal transition

ECM: Extra Cellular Matrix

SCM: Smooth Muscle Contraction

Introduction

En Europe, le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus fréquent et le 4ème en termes d'incidence chez la femme (avec 121 578 nouveaux cas en 2018, représentant 6,6% des cancers féminins) après le cancer du sein, du côlon et du poumon (1). L'incidence annuelle en France, ajustée sur l'âge en 2018, était de 11,0 pour 100 000 femmes (2), ce taux étant relativement stable depuis 2010. Plus de 90% des cas de cancer de l'endomètre surviennent après 50 ans, avec un âge moyen de survenue de 63 ans ; 4% des femmes ayant un cancer de l'endomètre sont âgées de moins de 40 ans (3).

Il s'agit d'un cancer de bon pronostic avec une survie globale à 5 ans estimée à 80% (4), principalement en cas de découverte à un stade précoce. À l'échelle mondiale, le cancer de l'endomètre représentait 2,1% de l'ensemble des cancers, et moins de 1 décès pour 100 000 personne-années en 2018 (5).

Le facteur de risque principal est l'exposition endogène ou exogène aux œstrogènes quelle qu'en soit la cause. Ainsi, l'obésité, le diabète, l'âge précoce des premières règles, la nulliparité, la ménopause tardive et la prise de Tamoxifène ou de traitements hormonaux substitutifs de la ménopause oestrogéniques seuls, constituent les principaux facteurs de risque de la pathologie (6). Il peut également s'intégrer dans le syndrome de Lynch, maladie autosomique dominante, liée à une mutation d'un des gènes MMR (Mismatch Repair) impliqués dans la réparation de l'ADN. Chez les patientes atteintes du syndrome de Lynch, le risque de cancer de l'endomètre à 70 ans est de 42-60% (7). Ce syndrome entraîne également un risque accru de cancers colorectaux, de l'ovaire et des voies biliaires ou urinaires (8).

Dans cette introduction, nous développerons dans un premier temps les caractéristiques histopathologiques et les avancées en biologie moléculaire des carcinomes endométrioïdes de l'endomètre. Dans un second temps, nous décrirons la prise en charge et notamment les méthodes chirurgicales de stadification et leurs risques. Enfin dans un dernier temps, nous tenterons de voir comment la classification moléculaire pourrait être prédictive de l'envahissement ganglionnaire.

1 Histologie des cancers de l'endomètre

Le diagnostic de cancer de l'endomètre repose sur les données anatomopathologiques. Historiquement on distinguait deux types de cancers de l'endomètre (9) : les carcinomes de type 1 ou carcinomes endométrioïdes, œstrogèno-dépendants, majoritairement de bas grade

et de bon pronostic, et les carcinomes type 2, carcinomes non endométrioïdes, non œstrogèno-dépendants, de pronostic moins favorable, incluant les carcinomes séreux et à cellules claires de l'endomètre.

Cependant, de nos jours, grâce aux avancées dans le domaine de la biologie moléculaire, ce type de classification dualiste est devenue désuète car si elle reflète une tendance, elle ne permet pas d'appréhender la nature des tumeurs au cas par cas. La classification clinico-morphologique pure a été complétée par les données de la biologie moléculaire (10) et a été intégrée dans la 5ème édition des tumeurs génitales de la femme (11). Nous nous intéressons dans ce travail aux carcinomes endométrioïdes exclusivement qui représentent le sous type histologique le plus fréquent des cancers de l'endomètre (12).

Nous commencerons par décrire dans cette première partie les caractéristiques histologiques des carcinomes endométrioïdes de l'endomètre puis nous développerons ensuite les avancées de la biologie moléculaire dans le domaine.

1.1 Histopathologie

Macroscopiquement, les tumeurs endométrioïdes sont d'aspect exophytique ou infiltrative de façon diffuse ; on y observe parfois une proportion nécrotique ou hémorragique, pouvant rendre l'analyse complexe (11). En microscopie, le carcinome endométrioïde est le plus souvent d'architecture glandulaire, cribriforme ou villoglandulaire avec une pseudostratification nucléaire. Le cytoplasme de ces cellules tumorales est généralement éosinophile et granulaire, et les atypies cytonucléaires sont variées. La proportion de mitoses est également variable. Il peut présenter des variants histologiques, ne conditionnant pas le pronostic, micro-glandulaire, sécrétoire et à cellule ciliées. La distinction entre carcinome endométrioïde et hyperplasie endométriale avec atypie dépend de la présence d'une invasion stromale, caractérisée par l'absence de stroma entre deux glandes atypiques (croissance tumorale de type glandulaire confluente), d'une réaction du stroma (ou stroma-réaction desmoplastique) ou bien d'une complexité architecturale principalement villo-glandulaire (11).

1.2 Grade tumoral

Le grade histologique s'applique uniquement à l'adénocarcinome endométrioïde, puisque le carcinome séreux et le carcinome à cellules claires sont, par définition, de haut grade. On utilise en pratique un système de grade binaire, séparant les carcinomes endométrioïdes de bas grade (grade 1 et 2), des carcinomes endométrioïdes de haut grade (grade 3).

Les grades 1, 2 et 3, définis par la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO) étaient caractérisés respectivement par une proportion de moins de 5%, de 6 à 50%

et de plus de 50% de zones solides non glandulaires et non squameuses. De plus, la présence de plus de 50% d'atypies cytonucléaires augmente le grade d'une unité (Figure 1).

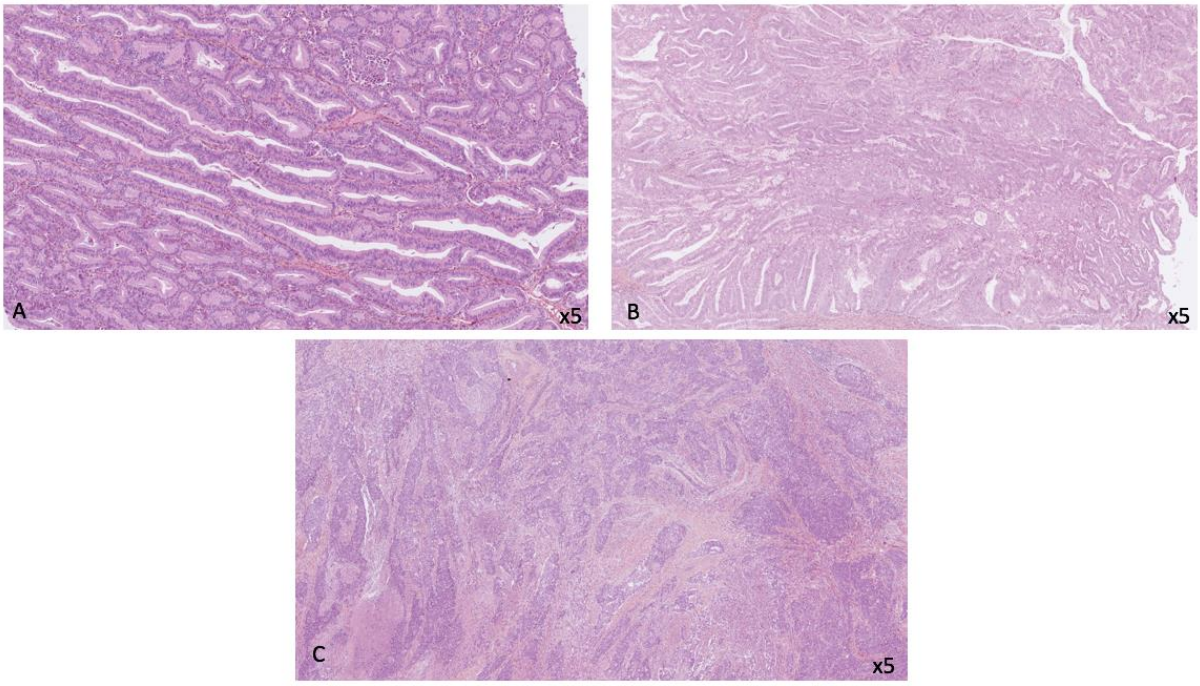


Figure 1. Coupes histologiques de carcinomes endométrioïdes de différents grades histopronostiques.
A : Bas grade (grade 1 selon FIGO/OMS), N-, NSMP, p53wt.
B : Bas grade (grade 2 selon FIGO/OMS), N-, NSMP, p53wt.
C : Haut grade (grade 3 selon FIGO/OMS), N+, MMRd, p53wt

1.3 Caractéristiques immunohistochimiques, moléculaires et diagnostic différentiel

La morphologie associée à l'immunohistochimie permet de distinguer les carcinomes endométriaux des carcinomes endocervicaux HPV induits : les carcinomes endométrioïdes endométriaux présentent des cellules cylindriques à cytoplasme plus éosinophile et sont caractérisés par une forte expression des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et par une expression inégale, « patchy », voire absente de la protéine p16. Cependant, les carcinomes endométrioïdes de haut grade peuvent perdre l'expression des récepteurs en œstrogène et les différencier des carcinomes séreux de l'endomètre est parfois complexe. Ils sont généralement solides avec un pléomorphisme nucléaire moins prononcé que ces derniers. Les carcinomes endométrioïdes de haut grade présentent préférentiellement une perte d'expression de *ARID1A, PTEN* ou de l'une des protéines MMR. L'expression anormale de p53 est retrouvée dans 2 à 5% des carcinomes endométrioïdes de bas grade et 20% des haut grade (11).

1.4 Emboles vasculaires

Les emboles vasculaires ou angio-invasions sont définis par la présence de cellules tumorales au sein des structures vasculaires, au-delà des limites tumorales. Ils sont présents dans 5 à 15% des cas et sont fréquemment associés au « pattern MELF (Microcystic, Elongated and Fragmented pattern of invasion) ». Distinguer ces emboles vasculaires des artéfacts liés à la rétraction des tissus ou au retard de fixation peut s'avérer parfois complexe. La présence d'emboles vasculaires au sein de la tumeur constitue un facteur de risque indépendant d'envahissement ganglionnaire, de métastases à distance et de récurrence (13–15).

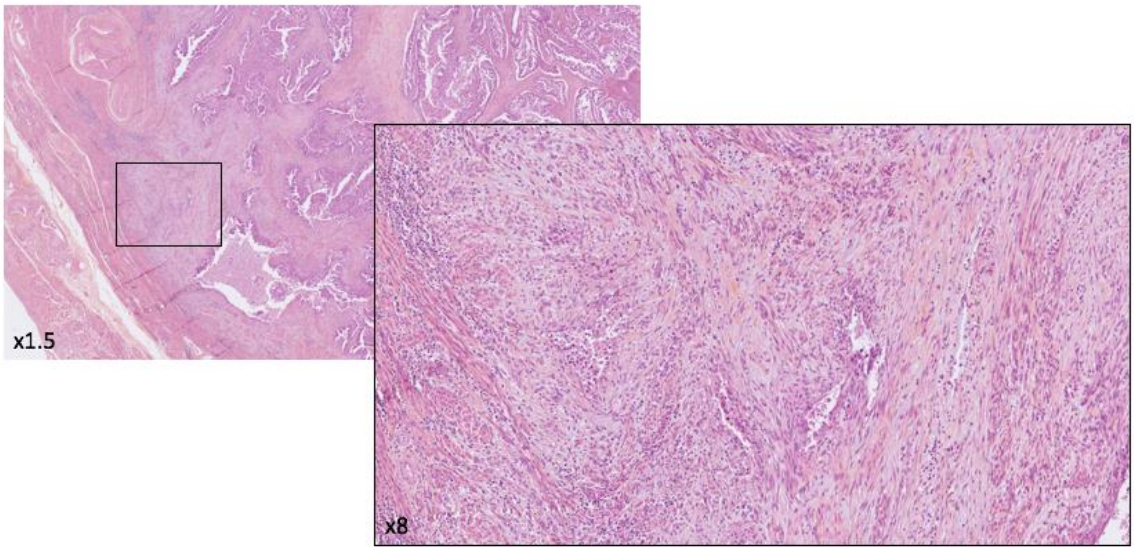


Figure 2. Coupes histologiques d'un carcinome endométrioïde de l'endomètre de haut grade avec MELF (*Microcystic, Elongated and Fragmented pattern of invasion*) pattern, réaction stromale et emboles vasculaires focaux

En 2015, T. Bosse et col. ont tenté de déterminer quel mode de quantification des emboles vasculaires pourrait refléter ce risque. La relecture de 926 échantillons dont 129 cas avec des emboles a permis d'établir que la méthode de quantification à trois niveaux (absence, focaux, diffus) était adaptée. Après ajustement sur l'âge, sur le degré d'invasion myométriale, sur le grade et sur le traitement, la présence d'emboles vasculaires diffus multiplie le risque de métastases à distance par 3,6 IC95% [1,9-6,8] et le risque de récurrence pelvienne par 6,2 IC95% [2,4-16,0]. En pratique clinique, on distingue la présence focale d'emboles (moins de 5) et diffuse (5 ou plus), car cet impact pronostic est particulièrement marqué à partir de cinq vaisseaux envahis (16).

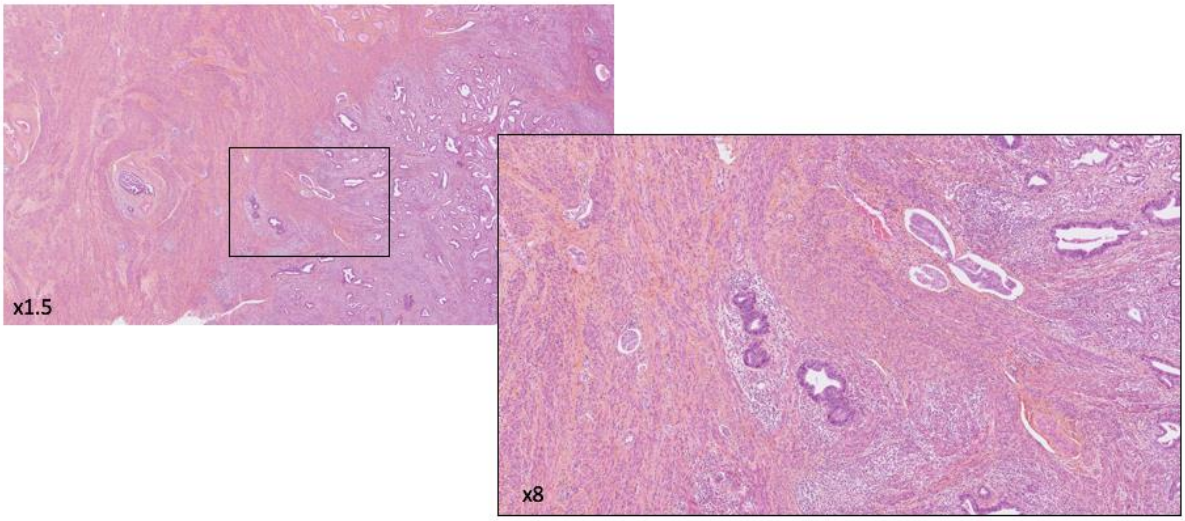


Figure 3. Coupes histologiques d'un carcinome endométrioïde de l'endomètre, N-, de haut grade avec MELF (*Microcystic, Elongated and Fragmented pattern of invasion*) pattern et emboles vasculaires diffus

Le type histologique, le grade histologique, le stade, le degré d'envahissement myométrial et la présence d'emboles vasculaires sont les éléments traditionnellement considérés pour le choix des modalités de prise en charge. Cependant, la comparaison des différents scores disponibles pour stratifier le risque de récidive à l'aide de ces modalités mettait en évidence le manque de précision de ces système de stratification (17). **Le développement de nouvelles classifications moléculaires et leur intégration dans les décisions de prise en charge a permis d'améliorer cette stratification.**

2 Classification moléculaire des cancers de l'endomètre

2.1 Description de la classification moléculaire

En 2013, le programme « The Cancer Genomic Atlas » (TCGA) a publié les résultats de ses travaux de caractérisation génomique, transcriptomique et protéomique du cancer de l'endomètre(18). L'analyse du séquençage de l'exome de 323 carcinomes de l'endomètre a permis de distinguer quatre groupes de tumeurs :

1) Groupe 1 : « ultra-muté », représentant 7% des carcinomes de l'endomètre et caractérisé par des mutations somatiques inactivatrices de plusieurs hotspot du domaine exonucléase du gène de la polymérase Epsilon *(POLE)*, protéine impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN. Ces tumeurs ont une fréquence mutation élevée dépassant les 100 mutations par mégabase. Les carcinomes endométrioïdes de grade 3 sont largement représentés dans le groupe 1, et **les tumeurs de ce groupe sont généralement de pronostic favorable** (19).

2) Groupe 2 : « hypermuté », représentant 28% des tumeurs endométriales, constitué des carcinomes présentant une instabilité microsatellitaire (*MSI*) liée à un dysfonctionnement des protéines du système *MisMatch Repair* (MMR), impliquées dans la réplication de l'ADN et codées par les gènes *MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6*. Le mécanisme le plus fréquent est l'hyper méthylation de *MLH1*.

3) Groupe 3 : « endométrioïde » ou NSMP (*Non specific molecular profile),* représentant 39% des carcinomes de l'endomètre, qui regroupe des carcinomes endométrioïdes ayant des profils génomiques peu remaniés, une faible fréquence mutationnelle et l'absence de mutation *POLE* et non *MSI*.

Les groupes 2 et 3 ont une survie sans progression similaire et intermédiaire par rapport aux groupe 1 et 4

4) Groupe 4 : « serous-like » ou « copy-number high » représentant 26% des cancers de l'endomètre, caractérisé par une faible charge mutationnelle et des mutations très fréquentes de *TP53* (dans 95% des cas). La majorité des tumeurs de ce sous-groupe sont des carcinomes séreux, cependant, 25% sont des carcinomes endométrioïdes de haut grade. **Le pronostic des carcinomes constituant ce groupe est sombre** (20).

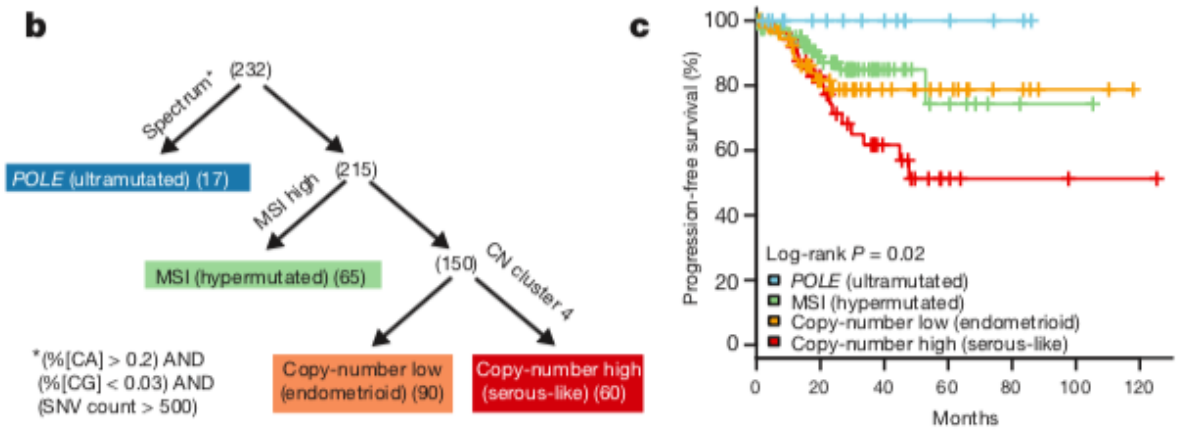


Figure 4. Stratification des tumeurs endométriales selon 4 groupes (b) Survie sans progression en fonction des 4 groupes de cancer de l'endomètre (c) d'après « Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma », The Cancer Genome Atlas, Nature 2013 (20)

2.2 Algorithme diagnostic intégrant les caractéristiques moléculaires

Dans la 5ème édition du *World Health Organisation classification of tumours of female reproductive organs* (11), la classification moléculaire introduite par le TCGA est détaillée et un algorithme diagnostic histo-moléculaire est proposé (**Tableau 1 et Figure 2**).

La recherche ciblée d'une mutation pathogène *POLE* concentrée sur 5 hotspots (p.Pro286Arg, p.Val411Leu, p.Ser297Phe, p.Ala456Pro and p.Ser459Phe) associée à l'analyse de l'immunohistochimique de MSH6, PMS2 et p53, permet avec la mise en œuvre de moyens abordables d'incorporer la classification moléculaire dans l'algorithme décisionnel.

Tableau 1. Classification moléculaire des carcinomes endométrioïdes de l'endomètre (EC) et caractéristiques usuelles d'après « Endometrial carcinoma -Female Genital Tumors 5 ed WHO », Bosse T et al, 2020

	POLE-ultramutated EC	MMR-deficient EC	p53-mutant EC	NSMP EC
Associated molecular features	> 100 mutations/Mb, SCNA very low, MSS	10-100 mutations/Mb, SCNA low, MSI	< 10 mutations/Mb, SCNA high, MSS	< 10 mutations/Mb, SCNA low, MSS, 30-40% with CTNNB1 mutations
Associated histological features	Often high-grade, ambiguous morphology with scaffered tumour giant cells, prominent TILS	Often high-grade, prominent TILs, mucinous differentiation, MELF-type invasion, LVSI	Mostly high grade with diffuse cytonuclear atypia; glandular and solid form exists	Mostly low grade with frequent squamous differentiation or morule, absence of TILs
Diagnostic tests	NGS/ Sanger Sequencing / hotspot analysis incudes p.Pro286Arg, p.Val411Leu, p.Ser297Phe, p.Ala456Pro and p.Ser459Phe	MMR-IHC: MLHA, MSH2, MSH6 and PMS2; MSI assay; NGS	p53-IHC; mutant-like staining	MMR-proficient, p53 wild, and pathogenic *POLE* variant absent
Associated clinical features	Younger age at presentation	May be associated with Lynch syndrome	Advance stage at presentation	High body mass index
Prognosis	Excellent	Intermediate	Poor	Intermediate to excellent

IHC, immunochemistry; LVSI Lymphovascular space invasion; MELF, microcystic, elongated, and fragmented; MMR, Mismatch repair; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability; NGS, Next-generation sequencing; NSMP, non-specific molecular profile

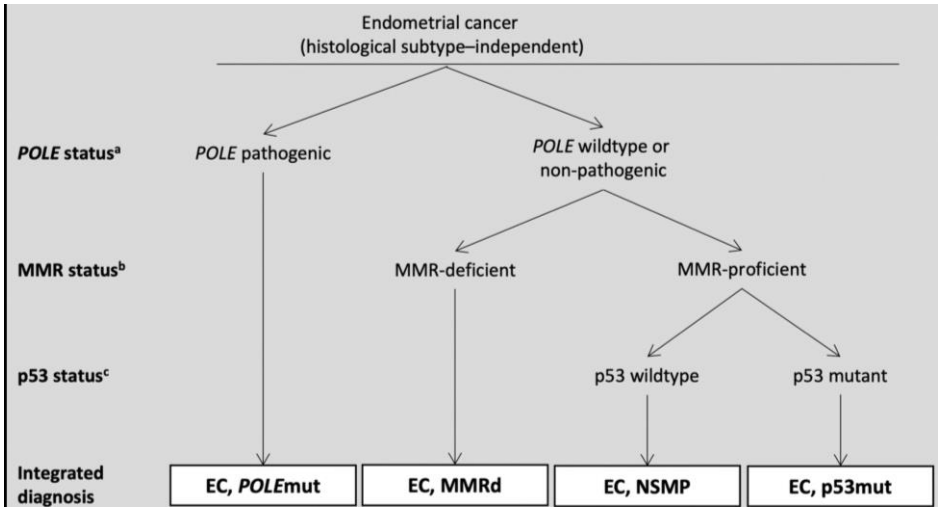


Figure 5. Algorithme diagnostique issu de la classification histo-moléculaire des carcinomes de l'endomètre d'après « Endometrial carcinoma -Female Genital Tumors 5 ed WHO », Bosse T et al, 2020

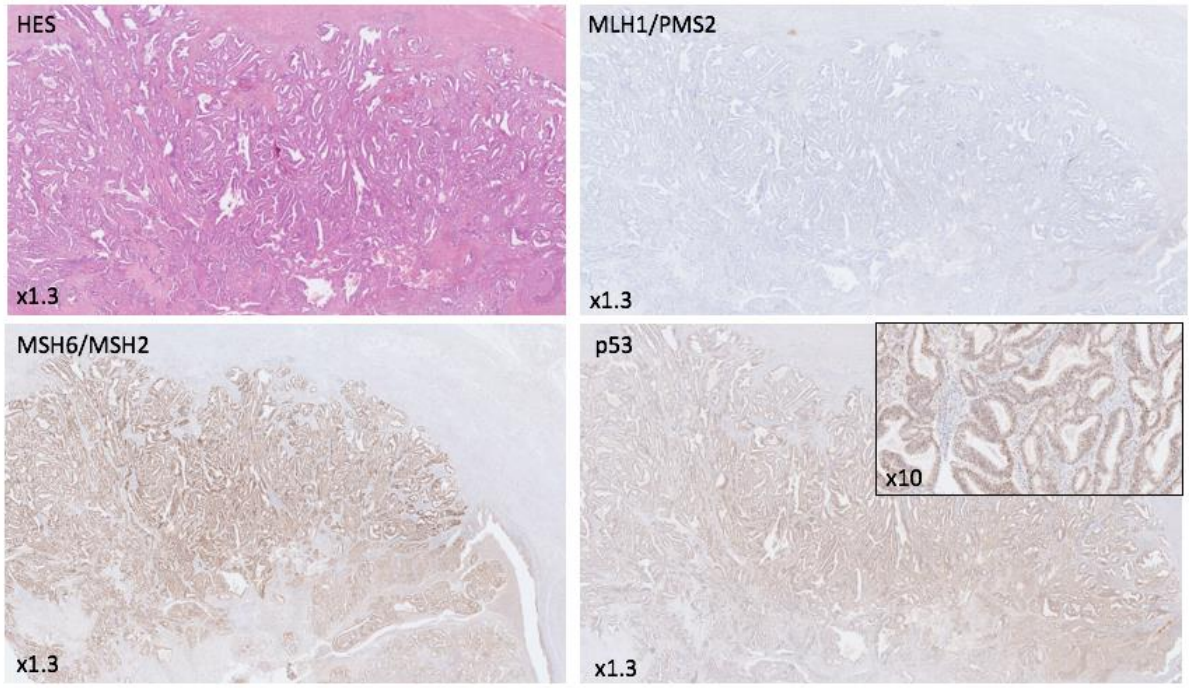


Figure 6. Coupe histologique et Immunohistochimie d'un CEE de haut grade du groupe "hypermuté" : MMR déficient avec perte de MLH1/PMS2 et p53 *wild type*

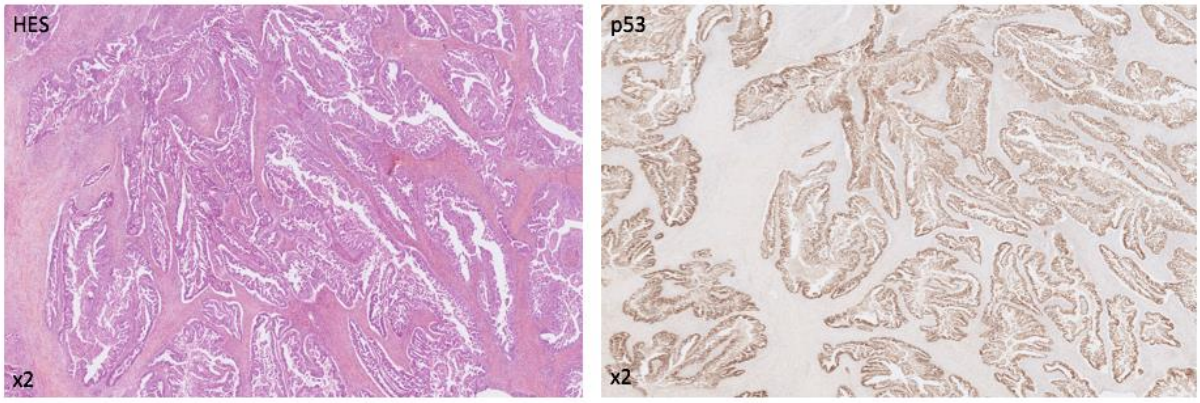


Figure 7. Coupe histologique et Immunohistochimie d'un CEE de haut grade du groupe "serous-like" : avec une expression anormale de p53 et une mutation pathogénique de *TP53* associée

La majorité des carcinomes de l'endomètre pourront par ce procédé être classés selon leur sous-groupe moléculaire. Cependant, 3 à 5% d'entre eux pourront présenter plus d'une altération de la classification (21). En présence d'une mutation *POLE* associée à p53-mutant, le pronostic reste comparable à celui du groupe *POLE* ultramuté.

Un autre algorithme nommé « ProMisE (*Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer*) » a été décrit par Talhouk et col. Il inclut l'analyse immunohistochimique de trois marqueurs (p53, MSH6 et PMS2) et la recherche de mutation de *POLE* (22). Des études successives ont ensuite permis de démontrer la valeur pronostic de ce modèle de façon rétrospective (23,24).

Cet algorithme simplifié permet d'identifier les quatre sous-groupes précédemment décrits : la présence d'une mutation POLE définit les tumeurs du groupe « ultramutés » (ou groupe 1). L'expression anormale de MSH6 ou PMS2 défini les tumeurs du groupe « hypermuté » (ou groupe 2). L'expression anormale de p53 caractérise les tumeurs du groupe « copy-number hight » (ou groupe 4). Enfin, les tumeurs du groupe NSMP sont définies par l'absence de mutation POLE et une expression normale de MSH6, PMS2 et p53. La réalisation successive de ces quatre analyses moléculaires selon le schéma de la Figure 4 permettrait en routine de classer les tumeurs endométriales selon quatre groupes pronostiques.

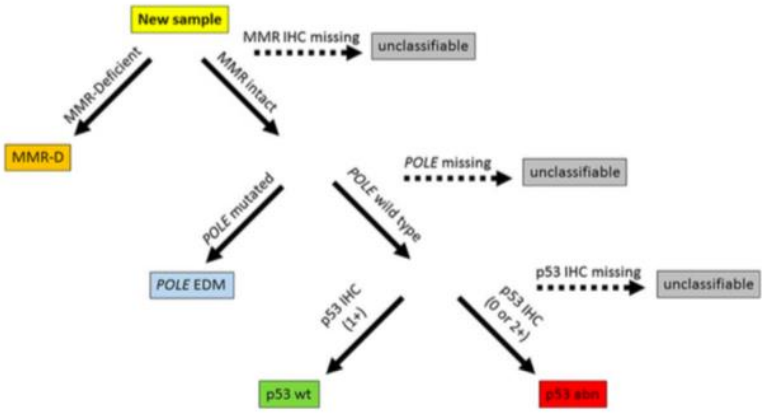


Figure 8. Étapes de la classification moléculaire ProMisE d'après « A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers », Talhouk et al. BJC, 2015.

Le recours à cette classification moléculaire semble particulièrement intéressant pour appréhender l'hétérogénéité du groupe des carcinomes de l'endomètre à haut risque. En effet, les carcinomes endométrioïdes de l'endomètre de grade 3 sont décrits comme des tumeurs agressives, se rapprochant des carcinomes séreux de l'endomètre. L'analyse moléculaire appliquée à un sous-groupe de carcinomes endométrioïdes de l'endomètre d'une part (25), et aux patientes incluses dans l'essai PORTEC 3 d'autre part (26), a permis de redéfinir des groupes pronostiques. En effet, cette analyse a mis en évidence au sein du groupe des carcinomes à haut risque un groupe ayant un pronostic plus favorable (ceux présentant des mutations de *POLE*), un groupe ayant un pronostic très sombre (tumeurs ayant p53 anomal) et deux groupes de pronostic intermédiaire (MSI-high et NSMP). Dans l'étude de Bosse T. et col., ces sous-groupes étaient statistiquement liés à la survie globale qui était à 5 ans de 89% pour le groupe *POLE* muté, 75% dans le groupe MMR déficient, 69% dans le groupe non spécifique et 55% dans le groupe p53 anormal (p=0,001).
L'apport de ces classifications moléculaires pour affiner l'évaluation pronostique des groupes de carcinome de l'endomètre à haut risque est intéressant (27).

Cette classification moléculaire a également été étudiée sur une population de carcinomes endométriaux à risque bas ou intermédiaire issue des études PORTEC 1 et 2

(28,29). Les 4 sous-groupes moléculaires étaient bien retrouvés parmi les carcinomes endométriaux à risque bas et intermédiaire et leur intégration aux données clinico-pathologiques permettaient d'améliorer les modèles pronostiques (30).

2.3 Intégration en pratique clinique

Depuis 2021, les recommandations émises par le groupe ESGO/ESTRO/ESP intègrent les données issues de la classification moléculaire dans la définition des groupes pronostiques. Ces résultats obtenus généralement en post opératoires permettent d'orienter les choix de traitement adjuvants (31). Le détail de cette classification en groupes pronostiques est détaillé dans le **tableau 2**, les groupes à bas risque, risque intermédiaire, risque intermédiaire haut et haut risque y sont décrit selon la connaissance ou non des données de classification moléculaire.

Tableau 2 : Définition des groupes pronostiques des carcinomes de l'endomètre, d'après « ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma », Concin N, et al. Int J Gynecol Cancer 2021 (31)

Risk group	Molecular classification unknown	Molecular classification known*†
Low	► Stage IA endometrioid + low-grade‡ + LVSI negative or focal	► Stage I–II ***POLEmut*** endometrial carcinoma, no residual disease ► Stage IA **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma + low-grade‡ + LVSI negative or focal
Intermediate	► Stage IB endometrioid + low-grade‡ + LVSI negative or focal ► Stage IA endometrioid + high-grade‡ + LVSI negative or focal ► Stage IA non-endometrioid (serous, clear cell, undifferentiared carcinoma, carcinosarcoma, mixed) without myometrial invasion	► Stage IB **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma + low-grade‡ + LVSI negative or focal ► Stage IA **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma + high-grade‡ + LVSI negative or focal ► Stage IA **p53abn** and/or non-endometrioid (serous, clear cell, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed) without myometrial invasion
High–intermediate	► Stage I endometrioid + substantial LVSI regardless of grade and depth of invasion ► Stage IB endometrioid high-grade‡ regardless of LVSI status ► Stage II	► Stage I **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma + substantial LVSI regardless of grade and depth of invasion ► Stage IB **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma high-grade‡ regardless of LVSI status ► Stage II **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma
High	► Stage III–IVA with no residual disease ► Stage I–IVA non-endometrioid (serous, clear cell, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma, mixed) with myometrial invasion, and with no residual disease	► Stage III–IVA **MMRd/NSMP** endometrioid carcinoma with no residual disease ► Stage I–IVA **p53abn** endometrial carcinoma with myometrial invasion, with no residual disease ► Stage I–IVA **NSMP/MMRd** serous, undifferentiated carcinoma, carcinosarcoma with myometrial invasion, with no residual disease
Advanced metastatic	► Stage III–IVA with residual disease ► Stage IVB	► Stage III–IVA with residual disease of any molecular type ► Stage IVB of any molecular type

*For stage III–IVA *POLE*mut endometrial carcinoma and stage I–IVA MMRd or NSMP clear cell carcinoma with myometrial invasion, insufficient data are available to allocate these patients to a prognostic risk group in the molecular classification. Prospective registries are recommended.
†See text on how to assign double classifiers (eg, patients with both *POLE*mut and p53abn should be managed as *POLE*mut).
‡According to the binary FIGO grading, grade 1 and grade 2 carcinomas are considered as low-grade and grade 3 carcinomas are considered as high-grade.
LVSI, lymphovascular space invasion; MMRd, mismatch repair deficient; NSMP, non-specific molecular profile; p53abn, p53 abnormal; *POLE*mut, polymerase-mutated.

2.4 Marqueurs moléculaires hors TCGA

La valeur pronostique d'autres marqueurs génomiques ou d'expression que ceux décrits par le TCGA a également été recherché. *L1CAM* (L1 cell adhesion molecule) a été identifié comme un marqueur de mauvais pronostic lorsqu'il était retrouvé dans les carcinomes endométrioïdes à bas risque. En effet, sur les 1021 carcinomes endométrioïdes de l'endomètre analysés par Zeimet et col. 17,7% étaient *LC1AM* positifs et parmi eux 51,4% ont rechuté, contre 2,9% des LCA1M négatifs (p<0,001) (32). De plus, une étude menée en 2018 sur les 452 carcinomes de l'endomètre de l'étude ProMisE a montré que l'expression de LC1AM dans le sous-groupe dit non spécifique (NSMP) était associée à un pronostic altéré (33).

De façon similaire *CTNNB1* a été identifié comme facteur pronostique péjoratif lorsqu'il était retrouvé dans les carcinomes endométrioïdes de stade I à II et de grade 1-2 (HR 5,97 IC95 [2,69-13,21]) (34). L'apport de la recherche de *CTNNB1* et *ARID1a* pour appréhender le pronostic d'un groupe de carcinomes hétérogènes tels que les NSMP de la classification TCGA semble également encourageante (35).

L'utilisation des classifications moléculaires dans la pratique clinique est désormais encouragée par les sociétés savantes et leurs résultats ont été intégrés dans la définition des différents groupes de risque du cancer de l'endomètre par l'ESGO (31). Cependant, les études prospectives pour déterminer l'apport de la classification moléculaire dans les décisions de traitement adjuvant sont en cours (PORTEC 4a).

3 Prise en charge des cancers de l'endomètre (31,36,37)

La décision thérapeutique initiale consiste, avec les données du bilan préopératoire (imagerie et biopsie endométriale), à planifier le geste chirurgical et tout particulièrement à poser l'indication de stadification ganglionnaire ou non. La décision de traitement adjuvant est ensuite prise en fonction des résultats de l'analyse finale de la pièce opératoire qui permet de répartir les tumeurs en groupes de risque.

3.1 Bilan pré opératoire

Le bilan pré opératoire repose sur la réalisation d'un examen clinique avec examen du pelvis, évaluation de l'état général de la patiente, des comorbidités et évaluation gériatrique si indiquée. Le diagnostic est affirmé par l'analyse histologique d'une pièce de biopsie à la pipelle

ou de curetage réalisé lors d'une hystéroscopie. Il est complété systématiquement par la réalisation d'une échographie transvaginale ou transrectale réalisée par un expert ou bien par une IRM pelvienne (31). Enfin, en fonction du contexte clinique et du risque métastatique, le bilan peut être complété par un scanner thoraco-abdomino-pelvien ou un TEP scanner (37).
L'ensemble de ces explorations permet de déterminer le type histologique, le grade et le stade pré opératoire, qui guideront la suite de la prise en charge, et notamment les modalités de prises en charge chirurgicales.

Des scores prédictifs de l'envahissement ganglionnaire calculés à partir de l'âge, le grade ou le type histologique, le diamètre initial de la tumeur, le degré d'envahissement myométrial et la présence ou non d'emboles vasculaires ont été développés (38). Cependant, les données de validation externe de ces scores montrent la nécessité d'un affinement des variables pour améliorer leur discrimination avant une utilisation en pratique clinique (39).

3.2 Traitement chirurgical

Il comprend à la fois le traitement de l'appareil génital et la stadification chirurgicale ganglionnaire voire également péritonéale. Le traitement de l'appareil génital repose sur l'hystérectomie totale et l'annexectomie bilatérale dans la majorité des cas. Le recours à la chirurgie mini-invasive est recommandé si les conditions locales le permettent et le degré d'élargissement du geste est dépendant de l'extension locale de la maladie afin de permettre une exérèse complète. L'utilisation du manipulateur utérin pour faciliter la mobilisation de l'utérus lors de cette chirurgie mini-invasive est actuellement discutée. En effet, certaines études rétrospectives semblent retrouver une augmentation du risque de récurrence en cas de recours au manipulateur lors de chirurgies pour cancer de l'endomètre (40).
En cas de stade avancé, la chirurgie peut rester indiquée si une exérèse macroscopie complète est possible. Les méthodes et indications de stadification ganglionnaire sont décrites dans la partie 4 de ce document.

3.3 Traitements adjuvants

L'indication et les modalités de traitement adjuvant dépendent du groupe pronostique du cancer de l'endomètre, établit à partir des résultats post opératoires et présentés dans le **tableau 1**. Les différentes indications des traitements adjuvants selon les recommandations de l'ESGO de 2020 sont présentées dans le paragraphe ci-dessous.

3.3.1 Carcinomes endométriaux stade I-II

Bas risque

Les carcinomes endométrioïdes à bas risque n'ont pas d'indication à recevoir un traitement adjuvant. Lorsqu'une mutation *POLE* est identifiée pour un carcinome de l'endomètre de stade I-II, l'absence de traitement adjuvant peut se discuter (31).

Risque intermédiaire

Les carcinomes endométrioïde à risque intermédiaire sont traités par curiethérapie vaginale adjuvante exclusive en général. L'ajout de radiothérapie externe n'est pas recommandée car elle n'améliore pas la survie globale (28,29). L'absence de traitement adjuvant chez les patientes de moins de 60 ans est également une alternative à discuter. Pour les carcinomes p53 anormal sans invasion myométriale, l'absence de traitement adjuvant est à discuter (31).

Risque intermédiaire haut (pN0 après stadification ganglionnaire)

Une curiethérapie vaginale sera proposée pour réduire le risque de récidive vaginale. La réalisation d'une radiothérapie externe sera par ailleurs à discuter en présence d'emboles lymphatiques diffus ou de stade II et l'ajout d'une chimiothérapie pourra être discuté dans la prise en charge des tumeurs de haut grade ou ayant des emboles vasculaires.

Risque intermédiaire haut (sans évaluation ganglionnaire réalisée)

Le traitement adjuvant consistera alors en une curiethérapie vaginale associée à une radiothérapie externe. L'ajout d'une chimiothérapie adjuvante pourra être proposée en cas de tumeur de haut grade ou d'emboles vasculaires. Une curiethérapie exclusive pourra être réalisée en cas de carcinome endométrial sans embole vasculaire et pour les stade II de grade 1.

Haut risque

La nouvelle définition des groupes de risque intégrant les données moléculaires est à l'origine de modifications de ce sous-groupe qui rassemble désormais les stades III-IVa sans maladie résiduelle, les stades I-IVa p53 anormal et les carcinomes non endométrioïdes. Le traitement adjuvant recommandé dans ce cas de figure est la radiothérapie externe associée à une chimiothérapie (31).

3.3.2 Traitement des carcinomes endométrioïdes de stade III-IV

Un traitement par chimiothérapie combinée à une radiothérapie externe et curiethérapie est généralement proposé. En effet, les résultats de l'essai PORTEC-3, comparant la chimiothérapie combinée à la radiothérapie versus radiothérapie seule, ont permis de mettre en évidence que, dans le sous-groupe des carcinomes de l'endomètre de stade III, l'adjonction de la chimiothérapie améliorait la survie sans progression (41). Dans les stades IIIC2 (envahissement des ganglions lombo-aortiques) une radiothérapie pelvienne et lombo-aortique avec optimisation de la dose sur la moelle hématopoïétique est nécessaire.

4 Lymphadénectomie pelvienne et lomboaortique : technique chirurgicale, indications et complications

4.1 Indications

La lymphadénectomie fait partie de la prise en charge des tumeurs endométriales, dans un but principal de stadification. Le recours à la technique du ganglion sentinelle apparaît à ce jour comme une alternative acceptable à la lymphadénectomie dans certaines situations cliniques. Les recommandations de 2020 de l'ESGO sont les suivantes (31) :

- Cancers endométrioïdes à bas risque ou risque intermédiaire : le recours au ganglion sentinelle peut être envisagé et peut ne pas être réalisé en l'absence d'invasion myométriale. La réalisation d'une lymphadénectomie systématique n'est pas recommandée dans ce sous-groupe.
- Cancer endométrioïdes à risque intermédiaire haut ou à haut risque : la réalisation d'une stadification ganglionnaire est recommandée. La réalisation d'un prélèvement du ganglion sentinelle est possible en cas de pathologie stade I-II.
- Lorsque la réalisation d'une lymphadénectomie est nécessaire le prélèvement des ganglions pelviens et lomboaortiques est recommandé.
- En cas de pathologie localement avancée (stade III-IV) la lymphadénectomie systématique n'est pas recommandée et seuls les ganglions suspects serons retirés.

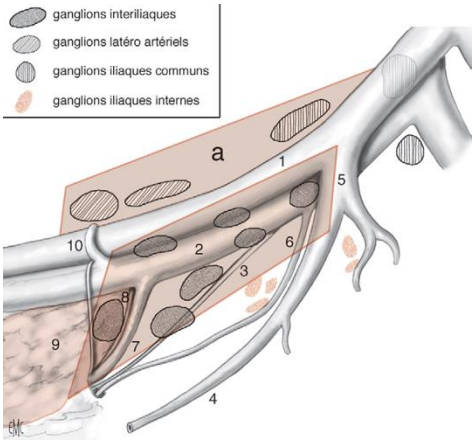
Lorsque l'indication de lymphadénectomie est posée, elle doit comporter à la fois les curages pelviens bilatéraux et le curage lomboaortique complet remontant jusqu'à la veine rénale gauche.

4.2 Techniques chirurgicales

4.2.1 Curage pelvien

La lymphadénectomie dite « pelvienne » vise à prélever les ganglions de l'aire ilio-obturatrice, qui se situe entre l'anneau fémoral et la bifurcation hypogastrique. Le prélèvement simultané des ganglions iliaques externes et internes doit être réalisé. Les ganglions iliaques externes accompagnent les vaisseaux iliaques externes. Ils comportent une chaîne latérale (latéro-vasculaire), une chaîne moyenne (inter-artérioveineuse) et une chaîne médiale (entre veine et nerf obturateur). Les ganglions iliaques internes accompagnent l'arborisation des branches de l'artère iliaque externe (42). En cas de curage lombo aortique simultané, il sera complété par un curage iliaque commun.

Les limites anatomiques de la zone de curage sont celles qui délimitent la fosse paravésicale : latéralement les vaisseaux iliaques externes, médialement l'artère ombilicale, en postérieur le nerfs obturateur et son pédicule satellite (43).



1. Artère iliaque externe ; 2. Veine iliaque externe ; 3. nerf obturateur ; 4. artère ombilicale ; 5. artère iliaque interne ; 6. veine iliaque interne ; 7. artère obturatrice antérieure ; 8. veine obturatrice antérieure ; 9. branche ilio-pubienne et ligament de Cooper ; 10. veine circonflexe antérieure

Figure 9. Anatomie lymphatique pelvienne d'après « Technique des lymphadénectomies pelviennes laparoscopiques » Leblanc E et col. EMC Gynécologie Obstétrique 2005

La lymphadénectomie pelvienne peut être pratiquée par voie endoscopique ou par chirurgie ouverte en fonction de la tumeur centrale. L'intervention débute par l'identification de l'ensemble des repères anatomiques, suivie du prélèvement du paquet ganglionnaire dans son intégralité, les difficultés pouvant être rencontrées sont généralement liées aux variations anatomiques ou à la morphologie de la patiente.

4.2.2 Curage lomboaortique

La lymphadénectomie lomboaortique peut être réalisée par voie coelioscopique ou en chirurgie ouverte ; elle peut être réalisée par voie transpéritonéale ou bien sous-péritonéale

(44). Elle consiste à évider la totalité d'une zone rectangulaire limitée vers le haut par la veine rénale gauche, latéralement par les deux uretères et vers le bas par la bifurcation artério-veineuse. En profondeur seuls les ganglions rétro vasculaires peuvent être laissés en place dans la mesure ou l'utilité de leur ablation n'a pas été démontrée et où le risque de blessure de la citerne de Pecquet, générateur de lymphorrhées, est augmenté (45).

Comme pour les curages pelviens, une identification en premier lieu des limites de la lymphadénectomie et une connaissance des zones à risque sont nécessaires pour limiter les complications.

4.2.3 Ganglion sentinelle

La technique du ganglion sentinelle est une méthode diagnostique qui permet le prélèvement ganglionnaire ciblé des premiers relais ganglionnaires de la tumeur, représentatifs des ganglions d'aval (46). Il a été décrit comme une alternative aux curages ganglionnaires, et il permet, en cas de résultat négatif de confirmer l'absence d'envahissement ganglionnaire (31). La méthode de détection recommandée est le vert d'indocyanine, permettant d'améliorer la détection du ganglion sentinelle par rapport au bleu patenté (47).

La sensibilité du ganglion sentinelle pour les carcinomes de l'endomètre pris en charge à un stade précoce, ainsi que son impact sur le choix du traitement adjuvant ont fait l'objet de plusieurs analyses, confirmant l'intérêt de cette technique dans cette indication (48–50). Les résultats pour les carcinomes de l'endomètre à haut risque semblent également mettre en évidence une sensibilité de la technique satisfaisante (51–53). Le recours à la technique du ganglion sentinelle pour la stadification ganglionnaire des carcinomes endométrioïdes de stade I est actuellement recommandé. Son utilisation pour les cancers à risque intermédiaire et haut est également validée, cependant une étude randomisée prospective (SENTIRAD) est actuellement en cours.

4.3 Complications des lymphadénectomies

Deux types de complication peuvent être observés : les complications per opératoires, principalement des plaies vasculaires, urinaires, digestives ou nerveuses et les complications post opératoires, majoritairement les lymphocèles et les lymphœdèmes, mais également les complications thromboemboliques.

Une étude rétrospective menée en France sur 915 patientes a permis d'étudier les complications des lymphadénectomies pelvienne et lomboaortique par voie coelioscopique. Le taux d'échec de procédure était de 1,45% ; les plaies vasculaires étaient observées dans 1,85% des cas sans nécessiter de laparo-conversion ; 2,07% de complications viscérales ont été constatées (plaie nerveuse, majoritairement par section du nerf obturateur, plaie urinaire

ou digestive). La majorité des complications per opératoires est apparue lors de la première moitié de la série, suggérant l'importance de l'apprentissage de la méthode. Enfin 80 complications lymphatiques (8,74%) étaient constatées dans cette série (54).
Une revue de la littérature menée par la Cochrane en 2017 a permis de mettre en évidence que les patientes traitées par lymphadénectomie avaient un risque significativement plus élevé de morbidité systémique post opératoire (infection, complication thromboembolique, accident vasculaire cérébral ou cardiaque) (RR 3,72 ; IC95% [1,04-13,27]) et de lymphœdèmes ou lymphocèles (RR 8,39 ; IC95% [4,06-17,33])(55), avec un retentissement sur la qualité de vie (56).

Bien qu'elle permette de réduire la survenue de complications post-opératoires, la technique de prélèvement du ganglion sentinelle ne permet pas de les supprimer totalement. En effet, l'ablation d'un ganglion isolé peut parfois être plus difficile et plus à risque qu'une dissection complète. Par exemple dans l'étude FIRES publiée en 2017, l'une des patientes avait présenté une lésion urétérale lors de la dissection du ganglion sentinelle (48). Les complications lymphatiques, bien que réduites persistent, variant de 17,5 à 27% après le prélèvement du ganglion sentinelle (57,58).

5 Signature moléculaire prédictive de l'envahissement ganglionnaire

La réalisation systématique d'une lymphadénectomie n'apporte pas de bénéfice en terme de survie (59), et n'est pas recommandée. Le développement de la méthode du ganglion sentinelle apparaît à ce jour comme une méthode efficace pour rechercher un envahissement ganglionnaire tout en limitant la morbidité des curages complets. **Cependant, le prélèvement de tissus ganglionnaires, qu'il soit complet ou localisé à l'aide d'une méthode de détection reste un geste chirurgical morbide. Les prélèvements ganglionnaires sont réalisés à visé diagnostique et non thérapeutique, la prédiction de l'envahissement en préopératoire de façon fiable pourrait permettre de limiter les indications opératoires, sans retentir sur les indications de traitement adjuvant. L'émergence des méthodes de classification moléculaire pour les cancers de l'endomètre et leur intérêt pronostique peut constituer un élément d'intérêt.**

De plus, les analyses disponibles sur les pièces de biopsie endométriale semblent en faveur d'une concordance des analyses moléculaires par rapport aux pièces d'hystérectomie, permettant d'envisager une classification pré opératoire qui pourrait guider la décision thérapeutique (60).

5.1 État des connaissances

5.1.1 Classification TCGA et envahissement ganglionnaire

La classification moléculaire décrite par le TCGA a permis de définir quatre groupes distincts directement liés au pronostic comme nous l'avons vu précédemment. La question de l'apport de cette classification pour prévoir l'envahissement ganglionnaire a constitué la première étape de notre analyse.

Une étude de Kolehmainen et col. publiée en octobre 2020 a recherché la relation entre le groupe moléculaire et l'envahissement ganglionnaire chez 604 patientes ayant un cancer de l'endomètre. Le groupe moléculaire n'était pas dans cette étude un facteur prédictif indépendant de l'envahissement ganglionnaire contrairement au type histologique, au degré d'envahissement myométrial, à la taille de la tumeur et à la présence d'emboles vasculaires.

Nous avons confirmé ces résultats par l'étude de la répartition des différentes classes moléculaires (ultramuté, hypermuté, NSMP ou serous-like) entre les groupes avec et sans envahissement ganglionnaire de notre population.

5.1.2 Recherche de signature moléculaire

La recherche de signature moléculaire pour l'envahissement ganglionnaire dans le cancer de l'endomètre a déjà fait l'objet de quelques publications ces dernières années, sans qu'une signature unique n'ait pu être identifiée.

En 2016, Bou Zheib et col. ont analysé les données publiques du TCGA afin de comparer les données d'expression génomique et protéique entre 38 sujets N1 et 165 sujets N0, sans sélection préalable d'un sous type histologique. L'analyse multivariée réalisée a permis d'identifier 10 gènes (*ARSI, RNF183, DNER, DUSP9, TEX19, RSP6KA6, FBN3, MUC6, GABRQ, FLJ16779*) et 4 protéines (EF2K, EGFR, PDK1, YB) associés indépendamment à l'atteinte ganglionnaire (61). Cependant, aucune validation de cette signature n'était disponible. De même en 2018, Kang et col. ont analysé l'expression génique de 330 carcinomes endométrioïdes de l'endomètre aux États-Unis, dont 45 avec un envahissement ganglionnaire. Ils ont identifié une signature moléculaire constituée de 12 gènes (*GREM2, FMO2, TMEM212, ESR1, RPTN, PRR9, TCHHL1, CPB1, CLCN2, ITLN2, PKHD1L1, SLC9C2)*(62). Cependant, aucune donnée clinique relative au grade tumoral ou l'invasion myométriale permettant de s'assurer de la comparabilité n'était disponible au préalable.

En 2020, une équipe de recherche menée par Huang et col. a proposé une signature moléculaire composée de 5 gènes (*ASRGL1 , RHEX, SCGB2A1, SOX17, STX18*) établie à l'aide des données d'expression d'ARN de 24 échantillons issus de leur centre à Taiwan et 289 issus du TCGA ; puis validée sur 72 échantillons indépendants sélectionnés dans leur

centre (63). La signature finale obtenue avait une Sensibilité de 88,9% et une Spécificité de 84,1%. Pourtant la validité externe de cette dernière était limitée par l'origine multiple des échantillons, la faible proportion d'échantillons issue du centre et le manque d'information clinique et de prise en charge des patients du TCGA. Par ailleurs, la signature proposée par Huang et col. n'a pas pu être reproduite dans notre population et aucun des 5 gènes finaux n'était différenciellement exprimé entre les patients avec et sans envahissement ganglionnaire dans notre population.

Malgré l'existence de plusieurs publications sur le sujet, aucune n'a permis de trouver une signature commune aux groupes étudiés et aucune des signatures proposées n'était validée dans notre population. De plus, dans la majorité des études disponibles, les données cliniques et histopathologiques n 'étaient pas renseignées, avec un risque important de biais de confusion. Enfin, plusieurs signatures ont été développées à partir de données du TCGA pour lesquelles les détails de la prise en charge chirurgicale et les données cliniques sont limités. **Il est donc encore nécessaire d'approfondir la recherche d'une telle signature en prenant en compte les données cliniques initialement disponibles.**

5.2 Objectif final de l'étude

Bien que le recours à l'analyse moléculaire combinée aux données de la clinique semble prometteuse pour prédire l'envahissement ganglionnaire, aucune étude développant une signature spécifique n'est à ce jour disponible. **L'objectif de notre travail est donc d'identifier une signature moléculaire, à l'aide de la méthode du séquençage des ARN, permettant de prédire l'envahissement ganglionnaire dans les carcinomes endométrioïdes de l'endomètre en vue d'adapter au cas par cas le geste chirurgical.**
La première étape de ce travail était de décrire les gènes différentiellement exprimés entre les patients ayant ou non des métastases ganglionnaires et pouvant constituer des gènes d'intérêt pour une éventuelle signature. Cet objectif préliminaire est celui de l'article présenté dans la suite de ce travail, les perspectives en vue de réalisation de l'objectif final sont détaillées dans la dernière partie.

5.3 Principe du RNA-sequencing

La méthode utilisée pour notre étude est celle du séquençage des ARN nouvelle génération (RNA-sequencing), disponible à l'Institut Bergonié, permettant une exhaustivité de screening pour les anomalies envisagées mais également pour celles n'ayant pas été anticipées. Cette technique de séquençage va s'attacher à étudier le transcriptome des cellules, c'est à dire l'ensemble des ARNs présents dans la cellule à un instant donné, reflétant l'expression des gènes. Il existe deux types de séquençage d'ARN, le séquençage ciblé, qui

permet de détecter les anomalies connues sur une liste définie de gènes, et le whole RNA sequencing, utilisé ici, qui permet d'identifier des transcrits de fusion sans connaissance préalable des partenaires ou de la localisation des points de cassures.

La technique de séquençage utilisée dans notre étude est la technique Illumina, réalisée après la préparation de la librairie et l'amplification en cluster. Elle peut être réalisée, comme dans le cas de notre analyse, à partir d'échantillons en blocs de paraffine (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded : FFPE), avec une quantité d'ARN nécessaire allant de 20ng à 100ng. Les étapes de préparation de la librairie sont résumées dans la figure 6. L'ARN est dans un premier temps transformé en ADN complémentaire (ADNc). Puis, des adaptateurs sont ensuite ajoutés aux extrémités et une première amplification par PCR est réalisée. Les produits PCR obtenus sont ensuite capturés à l'aide d'un couple sonde + bille, les sondes étant des oligonucléotides biotinylés couvrant 98.2% de l'exome. L'ensemble des ADNc capturées est alors à nouveau amplifié par PCR pour donner la librairie finale qui sera qualifiée et quantifiée.

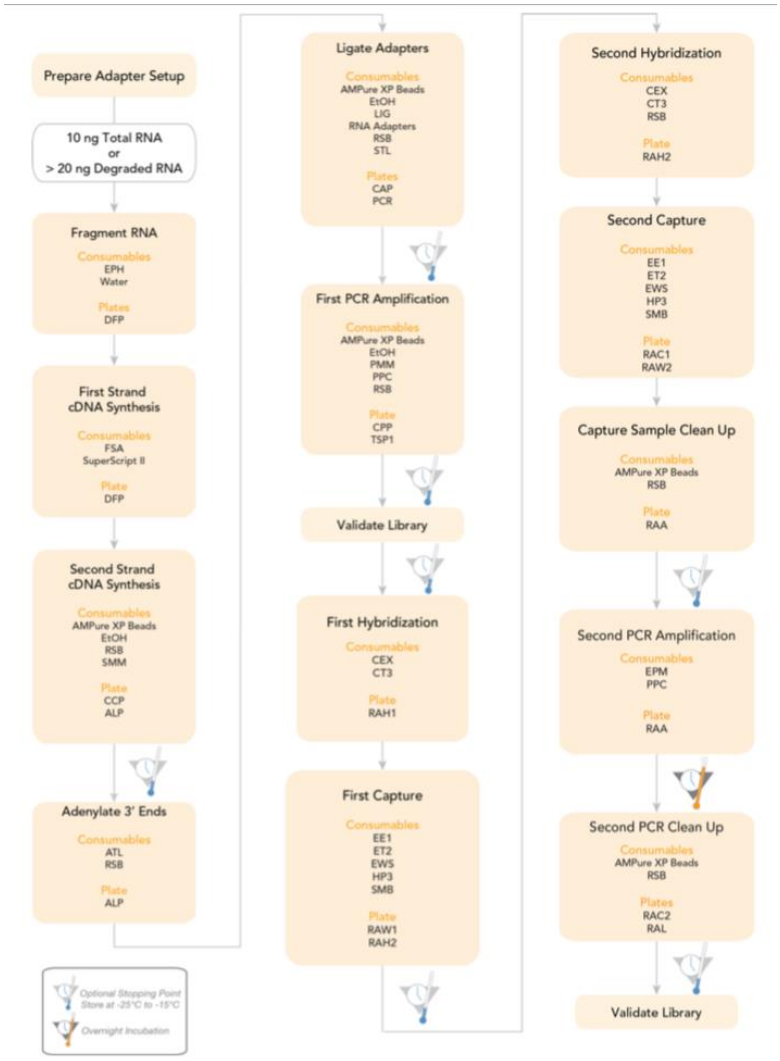


Figure 10. Étapes de préparation de la librairie. Issue de « *True Seq RNA Access Library Prep Guide* »

Le séquençage de la librairie sur le Nextseq 500 se décompose en une étape d'amplification par clusters où chaque cluster correspondant à un fragment amplifié de manière clonale et localisée. S'en suit le séquençage à proprement parler, avec l'utilisation de 4 terminateurs marqués à chaque cycle. La fluorescence émise par chaque cluster est mesurée à chaque cycle et permet d'identifier la base incorporée. Le brin séquencé après répétition de cette étape correspond à un *read*. Pour chaque fragment, nous avons une lecture de la séquence à chaque extrémité (paired-end) sur 75 paires de base. Ainsi, le séquençage à haut débit génère des millions de *read* par échantillon qui sont ensuite analysés par l'équipe bioinformatique.

6 Références

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. European Journal of Cancer. nov 2018;103:356-87.
2. SPF. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim [Internet]. [cité 16 janv 2021]. Disponible sur: /import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir
3. Lee NK, Cheung MK, Shin JY, Husain A, Teng NN, Berek JS, et al. Prognostic factors for uterine cancer in reproductive-aged women. Obstet Gynecol. mars 2007;109(3):655-62.
4. Creasman W, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn M, Beller U, Benedet J, et al. Carcinoma of the Corpus Uteri. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2006;95(S1):S105-43.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. nov 2018;68(6):394-424.
6. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. The Lancet. 12 mars 2016;387(10023):1094-108.
7. Mutch D, Denny L, Quinn M. Hereditary gynecologic cancers. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2014;124(3):189-92.
8. InfoCancer - ARCAGY-GINECO - Cancer du corps de l'utérus - Facteurs de risque - Les facteurs constitutionnels. Disponible sur: http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/cancers-feminins/cancer-du-corps-de-l-uterus/facteurs-de-risque/les-facteurs-constitutionnels.html/
9. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. févr 1983;15(1):10-7.
10. Genestie C, Leary A, Devouassoux M, Auguste A. Classification histologique et moléculaire des cancers de l'endomètre et leurs implications dans la thérapeutique. Bulletin du Cancer. déc 2017;104(12):1001-12.

11. Board WC of TE. Female Genital Tumours [Internet]. [cité 18 janv 2021]. Disponible sur: https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Female-Genital-Tumours-2020

12. Albertini A-F, Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Anatomopathologie des cancers de l'endomètre. Bulletin du Cancer. 1 janv 2012;99(1):7-12.

13. Guntupalli SR, Zighelboim I, Kizer NT, Zhang Q, Powell MA, Thaker PH, et al. Lymphovascular Space Invasion is an Independent Risk Factor for Nodal Disease and Poor Outcomes in Endometrioid Endometrial Cancer. Gynecol Oncol. janv 2012;124(1):31-5.

14. O'Brien DJ, Flannelly G, Mooney EE, Foley M. Lymphovascular space involvement in early stage well-differentiated endometrial cancer is associated with increased mortality. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 2009;116(7):991-4.

15. Vaizoglu F, Yuce K, Salman MC, Basaran D, Calis P, Ozgul N, et al. Lymphovascular space involvement is the sole independent predictor of lymph node metastasis in clinical early stage endometrial cancer. Arch Gynecol Obstet. 1 déc 2013;288(6):1391-7.

16. Bosse T, Peters EEM, Creutzberg CL, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Mens JWM, et al. Substantial lymph-vascular space invasion (LVSI) is a significant risk factor for recurrence in endometrial cancer – A pooled analysis of PORTEC 1 and 2 trials. European Journal of Cancer. 1 sept 2015;51(13):1742-50.

17. Bendifallah S, Canlorbe G, Collinet P, Arsène E, Huguet F, Coutant C, et al. Just how accurate are the major risk stratification systems for early-stage endometrial cancer? Br J Cancer. 3 mars 2015;112(5):793-801.

18. Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013;497(7447):67-73.

19. McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse T. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. The Journal of Pathology. 2018;244(5):538-49.

20. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature [Internet]. 2013 [cité 13 oct 2019]; Disponible sur: https://www.nature.com/articles/nature12113

21. Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. Histopathology. janv 2020;76(1):52-63.

22. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. Br J Cancer. juill 2015;113(2):299-310.

23. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, et al. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. Cancer. 2017;123(5):802-13.

24. Kommoss S, McConechy MK, Kommoss F, Leung S, Bunz A, Magrill J, et al. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. Annals of Oncology. mai 2018;29(5):1180-8.

25. Bosse T, Nout RA, McAlpine JN, McConechy MK, Britton H, Hussein Y, et al. Molecular classification of grade 3 endometrioid endometrial cancers identifies distinct prognostic subgroups. Am

J Surg Pathol. mai 2018;42(5):561-8.
26. Leon-Castillo A, de Boer SM, Powell ME, Milheshkin L, MacKay HJ, Leary A, et al. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. J Clin Oncol. 10 oct 2020;38(29):3388-97.
27. Stelloo E, Bosse T, Nout RA, MacKay HJ, Church DN, Nijman HW, et al. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. Mod Pathol. juin 2015;28(6):836-44.
28. Nout R, Smit V, Putter H, Jürgenliemk-Schulz I, Jobsen J, Lutgens L, et al. Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial. The Lancet. mars 2010;375(9717):816-23.
29. Creutzberg CL, Wárlám-Rodenhuis CC, van de Steen-Banasik E, Beerman H, van Lent M. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. THE LANCET. 2000;355:8.
30. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, Jürgenliemk-Schulz IJ, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer—Combined Analysis of the PORTEC Cohorts. Clin Cancer Res. 15 août 2016;22(16):4215-24.
31. Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, Cibula D, Mirza MR, Marnitz S, et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. Int J Gynecol Cancer. janv 2021;31(1):12-39.
32. Zeimet AG, Reimer D, Huszar M, Winterhoff B, Puistola U, Abdel Azim S, et al. L1CAM in Early-Stage Type I Endometrial Cancer: Results of a Large Multicenter Evaluation. J Natl Cancer Inst. 7 août 2013;105(15):1142-50.
33. Kommoss FK, Karnezis AN, Kommoss F, Talhouk A, Taran F-A, Staebler A, et al. L1CAM further stratifies endometrial carcinoma patients with no specific molecular risk profile. Br J Cancer. août 2018;119(4):480-6.
34. Kurnit KC, Kim G, Fellman BM, Urbauer D, Mills GB, Zhang W, et al. CTNNB1 (beta-catenin) mutation identifies low grade, early stage endometrial cancer patients at increased risk of recurrence. Mod Pathol. juill 2017;30(7):1032-41.
35. De Leo A, de Biase D, Lenzi J, Barbero G, Turchetti D, Grillini M, et al. ARID1A and CTNNB1/β-Catenin Molecular Status Affects the Clinicopathologic Features and Prognosis of Endometrial Carcinoma: Implications for an Improved Surrogate Molecular Classification. Cancers. 25 févr 2021;13(5):950.
36. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, et al. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. International Journal of Gynecologic Cancer. 1 janv 2016;26(1):2-30.
37. Querleu D, Darai E, Lecuru F, Rafii A, Chereau E, Collinet P, et al. Prise en charge primaire des cancers de l'endomètre : recommandations SFOG-CNGOF. Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie. déc 2017;45(12):715-25.
38. Bendifallah S, Canlorbe G, Arsène E, Collinet P, Huguet F, Coutant C, et al. French Multicenter

Study Evaluating the Risk of Lymph Node Metastases in Early-Stage Endometrial Cancer: Contribution of a Risk Scoring System. Ann Surg Oncol. 1 août 2015;22(8):2722-8.

39. Bendifallah S, Canlorbe G, Raimond E, Hudry D, Coutant C, Graesslin O, et al. External validation of nomograms designed to predict lymphatic dissemination in patients with early-stage endometrioid endometrial cancer: a multicenter study. American Journal of Obstetrics and Gynecology. janv 2015;212(1):56.e1-56.e7.

40. Padilla-Iserte P, Lago V, Tauste C, Díaz-Feijoo B, Gil-Moreno A, Oliver R, et al. Impact of uterine manipulator on oncological outcome in endometrial cancer surgery. American Journal of Obstetrics and Gynecology. janv 2021;224(1):65.e1-65.e11.

41. de Boer SM, Powell ME, Mileshkin L, Katsaros D, Bessette P, Haie-Meder C, et al. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): final results of an international, open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. The Lancet Oncology. mars 2018;19(3):295-309.

42. Querleu D, Leblanc E, Morice P, Ferron G. Curage ganglionnaire ilio-obturateur. In: Chirurgie des cancers gynécologiques. Elsevier Masson. 2014.

43. Leblanc E, Querleu D, Narducci F, Cartron G. Technique des lymphadénectomies pelviennes laparoscopiques. EMC - Gynécologie-Obstétrique. nov 2005;2(4):401-8.

44. Akladios C, Ronzino V, Schrot-Sanyan S, Afors K, Fernandes R, Baldauf JJ, et al. Comparison Between Transperitoneal and Extraperitoneal Laparoscopic Paraaortic Lymphadenectomy in Gynecologic Malignancies. Journal of Minimally Invasive Gynecology. 1 févr 2015;22(2):268-74.

45. Querleu D, Ferron G, Leblanc E. Lymphadénectomie lomboaortique dans les cancers gynécologiques. EMC - Gynécologie-Obstétrique. mai 2005;2(2):137-43.

46. Lecuru F, Bats A-S, Bensaid C, Achouri A, Nos C, Faraggi M, et al. Technique et résultats du prélèvement du ganglion sentinelle dans les cancers du col et du corps de l'utérus. EMC - Techniques chirurgicales - Gynécologie. oct 2012;7(1):1-10.

47. Rozenholc A, Samouelian V, Warkus T, Gauthier P, Provencher D, Sauthier P, et al. Green versus blue: Randomized controlled trial comparing indocyanine green with methylene blue for sentinel lymph node detection in endometrial cancer. Gynecologic Oncology. juin 2019;153(3):500-4.

48. Rossi EC, Kowalski LD, Scalici J, Cantrell L, Schuler K, Hanna RK, et al. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study. The Lancet Oncology. mars 2017;18(3):384-92.

49. Ballester M, Dubernard G, Lécuru F, Heitz D, Mathevet P, Marret H, et al. Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: a prospective multicentre study (SENTI-ENDO). The Lancet Oncology. 1 mai 2011;12(5):469-76.

50. Daraï E, Dubernard G, Bats A-S, Heitz D, Mathevet P, Marret H, et al. Sentinel node biopsy for the management of early stage endometrial cancer: Long-term results of the SENTI-ENDO study. Gynecologic Oncology. janv 2015;136(1):54-9.

51. Baiocchi G, Mantoan H, Kumagai LY, Gonçalves BT, Badiglian-Filho L, de Oliveira Menezes AN, et al. The Impact of Sentinel Node-Mapping in Staging High-Risk Endometrial Cancer. Ann Surg Oncol. 1 déc 2017;24(13):3981-7.

52. Persson J, Salehi S, Bollino M, Lönnerfors C, Falconer H, Geppert B. Pelvic Sentinel lymph node detection in High-Risk Endometrial Cancer (SHREC-trial)—the final step towards a paradigm shift in surgical staging. European Journal of Cancer. juill 2019;116:77-85.

53. Cusimano MC, Vicus D, Pulman K, Maganti M, Bernardini MQ, Bouchard-Fortier G, et al. Assessment of Sentinel Lymph Node Biopsy vs Lymphadenectomy for Intermediate- and High-Grade Endometrial Cancer Staging. JAMA Surg. févr 2021;156(2):1-8.

54. Cartron G, Leblanc E, Ferron G, Martel P, Narducci F, Querleu D. Complications des lymphadénectomies cœlioscopiques en oncologie gynécologique : 1102 interventions chez 915 patientes. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. mai 2005;33(5):304-14.

55. Frost JA, Webster KE, Bryant A, Morrison J. Lymphadenectomy for the management of endometrial cancer. Cochrane Database Syst Rev. 21 sept 2015;2015(9):CD007585.

56. Yost KJ, Cheville AL, Al-Hilli MM, Mariani A, Barrette BA, McGree ME, et al. Lymphedema After Surgery for Endometrial Cancer: Prevalence, Risk Factors, and Quality of Life. Obstetrics & Gynecology. août 2014;124(2, PART 1):307-15.

57. Cibula D, Borčinová M, Marnitz S, Jarkovský J, Klát J, Pilka R, et al. Lower-Limb Lymphedema after Sentinel Lymph Node Biopsy in Cervical Cancer Patients. Cancers (Basel) [Internet]. 13 mai 2021 [cité 3 juill 2021];13(10). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8153612/

58. Leitao MM, Zhou QC, Gomez-Hidalgo NR, Iasonos A, Baser R, Mezzancello M, et al. Patient-reported outcomes after surgery for endometrial carcinoma: Prevalence of lower-extremity lymphedema after sentinel lymph node mapping versus lymphadenectomy. Gynecologic Oncology. janv 2020;156(1):147-53.

59. ASTEC study group, Kitchener H, Swart A, Qian Q, Parmar M, Amos C. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. Lancet. 10 janv 2009;373(9658):125-36.

60. Stelloo E, Nout RA, Naves LCLM, ter Haar NT, Creutzberg CL, Smit VTHBM, et al. High concordance of molecular tumor alterations between pre-operative curettage and hysterectomy specimens in patients with endometrial carcinoma. Gynecologic Oncology. mai 2014;133(2):197-204.

61. Bou Zgheib N, Marchion DC, Bush SH, Judson PL, Wenham RM, Apte SM, et al. Molecular determinants for lymph node metastasis in clinically early-stage endometrial cancer. Oncology Letters. janv 2016;11(1):323-9.

62. Kang S, Thompson Z, McClung EC, Abdallah R, Lee JK, Gonzalez-Bosquet J, et al. Gene Expression Signature-Based Prediction of Lymph Node Metastasis in Patients With Endometrioid Endometrial Cancer: International Journal of Gynecological Cancer. févr 2018;28(2):260-6.

63. Huang C-Y, Liao K-W, Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chiew M-Y, et al. Pilot Study to Establish a Novel Five-Gene Biomarker Panel for Predicting Lymph Node Metastasis in Patients With Early Stage Endometrial Cancer. Front Oncol. 21 janv 2020;9:1508.

Partie 2. Article

Biomarkers associated with lymph nodal metastasis in Endometrioid Endometrial Carcinoma

Authors: **Mathilde Mairé[1,2], Aurélien Bourdon[3], Isabelle Soubeyran[4], Carlo Lucchesi[3], Guillaume Babin[2], Jessica Massière[5], Denis Querleu[2], Sabrina Croce[4]**

[1] Université de Bordeaux 146 rue Léo Saignat 33000 Bordeaux

[2] Department of Surgery, Institut Bergonié, Bordeaux, France

[3] Department of Bioinformatics, Institut Bergonié, Bordeaux, France.

[4] Department of Biopathology, Institut Bergonie, Bordeaux, France

[5] INSERM U1218, Bordeaux, France; Research Department, Institut Bergonié, Bordeaux, France.

Keywords: endometrial cancer, lymph node metastasis, RNA sequencing, prediction model

Abstract

Introduction. Endometrial cancer is the most common gynecological tumor in developed countries. Lymph node metastasis is a key determinant of the prognosis and treatment of endometrioid endometrial cancer (EEC) but lymphadenectomy is associated with an increased risk of surgery related systemic morbidity and lymphoedema. Currently, the risk of lymphatic spread is assessed preoperatively using clinical and histological factors but none of them are perfectly accurate. Additional tools including highly specific and sensitive molecular biomarkers are needed to select the women for whom complete surgical staging should be performed to adapt adjuvant therapy.

Objective. In this study, we describe the differential pathway landscape associated with lymph node metastases in EEC after whole RNA sequencing. This study is the first step to explore the genes of interest in order to develop a gene signature predictive of lymph node involvement.

Methods. We conducted a monocentric retrospective study at Institut Bergonie, Bordeaux, France. Selected patients were treated for a non-metastatic EEC between 2010 and 2017; with pathological tissue available and lymph nodes evaluation performed. Slides of the 56 selected patients were reviewed by a gynecopathologist and EEC were matched 1:1 between N+ and N- according to definitive tumoral size, tumoral grade and myometrial invasion. Paraffin-Embedded (FFPE) tissue samples, after macrodissection of the areas of interest, were used for whole RNA-sequencing. Only tumoral tissues were used for extraction. All RNA extraction, sequencing and data analysis were performed at the Institut Bergonie, Bordeaux.

Results. Among 31 selected tumors 28 EEC were analyzable after RNA sequencing (16 N+ and 12 N-). Unsupervised analysis revealed 3 distinctive patterns of expression (one with only N+ patient, one enriched with mainly N- patients and one with a mix of patients). The cluster with only N+ patient tended to overexpress three specific pathways: Extra cellular Matrix (ECM), Epithelial to Mesenchymal (EMT) and Smooth Muscle Contraction (SMC). Curated unsupervised analysis of differentially expressed genes between N+ and N- patients permitted to generate a 54 genes signature with an accuracy of 80% in the development population.

Conclusion. This RNA-expression profile may provide a basis for further study to develop a potential gene expression-based signature that could pre-operatively assess lymph node invasion and plan adjuvant therapy without lymphadenectomy.

Introduction

Endometrial cancer is the most common gynecological tumor in developed countries(1), and was the fourth most frequently diagnosed neoplasm in European women in 2018 (122,000 cases; 6.6%) (2). Although the majority of women present with early stage cancer and have a favorable prognosis, 25% present with stage III or IV disease and impaired disease-free survival (3).

Management of endometrial cancer consists in primary hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy with or without lymph node staging depending on pre-operative risk classification (4). According to recently published European guidelines, the type of lymph node dissection (sentinel lymph node biopsy, pelvic lymphadenectomy and para-aortic lymphadenectomy) depends on the pre-operative risk assessment. In particular in case of stage III tumour, only enlarged lymph nodes should be resected but systematic lymphadenectomy is not recommended (4). No evidence of benefit in terms of survival has yet been associated with systematic lymphadenectomy(5). Morbidities associated with lymph node dissection include surgery-related systemic morbidity and lymphoedema/lymphocyst formation(6). Although morbidity appears to be reduced with sentinel lymph node biopsy, women remains at risk of surgical complications during the node dissection and of post-operative lymphoedema (7,8).

At present, the risk of lymphatic spread is assessed using tumor invasion depth, tumor grade, tumor size and histotype. But those clinical risk factors suffer some limits: histological grade and histotype suffer from inter-observers variation and the diagnostic performance of the imaging techniques is not ideal for the prediction of myometrial invasion (9–11). None of them can accurately predict lymph node invasion.

Recent advances in molecular characterization of endometrial cancer (12) have provided important insight into the biological nature of tumors. Different groups have applied a diagnostic algorithm using three immunohistochemical markers (p53, MSH6 and PMS2) and one molecular test (mutation of the exonuclease domain of *POLE*) to identify prognostic groups analogous to the TCGA molecular-based classification (13,14). Thus far, molecular subgroups have been demonstrated to improve the prediction of survival outcomes but were not identified as independent predictors of stage IIIC-IV disease (15).

Hence additional tools including highly specific and sensitive molecular biomarkers are needed to select the women for whom complete surgical staging should be performed to adapt adjuvant therapy. Whole RNA-sequencing is an essential part of throughput sequencing, it provides biological information on intratumor expression (16).

In this study, we used whole RNA sequencing to describe the differential pathway landscape associated with lymph node metastases in endometroid endometrial carcinomas.

This study is the first step to explore the genes of interest in order to develop a gene signature predictive of lymph node involvement.

Methods

Patients selection

We conducted a monocentric retrospective study at Institut Bergonie, Comprehensive Cancer Center, Bordeaux, France. Patients were selected from a database of cases presented in multidisciplinary tumor board from January 2010 to February 2017 for non-metastatic endometrial cancer. We included patients aged over 18 years with an initial surgery performed at Institut Bergonie, pathological tissue available and confirmed diagnosis of endometrioid endometrial carcinoma. Only patients who received a complete surgical staging surgery with total hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, and lymph node evaluation with either bilateral pelvic lymph node dissection with or without para-aortic lymphadenectomy or sentinel-node biopsy were included. Exclusion criteria were non endometrioid carcinoma or metastatic cancer.

Information regarding patient's characteristics, pre-operative tumor characteristics, type of surgery, definitive tumoral staging, adjuvants therapy and outcomes were collected retrospectively from medical records and entered into a REDCAP database after anonymization.

All patients were informed of the use of their biospecimens for research purposes and their ability to oppose to it.

Histopathological assessment and molecular features

The slides of selected patients were reviewed by a gynecopathologist (SC) in the Center to confirm the histological subtype, the tumor grade, the presence of lymphovascular invasion stromal reaction, MELF pattern and the dept of invasion (according the 5th edition of female genital tumors (17)). Substantial lymphovascular invasion (LVSI) was defined by the presence of tumor cells in five or more lymphovascular spaces (4).

For each patient, the tumor rich area was selected for RNA-extraction by microdissection. For each case the MMR protein status and p53 expression were evaluated by immunohistochemistry (18,19). MMR protein status was considered deficient (MMR-D) when a complete loss of nuclear expression was observed in carcinoma cells of one or more MMR protein (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) detected in immunochemistry (IHC). A weak/patchy/cytoplasmic/punctate or dot-like nuclear pattern was considered as abnormal MMR expression (20). A particular attention was reserved for subclonal/heterogeneous pattern of MMR staining abnormality. MMR protein status was already available for 10 patients, IHC

analysis were performed at the time of diagnosis, and 4 of them had also molecular analyses for the microsatellite status (MSI-test) available. For patients whose MMR protein status was not available, we carried out a posteriori analysis.

Aberrant p53 staining (p53abn) was defined as 1) in case of strong and diffuse nuclear staining (p53 strong), 2) or completely negative staining (P53 absent) 3) cytoplasmic and nuclear pattern in carcinoma cells (18). As positive internal control was used the normal myometrium or normal endometrium; as external control were used a case of serous carcinoma with *TP53* mutation with overexpression and a case of serous carcinoma with a *TP53* mutation with p53 absent and a normal tonsilla. Because the *POLE* mutation screening was not available in routine practice at the time of the diagnosis, we screened for 11 known *POLE* hotspots mutation by RNAsequencing (on cDNA) (21).

Patients were classified in two groups according to lymph node involvement. In order to avoid any bias for the known factors associated with lymph node metastasis and available before surgery, each patient with confirmed lymph node metastases was matched to a control patient without lymph node metastases with similar definitive tumoral size (0-20mm, 20-35mm and over 35mm), tumoral grade and myometrial invasion (less than 50% or over 50%). Definitive tumoral size was available from initial pathological record and tumoral grade and myometrial invasion were issued of pathological review. Because it is usually non-available before surgery, lymphovascular invasion was not used in the matching protocol.

Matching and initial statistical analysis

All initial statistical analysis was performed on SAS Pro and R version 3.6.1. Patients were matched 1:1 between N+ and N- according to definitive tumoral size (0-20mm, 20-35mm and over 35mm), tumoral grade (FIGO 1, 2 or 3) and myometrial invasion (less than 50% or over 50%). For each case, only 2 to 3 control were available. Three samples with lymph node metastases had no matching pair found in the control group but were conserved for RNA extraction. Quantitative variables are presented as mean with standard deviation and were compared using t-test. Qualitative variables are presented as percentages and compared using Chi-2 or Fisher test.

RNA sequencing

Paraffin-Embedded (FFPE) tissue samples, selected by the pathologist were used for whole RNA-sequencing. Only tumoral tissues were used for extraction. All RNA extraction, sequencing and data analysis were performed at the Institut Bergonie, Bordeaux. Extraction of RNA was realized with Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (Promega). Library preparations were performed according to the True Seq RNA Exome Library Prep Guide, Illumina and then sequenced (2x75bp, paired-end) in a Nextseq 500 sequencer, Illumina.

All analysis was performed at the Institut Bergonie.

NGS RNAseq sequence alignment and quality control pipeline

Raw RNAseq sequences were controlled for quality using a set of published tools to produce curated reads. Firstly, reads with low quality bases at 5' and 3' were trimmed using the Sickle package (Phred cut off 20, max trim size 30 nc) (22). The SeqPrep package was used to remove sequencing adaptors from raw reads(24). This package also detected an important proportion of RNA fragments whose R1 and R2 paired-end reads were overlapping and merged them into single-end reads. To keep exploiting those fragments, a home-made python script was developed that split those merged reads into new non-overlapping R1 and R2 paired-end reads. Curated reads were aligned using TOPHAT2 (aka BOWTIE2) on both the UCSC hg19 reference genome and transcriptome(25). Finally, we applied a post-alignment quality control of aligned reads by removing reads with mapping scores lower than 20 using Samtools (26). PCR duplicate reads were identified and removed using Picard MarkDuplicates (https://broadinstitute.github.io). Read counts were performed using the Python module HTSeq (27). To control RNASeq FFPE coverage we used a homemade method regarding for each samples the curated coverage (in million reads) across the number of genes with 0 reads coverage. If the number of genes with 0 coverage is superior than the curated coverage, the samples is removed of the dataset.

Differential analysis

Transcript count data were normalized according the VOOM method, which transforms raw count values to log2-counts per million (logCPM), estimates the mean-variance relationship and uses this relationship to compute appropriate observational-level weights (28). The RNAseq differential gene expression between groups of samples was performed using the statistical t-test from the R package LIMMA, which calculates fold changes and nominal p-values related to each gene starting from raw expression values and the normalization weights produced by VOOM (29). The set of nominal p-values from each test were adjusted according to the Benjamini-Hochberg adjustment (30). We defined the significantly up- or down-regulated transcripts using an FDR threshold of 0.05. The fold-change used to further filter the differential gene expression was set to a minimum value of 2.

To obtain discriminant gene expression signature between two groups of samples we used the shrunken centroids method (pamr R package) from Tibshirani and al (31).

Gene Set-Enrichment Analysis

MSigDB (32) was used to identify pathways or gene ontologies in which the genes of an identified group were enriched. Oncogene and Tumor Suppressor Gene status

(approximately 800 known genes) was assigned according to the annotation in Cancer Gene Panel (33,34).

Mutations Analysis

Production of raw genetic alteration files (.vcf/.bcf) was performed via Samtools/Bcftools with a quality cut-off per base of Phred 20. Calculation of the number of aligned reads covering each exon was performed via HtSeq. Quality reports of raw reads were built with FastQC (FastQC - https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Annotation of SNV and InDel genetic variants was reported by Annovar (35)

Unsupervised Clustering

Unsupervised clustering analysis of RNA-Sequencing expression data was performed using agglomerative hierarchical clustering with distance criteria (1-Pearson_Correlation) and linkage criteria equal to average via the function hclust available in R (36). We performed iteratively this procedure on subset of genes with increasing variability based on their standard deviation. The choice of the number of genes to use for freezing the clustering configuration was determined empirically as follows. For each clustering performed at a given standard deviation cut-off, we measured the anti-correlation between the 2 groups placed at the highest level in the clustering hierarchy. We assumed that clustering with anti-correlations close to 0 were associated with grouping by chance between samples. We selected the SD cutoff for which sample anti-correlation was at the lowest negative level whilst the number of genes left was no less than 3000. This procedure was meant to remove genes with weak variability that could bias clustering via spurious random correlations and at the same time assuring that sample grouping was determined by the largest as possible number of genes. To assess the robustness of clustering results at a given SD threshold, we performed consensus clustering via the package ConsensusClusteringPlus available in BioConductor (37). Consensus was established after 10,000 iterations on the subset of samples obtained by leave-n-out of 40% of samples.

Results

Patients and clinical characteristics

Of the 380 patients with non-metastatic endometrial cancer presented in multidisciplinary committee during the study period, 290 had endometrioid endometrial carcinoma (EEC). Thirty-five patients (12,1%) had lymph node metastasis (N+) and among them, 17 had surgery at Institute Bergonie. Thirty-nine patients without lymph node metastases (N-) had their primary surgery with lymph node dissection in Bergonie. Three samples with lymph node involvement couldn't be paired to a control but were included in the final population (**Figure 1**).

Finally, RNA extraction was performed for 31 tumor samples (14 N- and 17 N+). Three of them were not interpretable because of lack of a sufficient coverage for the analyses and were excluded after quality control. Gene expression of 16 patients with lymph node involvement and 12 without lymph node involvement was analyzed.

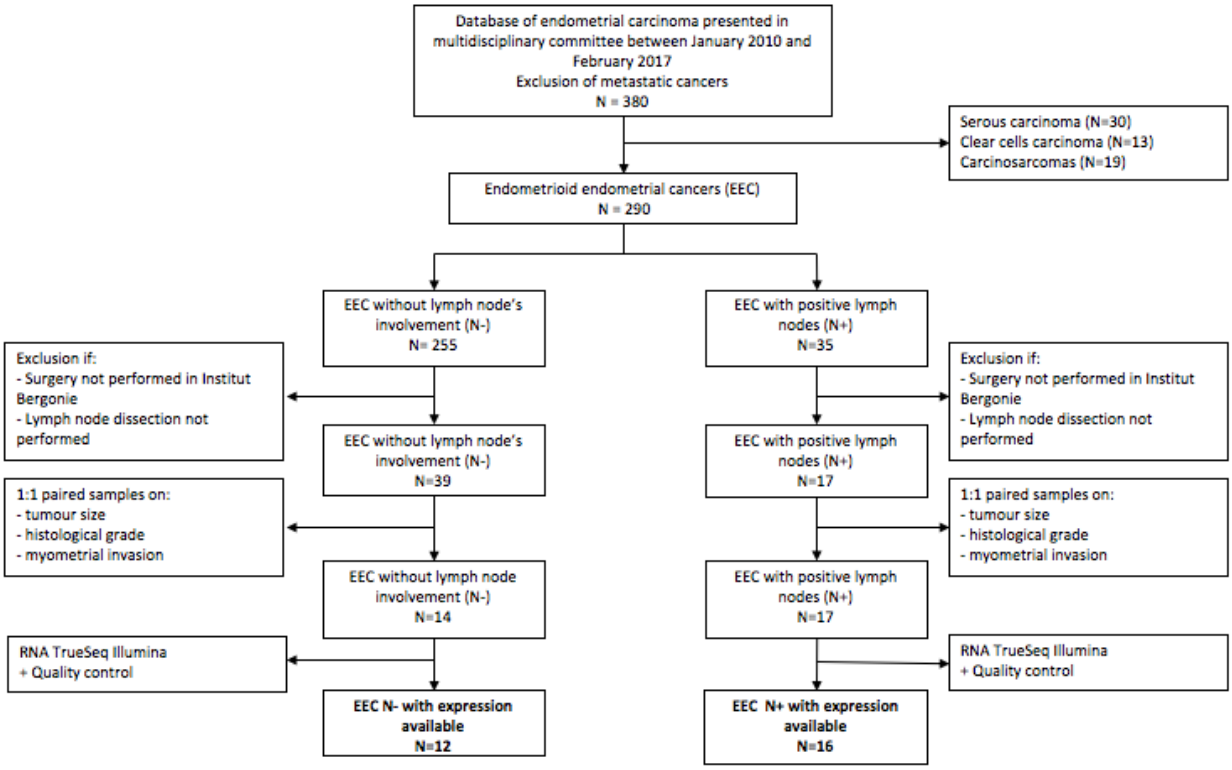


Figure 1. Flow chart, Institut Bergonie, France, 2010-2017

Patient's clinical characteristics are shown in **Table 1**. Patients with (N+) and without (N-) lymph node metastases weren't different for age at diagnosis, body mass index, menopausal status and smoking status. Four patients (33.3%) in N- group and 10 (62.5%) in N+ group underwent pelvic and para-aortic lymphadenectomy, and 7 (58.9%) patients

underwent isolated pelvic lymphadenectomy in N- group and 3 (18.8%) in N+ group. Justification for no para-aortic lymphadenectomy was often mentioned as patient's comorbidities. A mean of 15 pelvic lymph nodes and 18 para-aortic were usually removed in the population, and laparoscopic surgery was the preferred technique.

Table 1. Clinical characteristics of EEC without lymph node involvement (N=12) and with lymph node involvement (N=16), Institute Bergonie, 2010-2017

Characteristics	**EEC with negative lymph nodes (N=12)**		**EEC with positive lymph nodes (N=16)**	
	n (%)	Mean (SD)	n (%)	Mean (SD)
Patient's characteristics				
Age at diagnosis		63.2 (10.7)		67.8 (6.9)
Comorbidities				
Cardiovascular disease	4 (33.3)		7 (43.8)	
History of cancer	2 (16.7)		2 (12.5)	
Thyroid pathology	3 (25.0)		4 (25.0)	
Chronic renal failure	1 (8.3)		0 (0.0)	
Diabetes	1 (8.3)		1 (6.2)	
Pulmonary pathology	1 (8.3)		0 (0.0)	
Neurological pathology	1 (8.3)		0 (0.0)	
Menopaused at diagnosis	10 (83.3)		16 (100.0)	
Smokers	2 (16.7)		1 (7.7)	
Body mass index (kg/m^2)		26.3 (5.7)		28.2 (5.9)
Surgical characteristics				
Type of initial surgery				
Laparoscopic surgery	9 (75.0)		10 (62.5)	
Open surgery	3 (25.0)		6 (37.5)	
Initial lymph node staging				
Sentinel lymph node biopsy	1 (8.3)		1 (6.2)	
Pelvic and para-aortic lymphadenectomy	4 (33.3)		10 (62.5)	
Pelvic lymphadectomy alone	7 (58.3)		3 (18.8)	
No initial lymph node dissection	0 (0.0)		1 (6.2)	
Digestive resection	0 (0.0)		2 (12.5)	
Omentectomy	4 (33.3)		7 (43.8)	
Surgical re-staging	1 (8.3)		4 (25.0)	
Proportion of removed pelvic lymph nodes		14 (8.9)		16 (7.0)
Proportion of removed para-aortic lymph nodes		22 (8.3)		15 (11.1)

Patient's histological and molecular classification

Comparison of histopathological and molecular patterns between the two groups are presented in **Table 2** and details for each patient are available on **Supplementary data 1**. Our study population was paired on tumour size, histological grade and myometrial invasion. Mean tumor size was 46.8 mm in N- group and 50.1mm in N+ group, 20 EEC (71.4%) of the global population had high histological grade and 18 (64.3%) had important myometrial invasion. Angioinvasions were more frequent when lymph node metastases, 9 patients (56.2) in the N+ patients had substantial lymphovascular invasion versus only 2 patients (16.7%) in N- group (p=0.013). MELF pattern was also more often described in N+ group (62.5% versus 25.0 %

in N- group) but this different was not statistically significative (p=0.07). Stromal invasion, peri nervous invasion and inflammatory infiltration were not different between the two groups.

Table 2. Comparison of histopathological characteristics and molecular patterns of EEC without lymph node involvement (N=12) and with lymph node involvement (N=16), Institut Bergonie, 2010-2017

Pathological characteristics	**EEC with negative lymph nodes (N=12)**		**EEC with positive lymph nodes (N=16)**		
	n (%)	Mean (SD)	n (%)	Mean (SD)	**p-value**[1]
Tumoral size		46.8 (22.5)		50.1 (25.9)	0.7
Histological grade					0.9
Low grade (grade 1 & grade 2)	3 (25.0)		5 (31.2)		
High grade (grade 3)	9 (75.0)		11 (68.8)		
Myometrial invasion					0.9
≤ 50%	4 (33.3)		6 (37.5)		
> 50%	8 (66.7)		10 (62.5)		
Angioinvasion					0.013
Absence	9 (75.0)		3 (18.8)		
Non-substantial	1 (8.3)		4 (25.0)		
Substantial	2 (16.7)		9 (56.2)		
Number of angioinvasion (if presence of angioinvasion)		3.9 (9.4)		7.2 (8.4)	0.3
Stromal Reaction					0.12
Presence	5 (41.7)		12 (75.0)		
Absence	7 (58.3)		4 (25.0)		
MELF pattern					0.07
Presence	3 (25.0)		10 (62.5)		
Absence	9 (75.0)		6 (37.5)		
Inflammatory infiltration					0.9
Presence	5 (41.7)		6 (37.5)		
Absence	7 (58.3)		10 (62.5)		
Peri nervous invasion					0.4
Presence	1 (8.3)		4 (25.0)		
Absence	11 (91.7)		12 (75.0)		
Molecular classification group (TCGA)					0.06
Ultramutated (*POLE* mutation)	0 (0.0)		0 (0.0)		
Hypermutated (MSI)	4 (33.3)		9 (56.2)		
Serous like (*TP53* mutation)	0 (0.0)		3 (18.8)		
Non specific molecular profile	8 (66.7)		4 (25.0)		
CTNNB1 mutation					0.1
Pathogenic mutation	5 (41.7)		2 (12.5)		
No pathogenic mutation	7 (58.3)		14 (87.5)		

[1] Fisher's exact test; Two Sample t-test

No pathogenic *POLE* mutation was found in our study population. Thirteen EEC where characterized by defective MMR and classified as hypermutated: 4 (33.3%) in N- group and 9 (56.2%) in N+ group. *TP53* pathogenic mutations were identified for 3 EEC, two of them had abnormal p53 staining pattern and one a normal wild type staining pattern. The 3 EEC classified as serous-like (with *TP53* mutation) were N+ patients. Molecular classification was not statistically different between the two groups.

Pathogenic mutation of CTNNB1 was identified in 5 (41.7%) N- patients and 2 (12.5%) N+ patients and was not statistically different between the two groups.

Unsupervised analysis

Supervised analysis between N+ and N- EEC found only 11 differentially expressed genes and was non-conclusive. Unsupervised analysis revealed three distinctive patterns of expression shown in **Figure 2**. Cluster A included 7 samples all with lymph node metastases, cluster B included 10 samples, 4 N- and 6 N+ and cluster C included 11 samples, 3 N+ and 8 N-. Histopathological characteristics in each pattern are presented in **Supplementary data 2**. Apart from the lymph node invasion, there was no statistically significant differences between the three clusters. We observed 1491 genes differentially expressed between clusters A and B, 1416 differentially expressed genes between clusters A and C and 956 between clusters B and C. A curated unsupervised analysis compared cluster A (N+) with cluster C (N-) after exclusion of the three samples with lymph node involvement and found 1047 differentially expressed genes. For the following analysis, cluster A is considered as N+ cluster, cluster C as N- and cluster B as mixed.

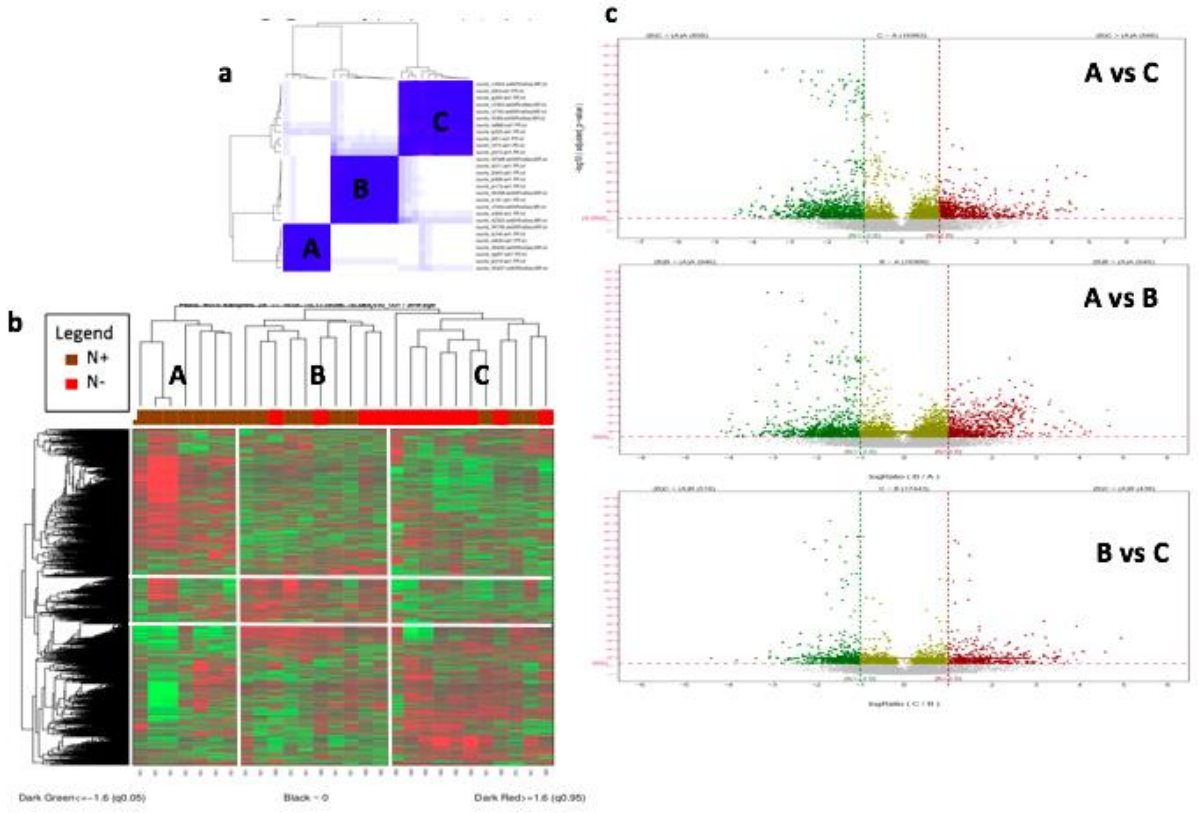


Figure 2 a. Unsupervised analysis of our population highlights 3 groups A (N=7), B (N (N=10) and C (N=11) **b.** Heatmap of differentially expressed genes between the 3 identified clusters (A, B and C) **c.** Volcano plots of up-regulated (red) and down-regulated (green) differentially expressed genes between the three clusters, Institut Bergonie, 2010-2017

Pathway analysis

Clusters comparison was performed using gene set enrichment analysis (32). Detailed result of each comparison is available in **supplementary data.** The successive comparison of the three clusters highlighted three overexpressed pathways in the cluster A (N+): Extra cellular Matrix (ECM), Epithelial to Mesenchymal (EMT) and Smooth Muscle Contraction (SMC). Two pathways tended to be overexpressed in cluster C (N-): Cell proliferation pathway and Beta cells genes. Cluster B (mixed N+ and N- samples) overexpressed Immunes cells and Cell death pathway. The summary of the pathway analysis is presented in **Figure 3.** Subsequently, for each of the three overexpressed pathway differential gene expression was further analyzed.

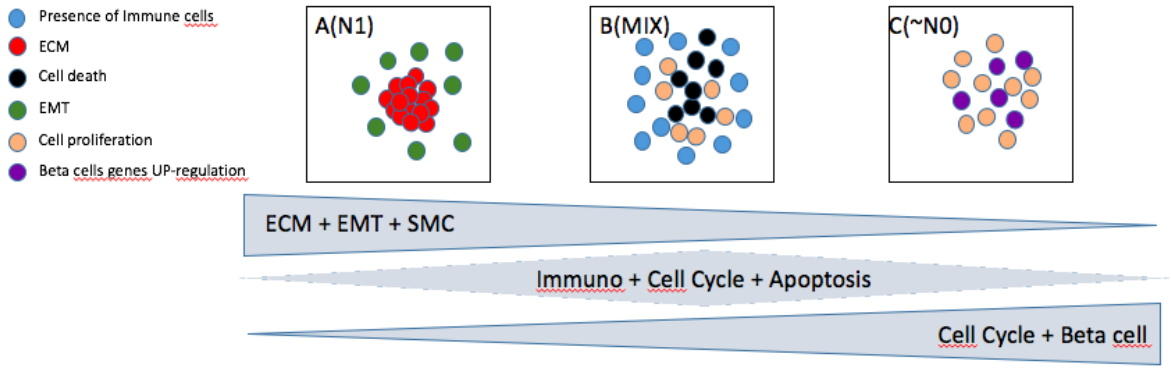


Figure 3. Summary pathway analysis differentially expressed between cluster A (N), cluster B (MIX) and cluster C (N-)

In Epithelial Mesenchymal Transition pathway, we found that compared to EEC without lymph node invasion, *MSX1* and *LAMA1* were down-regulated in N+ patients and *SFR4, DCN, CXCL2, FAP* were some of the up-regulated genes. In Extra Cellular Matrix pathway, we identified that in patients with lymph node invasion, *MUC2* was down regulated, and *COL4A3, SGCA, COL4A4 TNXB, MGP, EFEMP1* were some of the up regulated genes. In Smooth cells contraction pathway, part of the up-regulated genes in N+ samples were *MYH11, LMOD1, ACTG2, ACTA2*.

Potential gene signature

Curated unsupervised analyze found 1047 differentially expressed genes between N+ patients (cluster A) and N- patients (cluster C without 3 N+ patients). Thirty gene expression signatures were generated (31) with an accuracy of 80% in our groups A and C without N+ patients. Among them, a signature of 54 genes was selected, so as to reduce the number of discriminating genes as much as possible while keeping a robust signature in terms of

classification performance. Three of the selected genes were implied in EMT, 9 genes were implied in ECM and 5 in SMC.

Discussion

Lymph node involvement is an essential parameter at the basis of the clinical treatment of EEC which need to be more and more personalized.

We employed a genome-wide strategy in order to describe the molecular landscape associated with lymph node metastases. RNA-sequencing data were comprehensively analyzed to identify genes of interest for a potential molecular signature predictive of lymph node metastasis. Unsupervised analyses found three distinct clusters, two of them statistically different for lymph node involvement. Comparison of those two specific groups allowed us to identify three overexpressed pathways in patients with lymph node metastases and a potential gene signature for lymph node involvement of 54 genes with an accuracy of 80%.

In the study population, 12% of EEC presented with lymph node metastases and the major clinical and histologic difference between the two groups was lymphovascular space invasion (LVSI). In 2017 a Cochrane database review by Frost et al. noted that lymph node metastases were found in approximately 10% of women who before surgery were sought to have cancer confined to the womb (6). Substantial LVSI is the strongest prognostic factor for lymph node recurrence (38), but is not available on initial biopsy.

The three overexpressed pathways in groups with lymph node involvement are EMT, ECM and SMC, and these data are consistent with the literature. The ECM networks creates a microenvironment for cell growth and development, favorable for tumoral invasion (39). Smooth cell contraction pathway regroups genes that control interaction between cancer and stromal cells, found to have an impact on cancer invasion (40). Immune cells are known to shape immune environment in endometrial cancer and predict the prognosis (41). Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) has been identified as a principal component of tumour metastasis, by increasing the motility and invasiveness of cancer cells (42,43).

Especially, *MSX1* was found to be down-expressed in EEC with lymph node metastasis. The gene *MSX1* (Msh homeobox 1) encodes the homonymous protein MSX1, a transcription repressor, that has an inhibitory effect on the cell cycle (44). Eppich et al. found that higher *MSX1* expression (assessed by immunochemistry) correlates with improved long-term survival (44). In a study by Yang et al. the research team developed a nine-transcription factors prognostic signature and *MSX1* was one of them. However, the eight other genes from Yang's signature were not differentially expressed in our study. Furthermore, this study evaluated gene expressions associated with prognosis and not lymph node metastases and was developed with data from the TCGA, with all histologic types of EC.

Our study is focused on lymph node metastasis prediction. Huang et al. established a five-gene biomarkers panel for predicting lymph node metastasis in patients with early stage endometrial cancer (45). The research team identified eight differentially expressed genes between patients with and without lymph node involvement using machine learning technique. *MSX1* and *EYA2* were two of them, but the results were not significant enough and there were not in the final five-gene signature. Our study suggests that subjects with lymph node metastases tends to under-express *MSX1* and *EYA2*, and none of the final five genes was differentially expressed in our two groups. In their study Huang et al. used RNA-sequencing data from TCGA and a small panel of their own patient's samples. Multiple origins of samples, modalities of patient selection in TCGA, racial disparities could lead to differences between our two studies.

Other differentially expressed genes found in our study were previously described as associated with tumorigenesis or poor prognosis. Fibroblast Activation Protein (*FAP*) was significantly up regulated in EEC with lymph node metastasis. It had been described as predictive of poor prognosis in high-grade serous ovarian carcinomas (46). *MGP* (Matrix G1a protein) was up regulated in samples with lymph node metastasis and it's role of promoting proliferation, migration and transformation processes in triple negative breast cancer was assessed by Kong et al (47). *ACTGA* was also upregulated in our population N+, and was identified as a promoter of cells migration and tumor metastasis in hepatocellular cancer (48).

However, few studies tried to develop a gene signature for lymph node involvement but none found the same differentially expressed genes than we did in our study. Kang et al. developed in 2019 a 12 gene signature predicting lymph node metastasis with 100% sensibility and 41% specificity in the validation set (49). None of those 12 genes were differentially expressed in our groups. However, no information on other clinical predictors was available in this study and training and validation cohort had the same origin with a risk of overfitting. Other developed signatures were often developed using data from TCGA patients without information on surgical techniques of the center, fixation's delays, and clinical data(50–52). Those parameters (in particular the time of ischemia before the formol fixation) are critical and could dramatically affect the gene expression in endometrial cancer.

In the present study, we selected only patients whose surgery was performed in Institut Bergonie with guaranteed homogeneity in terms of surgical technique, samples processing in pathology laboratory. Our population was uniformly treated, with complete clinical data.
Interobserver variability exists in the diagnostic of EEC, in evaluation of uterine risk factors (myometrial invasion, histological grade) and in assessment of lymphovascular space invasion (53,54). Moreover, pathologic definitions and characterizations improved during the selection

period. The central review pathology of every elective patient, prior to matching prevented us from selection bias due to inter-observer variability.

Currently, lymph node invasion risk is assessed pre-operatively with tumor size, histological grade and myometrial invasion. Our study population of N+ patients were matched to N- patients with the same tumoral characteristics. This method ensures the comparability of our two study groups, to prevent confusion bias despite the limited effective.

This preliminary study to assess molecular markers of lymph node invasion focused on post-operative samples. Evaluation on molecular alteration in pre-operative endometrial specimen showed a high concordance with the definitive hysterectomy specimen (55).

Limitations of this study is the limited number of patients that wouldn't allow us to test and validate a gene expression signature. Our study focused mainly on potential biomarkers and pathways' description. Accuracy of the gene expression signature we selected is 80% in the development group. Training and validation of this signature are needed before we could use them in clinical practice.

Conclusion

In this study, we described the differential gene expression related to lymph node invasion. This RNA-expression profile may provide a basis for further study to develop a potential gene expression-based signature that could pre-operatively assess lymph node invasion and plan adjuvant therapy without lymphadenectomy. In order to assess reproducibility of our founding, we first will test our gene signature retrospectively in a completely different population. For example, the 24 patients (6 N+ and 18 N-) selected in the study by Huang et al. were selected with same criteria as our population. Expression data from those 24 patients are available and would permit to validate and adjust our gene signature. Eventually, an external validation in patients from other centers will be considered.

Acknowledgment

We received support from Institut Bergonie for this project. We thank V. Brouste from UREC for statistical analysis.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA A Cancer J Clin. 4 févr 2021;caac.21660.

2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. European Journal of Cancer. nov 2018;103:356-87.

3. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. The Lancet. 12 mars 2016;387(10023):1094-108.

4. Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, Cibula D, Mirza MR, Marnitz S, et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. Int J Gynecol Cancer. janv 2021;31(1):12-39.

5. ASTEC study group, Kitchener H, Swart A, Qian Q, Parmar M, Amos C. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. Lancet. 10 janv 2009;373(9658):125-36.

6. Frost JA, Webster KE, Bryant A, Morrison J. Lymphadenectomy for the management of endometrial cancer. Cochrane Database Syst Rev. 21 sept 2015;2015(9):CD007585.

7. Rossi EC, Kowalski LD, Scalici J, Cantrell L, Schuler K, Hanna RK, et al. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study. The Lancet Oncology. mars 2017;18(3):384-92.

8. Leitao MM, Zhou QC, Gomez-Hidalgo NR, Iasonos A, Baser R, Mezzancello M, et al. Patient-reported outcomes after surgery for endometrial carcinoma: Prevalence of lower-extremity lymphedema after sentinel lymph node mapping versus lymphadenectomy. Gynecologic Oncology. janv 2020;156(1):147-53.

9. McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse T. The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. The Journal of Pathology. 2018;244(5):538-49.

10. Bendifallah S, Canlorbe G, Collinet P, Arsène E, Huguet F, Coutant C, et al. Just how accurate are the major risk stratification systems for early-stage endometrial cancer? Br J Cancer. 3 mars 2015;112(5):793-801.

11. Antonsen SL, Jensen LN, Loft A, Berthelsen AK, Costa J, Tabor A, et al. MRI, PET/CT and ultrasound in the preoperative staging of endometrial cancer — A multicenter prospective comparative study. Gynecologic Oncology. 1 févr 2013;128(2):300-8.

12. Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013;497(7447):67-73.

13. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. Br J Cancer. juill 2015;113(2):299-310.

14. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, et al. Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. Cancer. 2017;123(5):802-13.

15. Kolehmainen AM, Pasanen AM, Koivisto-Korander RL, Bützow RC, Loukovaara MJ. Molecular characterization in the prediction of disease extent in endometrial carcinoma. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. janv 2021;256:478-83.

16. Hong M, Tao S, Zhang L, Diao L-T, Huang X, Huang S, et al. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. J Hematol Oncol [Internet]. 4 déc 2020 [cité 4 juill 2021];13. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7716291/

17. Board WC of TE. Female Genital Tumours [Internet]. [cité 18 janv 2021]. Disponible sur: https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Female-Genital-Tumours-2020

18. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. International Journal of Gynecological Pathology. janv 2019;38:S123-31.

19. Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, Nout RA, Creutzberg CL, Ruano D, et al. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. Annals of Oncology. janv 2017;28(1):96-102.

20. Singh N, Wong R, Tchrakian N, Allen S-G, Clarke B, Gilks B. Interpretation and Reporting Terminology for Mismatch Repair Protein Immunohistochemistry in Endometrial Cancer. :21.

21. León-Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommoss S, et al. Interpretation of somatic *POLE* mutations in endometrial carcinoma. J Pathol. mars 2020;250(3):323-35.

22. GitHub - najoshi/sickle: Windowed Adaptive Trimming for fastq files using quality [Internet]. GitHub. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://github.com/najoshi/sickle

23. najoshi. sickle: Windowed Adaptive Trimming for fastq files using quality [Internet]. 2017 [cité 27 sept 2017]. Disponible sur: https://github.com/najoshi/sickle

24. GitHub - jstjohn/SeqPrep: Tool for stripping adaptors and/or merging paired reads with overlap into single reads. [Internet]. GitHub. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://github.com/jstjohn/SeqPrep

25. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 4 mars 2012;9(4):357-9.

26. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 15 août 2009;25(16):2078-9.

27. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics. 15 janv 2015;31(2):166-9.

28. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. Genome Biol. 3 févr 2014;15(2):R29.

29. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Research. 20 avr 2015;43(7):e47-e47.

30. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological). 1995;57(1):289-300.

31. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. PNAS. 14 mai 2002;99(10):6567-72.

32. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 oct 2005;102(43):15545-50.

33. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Aldape K, Lu X, Manekia J, et al. Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours. Br J Cancer. 11 nov 2014;111(10):2014-23.

34. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. Science. 29 mars 2013;339(6127):1546-58.

35. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res. sept 2010;38(16):e164.

36. R Core Team (2020). — European Environment Agency [Internet]. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006

37. Wilkerson MD, Hayes DN. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking. Bioinformatics. 15 juin 2010;26(12):1572-3.

38. Bosse T, Peters EEM, Creutzberg CL, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Mens JWM, et al. Substantial lymph-vascular space invasion (LVSI) is a significant risk factor for recurrence in endometrial cancer – A pooled analysis of PORTEC 1 and 2 trials. European Journal of Cancer. 1 sept 2015;51(13):1742-50.

39. Yadav VK, Lee T-Y, Hsu JB-K, Huang H-D, Yang W-CV, Chang T-H. Computational analysis for identification of the extracellular matrix molecules involved in endometrial cancer progression. Nikitovic D, éditeur. PLoS ONE. 21 avr 2020;15(4):e0231594.

40. Tsukamoto H, Shibata K, Kajiyama H, Terauchi M, Nawa A, Kikkawa F. Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor–stromal interaction. Clin Exp Metastasis. 1 oct 2007;24(6):423-9.

41. Li B-L, Wan X-P. Prognostic significance of immune landscape in tumour microenvironment of endometrial cancer. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2020;24(14):7767-77.

42. Bilyk O, Coatham M, Jewer M, Postovit L-M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Female Reproductive Tract: From Normal Functioning to Disease Pathology. Front Oncol. 5 juill 2017;7:145.

43. Abal M, Llauradó M, Dolla A, Monge M, Colas E, González M, et al. Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. Clin Transl Oncol. mai 2007;9(5):272-7.

44. Eppich S, Kuhn C, Schmoeckel E, Mayr D, Mahner S, Jeschke U, et al. MSX1-A Potential Marker for Uterus-Preserving Therapy of Endometrial Carcinomas. Int J Mol Sci. 25 juin 2020;21(12).

45. Huang C-Y, Liao K-W, Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chiew M-Y, et al. Pilot Study to Establish a Novel Five-Gene Biomarker Panel for Predicting Lymph Node Metastasis in Patients With Early Stage Endometrial Cancer. Front Oncol. 21 janv 2020;9:1508.
46. Li M, Cheng X, Rong R, Gao Y, Tang X, Chen Y. High expression of fibroblast activation protein (FAP) predicts poor outcome in high-grade serous ovarian cancer. BMC Cancer. déc 2020;20(1):1032.
47. Gong C, Zou J, Zhang M, Zhang J, Xu S, Zhu S, et al. Upregulation of MGP by HOXC8 promotes the proliferation, migration, and EMT processes of triple-negative breast cancer. Molecular Carcinogenesis. 2019;58(10):1863-75.
48. Wu Y, Liu ZG, Shi MQ, Yu HZ, Jiang XY, Yang AH, et al. Identification of ACTG2 functions as a promoter gene in hepatocellular carcinoma cells migration and tumor metastasis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 16 sept 2017;491(2):537-44.
49. Kang S, Thompson Z, McClung EC, Abdallah R, Lee JK, Gonzalez-Bosquet J, et al. Gene Expression Signature-Based Prediction of Lymph Node Metastasis in Patients With Endometrioid Endometrial Cancer: International Journal of Gynecological Cancer. févr 2018;28(2):260-6.
50. Huang C-Y, Liao K-W, Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chiew M-Y, et al. Pilot Study to Establish a Novel Five-Gene Biomarker Panel for Predicting Lymph Node Metastasis in Patients With Early Stage Endometrial Cancer. Front Oncol [Internet]. 21 janv 2020 [cité 1 avr 2020];9. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6985442/
51. Bou Zgheib N, Marchion DC, Bush SH, Judson PL, Wenham RM, Apte SM, et al. Molecular determinants for lymph node metastasis in clinically early-stage endometrial cancer. Oncology Letters. janv 2016;11(1):323-9.
52. Yang X, Cheng Y, Li X, Zhou J, Dong Y, Shen B, et al. A Novel Transcription Factor-Based Prognostic Signature in Endometrial Cancer: Establishment and Validation. OTT. avr 2021;Volume 14:2579-98.
53. Peters EEM, Bartosch C, McCluggage WG, Genestie C, Lax SF, Nout R, et al. Reproducibility of lymphovascular space invasion (LVSI) assessment in endometrial cancer. Histopathology. juill 2019;75(1):128-36.
54. Guan H, Semaan A, Bandyopadhyay S, Arabi H, Feng J, Fathallah L, et al. Prognosis and reproducibility of new and existing binary grading systems for endometrial carcinoma compared to FIGO grading in hysterectomy specimens. Int J Gynecol Cancer. mai 2011;21(4):654-60.
55. Stelloo E, Nout RA, Naves LCLM, ter Haar NT, Creutzberg CL, Smit VTHBM, et al. High concordance of molecular tumor alterations between pre-operative curettage and hysterectomy specimens in patients with endometrial carcinoma. Gynecologic Oncology. mai 2014;133(2):197-204.

Supplementary data

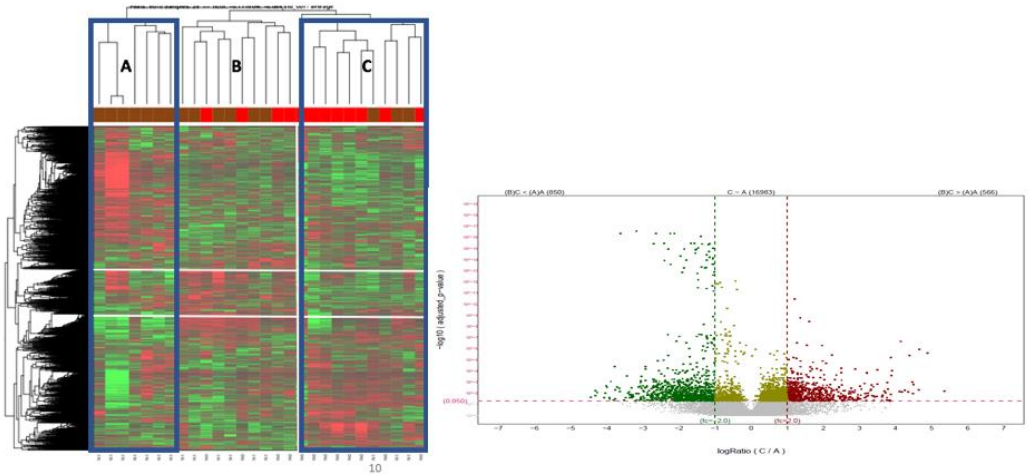
Supplementary data 1. Detailed histological and molecular characteristics of patients with EEC treated at Institut Bergonie selected after matching and quality control (N=28), France, 2010-2017

ID	N status	Grade	Myometrial invasion	LVSI	Stromal reaction	MELF pattern	Inflammatory inflammation	Peri nervous invasion	*POLE* pathogenic mutation	p53 IHC	*TP53* mutation	*TP53* mutation's pathogenicity	MMR status (IHC)	Molecular classification group	CTNNB1 mutation	CTNNB1 mutation's pathogenicity
1	N+	2	> 50%	Substantial	Presence	Absence	Absence	Presence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Proficient	NSMP		
2	N+	2	> 50%	Substantial	Presence	Presence	Absence	Absence	Absence	wild type			Proficient	NSMP		
3	N+	3	> 50%	Substantial	Absence	Absence	Presence	Absence	Absence				Deficient	Hypermutated (MSI)		
4	N+	2	> 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence				Deficient	Hypermutated (MSI)		
5	N+	1	≤ 50%	Substantial	Presence	Presence	Absence	Presence	Absence	wild type	exon5:c.522A>G; exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Deficient	Hypermutated (MSI)		
6	N+	3	> 50%	Substantial	Presence	Presence	Absence	Absence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Deficient	Hypermutated (MSI)		
7	N+	2	≤ 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type	exon5:c.522A>G exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Proficient	NSMP	exon3:c.98C>A exon3:c.98C>T	Pathogenic
8	N+	2	> 50%	Substantial	Presence	Presence	Presence	Absence	Absence	wild type			Deficient	Hypermutated (MSI)		
10	N+	2	≤ 50%	Non-substantial	Presence	Presence	Absence	Absence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Proficient	NSMP		
11	N+	2	> 50%	Non-substantial	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type			Deficient	Hypermutated (MSI)		
12	N+	3	> 50%	Non-substantial	Presence	Presence	Presence	Presence	Absence	Abnormal	exon6:c.655G>A	Pathogenic	Proficient	Serous like (TP53 mutation)		
13	N+	3	> 50%	Substantial	Presence	Absence	Absence	Presence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Deficient	Hypermutated (MSI)		
14	N+	2	≤ 50%	Substantial	Presence	Presence	Presence	Absence	Absence	wild type			Deficient	Hypermutated (MSI)		
15	N+	2	> 50%	Substantial	Presence	Presence	Absence	Absence	Absence	wild type	exon7:c.700C>T	Pathogenic	Proficient	Serous like (TP53 mutation)	exon3:c.110C>T	Pathogenic
16	N+	3	≤ 50%	Non-substantial	Presence	Presence	Presence	Absence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Deficient	Hypermutated (MSI)		
17	N+	2	≤ 50%	Absent	Presence	Presence	Presence	Absence	Absence	Abnormal	exon6:c.655G>A	Pathogenic	Proficient	Serous like (TP53 mutation)		

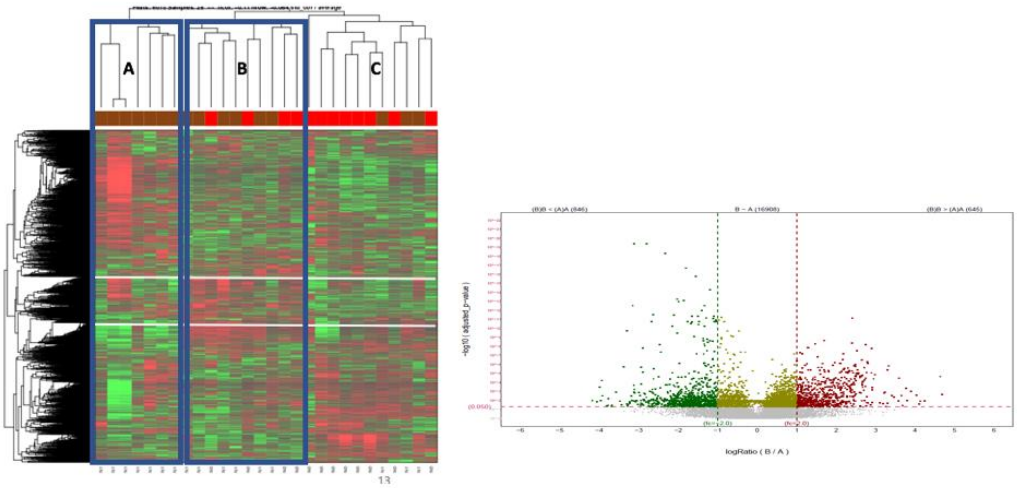
ID	N status	Grade	Myometrial invasion	LVSI	Stromal reaction	MELF pattern	Inflammatory inflammation	Peri nervous invasion	*POLE* pathogenic mutation	p53 IHC	*TP53* mutation	*TP53* mutation's pathogenicity	MMR status (IHC)	Molecular classification group	CTNNB1 mutation	CTNNB1 mutation's pathogenicity
32	N-	3	≤ 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type			Proficient	NSMP		
33	N-	2	≤ 50%	Non-substantial	Presence	Presence	Presence	Absence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Proficient	NSMP		
39	N-	2	> 50%	Absent	Presence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type			Proficient	NSMP	exon3:c.110C>T	Pathogenic
40	N-	2	> 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type	exon5:c.522A>G exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Deficient	Hypermutated (MSI)		
46	N-	2	> 50%	Absent	Absence	Absence	Presence	Absence	Absence	wild type			Deficient	Hypermutated (MSI)		
49	N-	3	> 50%	Substantial	Presence	Presence	Presence	Absence	Absence	wild type			Deficient	Hypermutated (MSI)		
50	N-	2	> 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type			Proficient	NSMP	exon3:c.134C>T	Pathogenic
51	N-	2	> 50%	Absent	Presence	Presence	Presence	Presence	Absence	wild type	exon5:c.522A>G	Non-pathogenic	Proficient	NSMP	exon3:c.98C>Aexon3:c.98C>T	Pathogenic
53	N-	1	≤ 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type			Proficient	NSMP	exon3:c.98C>A exon3:c.98C>T	Pathogenic
56	N-	3	> 50%	Substantial	Presence	Absence	Presence	Absence	Absence	wild type			Deficient	Hypermutated (MSI)		
59	N-	2	> 50%	Absent	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	wild type	exon3:c.98C>G	Non-pathogenic	Proficient	NSMP	exon3:c.110C>T	Pathogenic

Supplementary data 2. Comparison of histopathological characteristics and molecular patterns of cluster A (N=8), cluster B (N=10) and cluster C (N=11) defined in unsupervised analysis, Institut Bergonie, 2010-2017

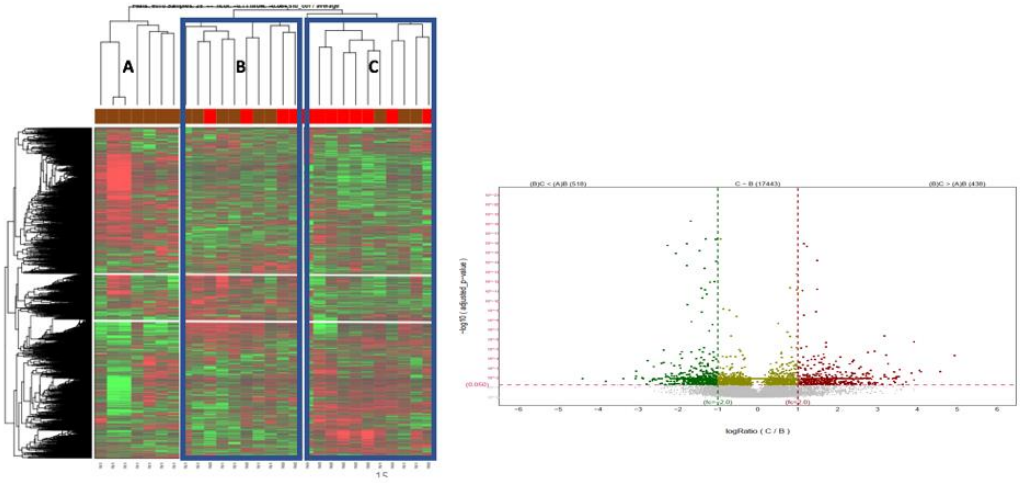
Pathological characteristics	Cluster A (N=7)		Cluster B (N=10)		Cluster C (N=11)		
	n (%)	Mean (SD)	n (%)	Mean (SD)	n (%)	Mean (SD)	p-value[1]
Lymph node involvement							0.007
N0	0 (0.0)		4 (40.0)		8 (72.7)		
N1	7 (100.0)		6 (60.0)		3 (27.3)		
Histological grade							0.14
Low grade (grade 1 & grade 2)	2 (28.6)		5 (50,0)		1 (9.1)		
High grade (grade 3)	5 (71.4)		5 (50,0)		10 (90.9)		
Myometrial invasion							0.9
<= 50%	3 (42.9)		3 (30.0)		4 (36.4)		
> 50%	4 (57.1)		7 (70.0)		7 (63.6)		
Angioinvasion							0.05
Presence	5 (74.4)		8 (80.0)		3 (27.3)		
Absence	2 (28.6)		2 (20.0)		8 (72.7)		
Number of angioinvasion (if presence of angioivasion)		4.4 (4.0)		11.7 (12.3)		1.4 (2.8)	
Stromal Reaction							0.12
Presence	5 (71.4)		8 (80.0)		4 (36.4)		
Absence	2 (28.6)		2 (20.0)		7 (63.6)		
MELF pattern							0.3
Presence	4 (57.1)		6 (60.0)		3 (27.3)		
Absence	3 (42.9)		4 (40.0)		8 (72.7)		
Inflammatory infiltration							0.6
Presence	3 (42.9)		5 (50.0)		3 (27.3)		
Absence	4 (57.1)		5 (50.0)		8 (72.7)		
Peri nervous invasion							0.8
Presence	2 (28.6)		1 (10.0)		2 (18.2)		
Absence	5 (71.4)		9 (90.0)		9 (81.8)		
Molecular classification (TCGA)							
Ultramutated							
Hypermutated							
Serous like							
Non specific molecular profile							



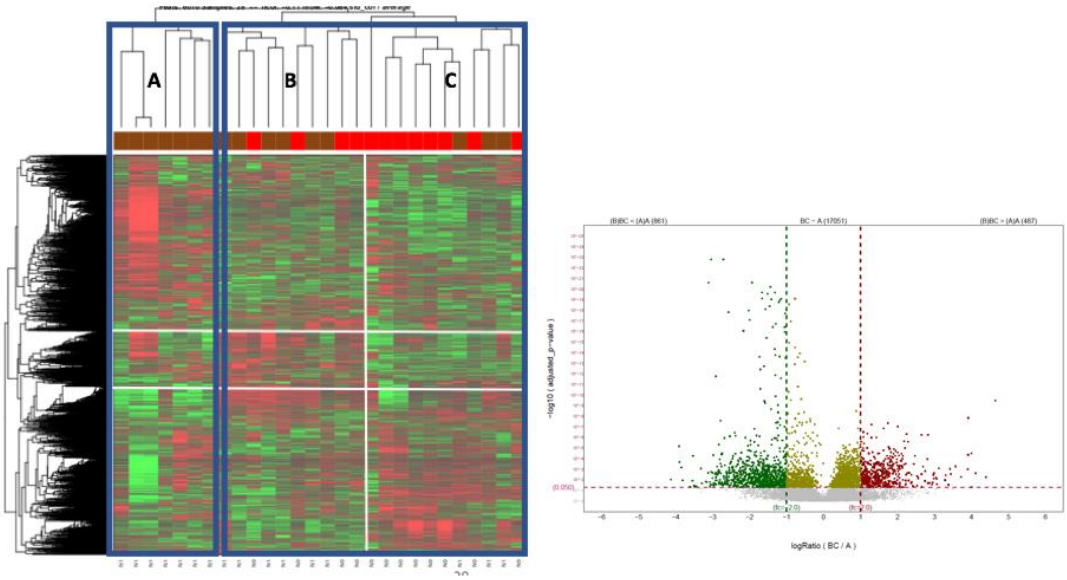
Supplementary data 3. Differential gene expression of cluster A and C found 1416 genes, Institut Bergonie, 2010-2017



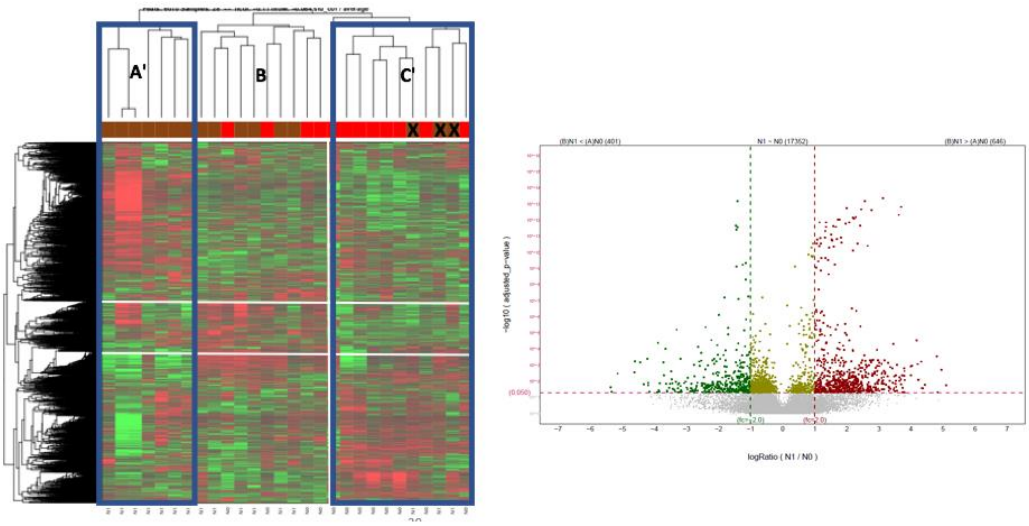
Supplementary data 4. Differential gene expression of cluster A and B found 1491 genes, Institut Bergonie, 2010-2017



Supplementary data 5. Differential gene expression of cluster B and C found 956 genes, Institut Bergonie, 2010-2017



Supplementary data 6. Differential gene expression of cluster A and B+C found 1348 genes, Institut Bergonie, 2010-2017



Supplementary data 7. Differential gene expression of cluster A and C' (N- patients only in C group) found 1047 genes, Institut Bergonie, 2010-2017

Perspectives

L'objectif final de notre travail est d'identifier une signature moléculaire, à l'aide de la méthode du séquençage des ARN, visant à prévoir de façon fiable l'envahissement ganglionnaire en préopératoire dans les carcinomes endométrioïdes de l'endomètre. Ce type d'outils permettrait de planifier les traitements adjuvants adaptés spécifiquement à la pathologie de la patiente sans que le recours à la lymphadénectomie ne soit nécessaire et sans altérer le pronostic.

La première étape de ce travail était de décrire les gènes différentiellement exprimés entre les patientes ayant ou non des métastases ganglionnaires et pouvant constituer des gènes d'intérêt pour une éventuelle signature. Comme nous l'avons vu dans l'article présenté, l'analyse non supervisée des échantillons de notre analyse a permis de définir deux groupes avec et sans envahissement ganglionnaire, comprenant respectivement 7 et 8 sujets, comparables par ailleurs. Mille quarante-sept gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes sont retrouvés, parmi lesquels certains (comme *MSX1*) ayant déjà fait l'objet de publications. Trois groupes d'expression sont surexprimés chez les patientes avec un envahissement ganglionnaire, qui ont déjà été décrits comme associés à l'invasion tumorale.

L'ensemble de ces résultats nous fournit le point de départ pour la constitution d'une signature moléculaire. A partir des données d'expression au sein de notre population, nous avons pu établir une signature composée de 54 gènes ayant une précision de 80% dans notre échantillon pour discriminer les sujets avec et sans invasion ganglionnaire. Cependant, ce calcul de précision est effectué au sein même de la population de développement de sa signature et doit, dans un second temps être ajusté et validé à partir d'une population extérieure. La poursuite du travail initié ici comprendra deux étapes successives :

- **<u>Étape 1 :</u> validation et ajustement de notre signature à partir de données d'expression disponibles**. Les échantillons de l'étude menée par Huang et al. en 2018 ont été sélectionnés sur des critères d'inclusion comparables à notre population d'étude au sein du *Cathay General Hospital* de Taiwan. Vingt-quatre échantillons ont été sélectionnés au total : 6 ayant des métastases ganglionnaires et 18 n'en ayant pas. Les échantillons n'ont pas été appariés sur leurs caractéristiques pré-opératoires comme dans notre travail. L'extraction d'ARN a été faite à partir d'échantillons congelés contrairement à nos échantillons issus de paraffine. Cependant, les méthodes

d'extraction ont été semblables à celles que nous avons réalisées dans notre travail, permettant l'application de notre signature sur ces derniers.
La reproductibilité de nos résultats sur cette population extérieure représenterait une première étape de validation de notre analyse. Si nécessaire, les résultats obtenus avec les données d'expression issues du travail de Huang et al. pourront également nous permettre d'affiner notre signature.

- **Étape 2** : **validation externe de la signature d'expression moléculaire**. Cette seconde étape nécessitera le recours à une nouvelle population, sélectionnée au sein de différents centres français et de cas de l'Institut Bergonié plus récents. La reproductibilité de notre signature sur une population totalement externe sera alors évaluée.

SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

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

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque. »

Marqueurs moléculaires de l'envahissement ganglionnaire dans les carcinomes endométrioïdes de l'endomètre

Introduction. L'envahissement ganglionnaire dans le carcinome endométrioïde de l'endomètre (CEE) constitue un facteur pronostic majeur mais la réalisation d'un prélèvement ganglionnaire est un geste morbide. Le recours à l'analyse moléculaire semble prometteuse pour prévoir l'envahissement ganglionnaire en vue d'adapter le geste chirurgical.

Objectif. Décrire les différentiels d'expression associés aux métastases ganglionnaires dans les CEE après séquençage complet de l'ARN.

Méthodes. Nous avons mené une étude rétrospective monocentrique à l'Institut Bergonie à Bordeaux. Notre population était constituée de patientes prises en charge entre 2010 et 2017 pour un CEE non métastatique, dont l'évaluation ganglionnaire avait été réalisée et dont le tissu anatomopathologique était disponible pour relecture. Les lames des patientes sélectionnés ont été relues de façon centralisée et ont été appariée 1:1 entre N+ et N- en fonction de la taille tumorale, du grade histopronostique et du degré d'invasion myométriale. Le séquençage ARN a été réalisé à partir des blocs de paraffine de tissu tumoral.

Résultats. Vingt-huit EEC étaient analysables après séquençage de l'ARN (16 N+ et 12 N-). L'analyse non supervisée a permis de distinguer 3 groupes d'expression distincts : un composé exclusivement de patients N+, un avec principalement des patients N- et un avec un mélange de patients). Trois voies d'expression étaient surreprésentées dans le groupe N+ : la matrice extracellulaire (ECM), la transformation épithéliale-mésenchymateuse (EMT) et la contraction des muscles lisses (SMC). L'analyse non supervisée des gènes différentiellement exprimés entre les patients N+ et N- a permis de générer une signature de 54 gènes avec une précision de 80% dans notre population.

Conclusion. Ce profil d'expression de l'ARN constitue la base de développement d'une signature moléculaire potentielle de l'invasion ganglionnaire permettant de planifier un traitement adjuvant sans lymphadénectomie.

Biomarkers associated with lymph nodal metastasis in Endometrioid Endometrial Carcinoma

Introduction. Lymph node metastasis is a key determinant of the prognosis and treatment of endometrioid endometrial cancer (EEC) but lymphadenectomy is associated with an increased risk of surgery related systemic morbidity and lymphoedema. Additional tools including molecular biomarkers are needed to select the women for whom complete surgical staging should be performed to adapt adjuvant therapy.

Objective. In this study, we describe the differential pathway landscape associated with lymph node metastases in EEC after whole RNA sequencing.

Methods. We conducted a retrospective study at Institut Bergonie, Bordeaux, France. Selected patients were treated for a non-metastatic EEC between 2010 and 2017; with pathological tissue available and lymph nodes evaluation performed. Slides of the 56 selected patients were reviewed by a gynecopathologist and EEC were matched 1:1 between N+ and N- according to definitive tumoral size, tumoral grade and myometrial invasion. Paraffin-Embedded (FFPE) tissue samples, after macrodissection of the areas of interest, were used for whole RNA-sequencing. Only tumoral tissues were used for extraction.

Results. Twenty-eight EEC were analyzable after RNA sequencing (16 N+ and 12 N-). Unsupervised analysis revealed 3 distinctive patterns of expression (one with only N+ patient, one enriched with mainly N- patients and one with a mix of patients). The cluster with only N+ patient tended to overexpress three specific pathways: Extra cellular Matrix (ECM), Epithelial to Mesenchymal (EMT) and Smooth Muscle Contraction (SMC). Curated unsupervised analysis of differentially expressed genes between N+ and N- patients permitted to generate a 54 genes signature with an accuracy of 80% in our population.

Conclusion. This RNA-expression profile may provide a basis for further study to develop a potential gene expression-based signature that could pre-operatively assess lymph node invasion and plan adjuvant therapy without lymphadenectomy.

Mots-clés : cancer de l'endomètre, métastases ganglionnaires, séquençage ARN, modèle de prédiction

Discipline : Médecine, Gynécologie Obstétrique, Biologie Moléculaire

Adresse : Université de Bordeaux – UFR des Sciences Médicales 146, rue Léon Saignat, 33076 Bordeaux Cedex