



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Mikaël AGOPIANTZ**

ROLE DE LA NEUROTENSINE DANS LA PROGRESSION DES ADENOCARCINOMES DE L'ENDOMETRE ET DE L'OVAIRE

26 Juin 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Xuefen LE BOURHIS	DR, Université de Lille 1
	M. Laurent MARTIN	PU-PH, Université de Bourgogne
Examineurs :	Mme Anne GOMPEL, Directrice	PU-PH, UMR U1007 INSERM, Université Paris Descartes
	M. Guillaume GAUCHOTTE, Co-Directeur	PU-PH, UMR U1256 INSERM, Université de Lorraine
Invité-e-s :	Mme Patricia FORGEZ	DR, Université Paris Descartes
	M. Olivier MOREL	PU-PH, Université de Lorraine

Sommaire

Liste des figures et des tableaux.....	6
---	----------

Liste des abréviations.....	8
------------------------------------	----------

Remerciements	10
----------------------------	-----------

I. Le cancer de l'endomètre.....	14
---	-----------

A. Epidémiologie	14
B. Facteurs de risque	14
C. Histologie et classifications.....	17
D. Sous-groupes moléculaires.....	21
E. Marqueurs de prolifération.....	23
F. Principes du traitement.....	26

II. Le cancer de l'ovaire	29
--	-----------

A. Epidémiologie	29
B. Facteurs de risque	29
C. Histologie et classifications.....	31
D. Principes du traitement.....	35

III. Le complexe NTS/NTSR1..... 38

A.	La neurotensine et son métabolisme	38
B.	Le gène de la neurotensine	40
C.	Les récepteurs à la neurotensine.....	41
D.	Physiologie de la neurotensine	44
E.	Physiopathologie de la neurotensine	45
F.	Pharmacologie de la neurotensine	50

IV. Objectifs de la thèse..... 53

V. Méthodes 54

A.	Cohortes clinico-pathologiques.....	54
B.	Cohortes du TCGA.....	55
C.	Histologie	56
D.	Immunohistochimie.....	57
E.	Méthodes de quantification en immunohistochimie	59
F.	Extraction d'ARN et RT-PCR.....	60
G.	Hybridation in situ en fluorescence.....	61
H.	Analyses statistiques.....	62
I.	Considérations éthiques.....	62

VI. Résultats 63

Partie 1 - Adénocarcinome de l'endomètre

A.	Caractéristiques de la population	63
B.	Etude des marqueurs de la prolifération.....	65
C.	Expression de NTS et de NTSR1 dans l'endomètre	70
D.	Valeur pronostique de l'expression de NTSR1	75
E.	Mécanismes impliqués dans la surexpression de NTSR1	78

Partie 2 - Adénocarcinome de l'ovaire

A.	Caractéristiques de la population	82
B.	Expression de NTS et NTSR1 dans l'ovaire	83
C.	Valeur pronostique de NTSR1	85
D.	Résistance au platine	85

VII. Discussion générale..... 86

A.	NTS et NTSR1 dans l'appareil reproducteur féminin.....	86
B.	Implication de NTS/NTSR1 dans la progression des adénocarcinomes.....	87
C.	Mécanismes d'activation et de surexpression de NTSR1	88
D.	Marqueurs pronostiques	89
E.	Perspectives thérapeutiques.....	90

VIII. Conclusions et perspectives	92
Bibliographie.....	93
<i>Annexe 1 : PUBLICATIONS.....</i>	112
<i>A. Manuscrit 1.....</i>	<i>112</i>
<i>B. Manuscrit 2.....</i>	<i>123</i>
<i>C. Manuscrit 3.....</i>	<i>137</i>
<i>Annexe 2 : Publications scientifiques du candidat</i>	149
<i>Annexe 3 : Communications connexes</i>	150
Résumé / Mots clés	151

Liste des figures et des tableaux

Figure 1. Facteurs de risque génétiques du cancer de l'endomètre	15
Figure 2. Facteurs de risque environnementaux du cancer de l'endomètre	17
Figure 3. Classification OMS 2014 des cancers du corps utérin	19
Figure 4. Classification FIGO 2009 du cancer de l'endomètre	20
Figure 5. Classification ESMO 2016 du cancer de l'endomètre	21
Figure 6. Analyses de survie en fonction des sous-groupes moléculaires	22
Figure 7. Rôle des protéines MCM 2 à 7 lors des différentes étapes du cycle cellulaire	25
Figure 8. Classification OMS 2014 des cancers de l'ovaire	32
Figure 9. Classification FIGO du cancer de l'ovaire	34
Figure 10. Prévalence des types histologiques du COE et leurs profils moléculaires associés	35
Figure 11. Schéma représentant la protéine précurseur de la NTS / NN et les différents peptides produits	39
Figure 12. Le gène de la neurotensine et sa séquence promotrice	40
Figure 13. Schéma représentant le NTSR1, récepteur à 7 domaines transmembranaires	42
Figure 14. Schéma représentant le transport cellulaire du couple NTS/NTSR1	44
Figure 15. Voies de signalisation consécutives à l'interaction NTS/NTSR1	47
Figure 16. Principaux processus impliqués dans la progression tumorale	49
Figure 17. Caractéristiques des récepteurs de la NTS, agonistes et antagonistes	51
Figure 18. Expression du récepteur NTSR1 dans le muscle lisse du côlon humain normal	58
Figure 19. Immunohistochimie des marqueurs de prolifération Ki-67 et MCM6	67
Figure 20. Analyses de survie en fonction de l'expression du MCM6 et du Ki67 en IHC	68
Figure 21. Analyses de survie en fonction de l'expression du MCM6 et du Ki67 dans la cohorte du TCGA	69
Figure 22. Expression du MCM6 et du Ki-67 par sous-groupes moléculaires	70
Figure 23. Immunohistochimie du NTSR1 dans l'endomètre bénin et tumoral	71
Figure 24. Immunohistochimie de la NTS dans l'endomètre normal et tumoral	74
Figure 25. Profil d'expression des ARNm de la NTS et du NTSR1 (RT-PCR)	75
Figure 26. Analyses de survie en fonction du grade et de l'expression de NTSR1 en IHC	76
Figure 27. Analyses de survie en fonction de l'expression de NTSR1 (z-score de l'ARNm).....	77

Figure 28. Expression de NTSR1 en ARNm selon les sous-groupes moléculaires	78
Figure 29. Analyse de la méthylation du promoteur de <i>NTSR1</i>	80
Figure 30. Expression du NTSR1 et de la NTS dans l’ovaire normal et tumoral	84
Figure 31. Valeur pronostique de l’expression des ARNm du NTSR1 et du NTSR3.....	85
Tableau 1. Séquences des primers utilisés pour la RT-PCR de l’actine, la NTS et le NTSR1	61
Tableau 2. Caractéristiques cliniques et histologiques de la cohorte d’adénocarcinomes de l’endomètre	64
Tableau 3. Expression de MCM6 et de Ki-67 selon le grade histologique et le stade FIGO	66
Tableau 4. Expression du NTSR1 selon le type histologique et le grade histologique	73
Tableau 5. Profil de méthylation du promoteur NTSR1 et corrélation à l’expression de l’ARNm du NTSR1	81
Tableau 6. Caractéristiques cliniques et histopathologiques de la cohorte ovarienne	82

Liste des abréviations

ACE	adénocarcinome de l'endomètre
ACO	adénocarcinome de l'ovaire
ADN(c)	acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	activator protein 1
ARN(m)	acide ribonucléique (messenger)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CCI	coefficient de corrélation intra-classe
CE	cancer de l'endomètre
CO	cancer de l'ovaire
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding
DAG	diacylglycérol
E2	estradiol
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERE	estrogen response element
ESMO	European Society for Medical Oncology
FAK	focal adhesion kinase
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique
FISH	fluorescent in-situ hybridization
FIV	fécondation in vitro
GRE	glucocorticoid response element
GTP	guanosine triphosphate
HER	human epidermal growth factor receptor
HES	hématoxyline éosine safran
HR	hazard ratio
HTA	hypertension artérielle
IC	intervalle de confiance
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
INCa	Institut National du Cancer

IP3	inositol-1,4,5 triphosphate
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCM	mini-chromosome maintenance
MMP	matrix metalloproteinase
MSI	microsatellite instability
(pro)NGF	(pro)nerve growth factor
NN	neuromédine N
NTS	neurotensine
NTSR1,2,3	neurotensin receptor 1,2,3
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	odd ratio
PARP	poly ADP ribose polymerase
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PK A / C	protéine kinase A / C
PL A2 / C	phospholipase A2 / C
RAP	receptor associated protein
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
RR	risque relatif
(q)RT-PCR	(quantitative) reverse transcription polymerase chain reaction
SG	survie globale
SL	syndrome de Lynch
SNC	système nerveux central
SSP	survie sans progression
TCGA	The Cancer Genome Atlas
THM	traitement hormonal de la ménopause
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

Remerciements

A ma Directrice de Thèse,

Mme la Pr. Anne GOMPEL,

Vous avez accepté de diriger et juger cette thèse,

Vos conseils avisés ont permis l'aboutissement de ce travail,

Pour votre confiance et votre soutien amical,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de mon éternelle reconnaissance.

A mon Co-Directeur de Thèse,

M. le Pr. Guillaume GAUCHOTTE,

Tu as accepté de co-diriger et juger cette thèse,

Tes conseils avisés ont permis l'aboutissement de ce travail,

Pour ta confiance, ton soutien quotidien, ton humilité, ta gentillesse,

Trouve ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A mes Maîtres et Juges,

Mme la Dr. Xuefen LE BOURHIS,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

M. le Pr. Laurent MARTIN,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Mme la Dr. Patricia FORGEZ,

Pour ton chaleureux accueil au sein de l'Unité U1007,

Pour ton soutien et ta bienveillance en tout instant.

M le Pr. Olivier MOREL,

Pour la confiance que tu m'as toujours accordée,

Pour l'avenir.

Pour leur aide, leurs conseils et leur soutien,

A M. le Pr. Georges WERYHA pour notre agréable et enrichissante collaboration depuis toutes ces années,

A M. le Pr. Jean-Louis GUEANT, Directeur, et toute l'équipe de l'unité INSERM U1256,

A Mme la Pr. Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN, Directrice, Mme la Dr. Jin LIU avec qui nous avons partagé cette thématique de recherche dans la complémentarité de nos compétences, M. le Dr. Zerui WU, et toute l'équipe de l'unité INSERM U1007,

A M. le Pr. Patrick MENU, Directeur, à Mme Hélène PRIMERANO, et à toute l'équipe de BIOSE,

A M. le Pr. Jean-Michel VIGNAUD, Mme la Dr. Béatrice MARIE, Mme Claudine DEMESY, Mme Amale NEGGAOUI, Mme Stéphanie LACOMME, Mme Lydia BROCHIN et toute l'équipe du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHRU de Nancy,

A M. le Pr. Philippe JUDLIN, M. le Dr. Thierry ROUTIOT, et toute l'équipe du Pôle de Gynécologie-Obstétrique du CHRU de Nancy,

A M. le Dr. Judicaël HOTTON et M. Manuel GOMES-DAVID, nos étudiants si précieux,

A Mme la Pr. Claire LE JEUNNE et Mme la Dr. Frédérique GUILLET-MAY, mes modèles,

A M. le Dr. Cédric BAUMANN, Mme la Dr. Céline BONNET, M. le Pr. Bruno BORGHESE, M. le Dr. Geoffroy CANLORBE, Mme la Dr. Claire CHARRA-BRUNAUD, Mme Isabelle CLERC-URMES, M. le Dr. Thomas CUNY, Mme la Dr. Marie-Laure ESZTO, Mme la Dr. Laëtitia GOFFINET, M. le Dr. Pierre-Alexandre JUST, Mme la Dr. Agnès LEROUX, Mme la Dr. Delphine MORETTINI, M. Julien ROUCHE, M. le Dr. Arthur SORLIN, et M. le Pr. Jean-Luc VAYSSIERE.

A mes proches,

A mes Parents,

A Vincent, Raphaël, Guillaume, Xavière et Paul,

A mes filleul-e-s et à leur mère Isabelle,

Aux ami-e-s de Paris, Reims, Amiens, Lille, Bordeaux, Lyon, Charbonnières-les-Bains, Megève, Evian, Geix, Chambéry, Marseille, La Ciotat, Cannes, Nice, Bruxelles, Liège, Copenhague, Ashkelon, et d'ailleurs,

A Arthur, à tou-te-s les étudiant-e-s et aux générations futures.

Je dédie ce travail à Monsieur le Professeur Serge POIRAUDEAU qui nous a quittés trop tôt.

I. Le cancer de l'endomètre

A. Epidémiologie

Le cancer de l'endomètre (CE) est le cancer gynécologique le plus fréquent dans les pays occidentaux. Il se place au sixième rang des cancers chez la femme derrière le cancer du sein, colorectal, du poumon, de la thyroïde et le mélanome cutané, soit 4,4 % des cancers chez la femme. Il se situe au deuxième rang des cancers gynécologiques, après le cancer du sein (Siegel et al., 2016).

En France, son incidence estimée est de 8125 nouveaux cas en 2015 (soit 11,5 cas pour 100 000 femmes) (Leone et al., 2015). L'âge moyen au diagnostic est de 62,7 ans (Creasman et al., 2006). Il est la 6^{ème} cause de décès en France chez la femme avec 2180 décès en 2015. L'âge moyen au moment du décès est de 76 ans (Ferlay et al., 2013). Souvent diagnostiqué à un stade précoce, il est de relativement bon pronostic. Le risque de décès est associé aux stades avancés et à la présence de métastases (stades III et IV de la classification TNM). L'envahissement ganglionnaire est en lien avec le type histologique, le grade et le pourcentage d'envahissement myométrial (Ballester et al., 2013 ; Canlorbe et al., 2013).

B. Facteurs de risque

Les facteurs de risque sont nombreux et en majorité en lien avec un état d'hyper-oestrogénie relatif ou absolu, endogène ou exogène (Seror et al., 2014 ; Sénéchal et al., 2015). L'âge est l'un des facteurs des plus importants, 90 % des cancers survenant après 50 ans, et plus de la moitié après 70 ans. Les Figures 1 et 2 résument ces facteurs de risque.

Facteurs génétiques

Une méta-analyse incluant 16 études avec 3 871 cas et 49 475 témoins provenant de 10 études de cas-témoins et 33 510 femmes en tant que cas de six études de cohorte, a estimé le risque relatif (IC à 95 %) de cancer de l'endomètre associé à des antécédents familiaux de premier degré de cancer de l'endomètre (1,82 (1,65- 1,98)), et du côlon (1,17 (1,03-1,31)), respectivement. Le risque cumulatif de cancer de

l'endomètre à 70 ans est à 3,1 % (IC à 95 % : 2,8-3,4) chez les femmes ayant un parent au premier degré atteint d'un cancer de l'endomètre (Win et al., 2015).

Le syndrome de Lynch (SL), ou syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), est associé à une augmentation du risque de cancer colorectal, mais également de cancers de l'endomètre et de l'ovaire et, moins fréquemment, de cancers de l'estomac, du grêle, des voies urinaires, des voies biliaires et du pancréas (Zorn et al., 2005 ; Sénéchal et al., 2015). La transmission est autosomique dominante, en cas d'atteinte constitutionnelle. La mutation causale intéresse un gène du système MMR (MisMatch Repair) impliqué dans l'identification et la réparation des mésappariements de l'ADN. Il s'agit principalement des gènes *MLH1* et *MSH2*, plus rarement du gène *MSH6*, et du gène *PMS2* (< 5 % des cas). Le risque cumulé au cours de l'existence est 33 % (IC à 95 % : 16–57) dans l'étude multicentrique ERISCAM qui a porté sur l'analyse de 537 familles. Un jeune âge au diagnostic avec un âge médian autour de 48 ans caractérise ce type de cancer.

Les mutations constitutionnelles des gènes *POLE* (polymérase ε) et *POLD1* (polymérase δ) sont impliqués dans un surrisque de cancer de l'endomètre, associé à une polypose / cancer colorectal (Palles et al., 2013 ; Church et al., 2013), tout comme les mutations de *PTEN* (syndrome de Cowden).

Formes héréditaires (prédisposition génétique majeure)
Syndrome de Lynch (HNPCC) (Mutation constitutionnelle des gènes MMR : <i>MLH1</i> et <i>MSH2</i> ++ ; <i>MHS6</i> , <i>EPCAM</i> , <i>PMS2</i>)
Maladie de Cowden (Mutation constitutionnelle du gène <i>PTEN</i>)
Mutations constitutionnelles du gène <i>POLD1</i>
Facteurs de susceptibilité génétique (facteurs « mineurs » de prédisposition génétique)
Polymorphismes dans différents gènes, identifiés dans le cadre d'études pangénomiques
Association possible de plusieurs polymorphismes et interaction avec des facteurs d'environnement
Rendant compte de certaines agrégations familiales « non syndromiques »

Figure 1 : Facteurs de risque génétiques du cancer de l'endomètre (d'après Sénéchal et al., 2015).

Période d'activité ovarienne

Une période d'activité ovarienne longue, incluant la ménopause tardive, la puberté précoce, la nulliparité, ainsi que toutes les causes d'anovulation chronique, dont le syndrome des ovaires polykystiques sont associées à un risque plus important (Dossus et al., 2010 ; Brinton et al., 2007 ; Bari et al., 2014). A contrario, la contraception oestro-progestative a un effet protecteur avec un HR à 0,65 (IC95 % = 0,56–0,75) (Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer, 2015).

Cet effet persiste jusqu'à 30 années après l'arrêt de la prise des oestro-progestatifs pour une utilisation prolongée. La multiparité ou la ménarche > 15 ans sont aussi des facteurs favorables, OR = 0,71 (IC95 % : 0,63–0,80) et OR = 0,50 (IC95 % : 0,35–0,70) pour les adénocarcinomes de type 1 et de type 2 respectivement (Setiawan et al., 2013).

Obésité et syndrome métabolique

Elle est présente dans 50 à 80 % des cas. Le risque est proportionnel à l'indice de masse corporelle (IMC) et au degré d'obésité (Törnberg et al., 1994). Le diabète et l'hypertension artérielle (HTA) sont trois fois plus présents que dans la population générale, étant en étroite liaison avec l'âge et le mode de vie des patientes atteintes (Parazzini et al., 1999 ; Soler et al., 1999).

Traitement hormonal de la ménopause (THM) et tamoxifène

La prise d'une oestrogénothérapie post-ménopausique non compensée par un traitement progestatif favorise également le développement du cancer. Dans ce contexte, le risque est augmenté de 2 à 20 fois avec une corrélation en lien avec la durée d'utilisation du traitement (Shapiro et al., 1985). Ce risque disparaît en associant des progestatifs en continu, mais n'est que partiellement antagonisé par les traitements séquentiels (Gompel, 2018). Le tamoxifène est employé comme traitement adjuvant dans les cancers du sein hormono-dépendants. Le risque relatif (RR) de CE chez une patiente ménopausée traitée pour un cancer du sein par Tamoxifène est de 2 à 3, avec une apparition dans les 4 ans après l'initiation du traitement (Chen et al., 2014). En revanche il n'existe pas chez les femmes non ménopausées. Le risque augmente avec l'âge de la patiente et la durée du traitement. Le pronostic de ces cancers serait plus péjoratif, le risque relatif de décès était évalué à 2,83 (IC à 95 % : 1,68–4,77, $p < 0,001$) pour le groupe exposé au tamoxifène (Ngô et al., 2014). Le pourcentage des carcinosarcomes et des tumeurs malignes mixtes mulleriennes est significativement plus élevé (15,4 % versus 2,9 %, $p < 0,02$) (Bergman et al., 2000).

Facteurs de risque	RR ou HR (IC95 %)
Paramètres de la vie génitale	
Facteurs endogènes	
Âge de la puberté ≥ 15 ans	0,72 (0,58–0,90)
Âge de la ménopause > 55 ans	2,20 (1,61–3,01)
Syndrome des ovaires polykystiques	2,79 (1,31–5,95)
Multiparité (grossesses ≥ 4)	0,58 (0,44–0,78)
Facteurs de risque exogènes	
Traitement hormonal de la ménopause (5 ans)	
Estrogènes seuls	3,5 (2,6–4,7)
Estrogènes + progestérone micronisée	1,8 (1,38–2,34)
Contraception estroprogestative	0,65 (0,56–0,75)
DIU lévonorgestrel	0,5 (0,5–0,70)
Autres facteurs de risque environnementaux	
Surcharge pondérale	1,59 (1,50–1,68)
Diabète	2,47 (1,37–2,45)
Tamoxifène (5 ans)	2,4 (1,8–3,0)

Figure 2 : Facteurs de risque environnementaux du cancer de l'endomètre (d'après Sénéchal et al., 2015).

C. Histologie et classifications

L'endomètre correspond à la muqueuse interne de l'utérus. Il est constitué d'un épithélium prismatic unistratifié (cilié ou non selon le stade fonctionnel) comportant deux couches :

- La couche fonctionnelle : siège au niveau des 2/3 supérieurs de la muqueuse, d'une épaisseur variable, elle témoigne des modifications cycliques, et elle est régulièrement éliminée ; elle contient les glandes, un tissu conjonctif appelé chorion cytogène (ou stroma) riche en cellules des vaisseaux sanguins, notamment les artères spiralées, branches des artères utérines, ainsi qu'un système de drainage veineux
- La couche basale : située en profondeur au niveau du 1/3 inférieur, elle est très peu influencée par le cycle et n'est pas éliminée par desquamation. C'est à partir de celle-ci que se renouvelle la couche fonctionnelle.

Le CE est hormono-dépendant, tout particulièrement dans son sous-type endométrioïde. L'hyperoestrogénie est un facteur important dans son apparition, avec un rôle protecteur de la progestérone. Il se développe le plus souvent (85 % des cas) à partir d'un endomètre hyperplasique présentant des atypies

cellulaires. Dans 15 % des cas, il peut survenir sur un endomètre atrophique (Seror et al., 2014). Il peut survenir dans la filiation de lésions précancéreuses. Elles sont de deux types : l'hyperplasie non atypique (ou glandulo kystique) évoluant rarement en adénocarcinome ; l'hyperplasie atypique qui est la forme d'évolution la plus fréquente vers l'adénocarcinome de l'endomètre (ACE) (Brun et al., 2010).

Le CE est donc une tumeur maligne primitive qui naît et se développe aux dépens de l'endomètre. Les cellules endométriales et le stroma sont respectivement à l'origine des adénocarcinomes et des sarcomes. De nombreux types histologiques ont été décrits, mais il faut cependant noter que les tumeurs épithéliales représentent 90 % des tumeurs endométriales, parmi lesquelles la plupart sont des ACE de type endométriöide.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé les tumeurs épithéliales de l'endomètre selon deux types (Figure 3) :

- Type 1 : tumeurs endométriöides pour lesquelles l'OMS a défini trois grades. Le grade histopronostique est réalisé en fonction de l'architecture de la prolifération épithéliale maligne en excluant le contingent épidermoïde ou les morules. Lorsque les atypies cytonucléaires sont marquées, le grade est augmenté de 1.
 - Grade 1 : ≤ 5 % de contingent indifférencié,
 - Grade 2 : 6-50 % de contingent indifférencié,
 - Grade 3 : > 50 % de contingent indifférencié.
- Type 2 : carcinomes à cellules claires, carcinomes papillaires séreux et carcinosarcomes.

Macroscopie

L'adénocarcinome endométrial survient dans le corps de l'utérus, mais peut également se localiser au niveau du segment inférieur (INCa, 2010). Indépendamment du type histologique, son apparence macroscopique est celle d'une masse dans un utérus globalement augmenté de volume. Il est vu plus fréquemment au niveau du mur postérieur de la cavité utérine. Le carcinome de l'endomètre est typiquement exophytique, présente une surface souvent ulcérée sous laquelle une tumeur blanche molle ou indurée, et pénètre superficiellement ou plus profondément dans le myomètre. Dans des cas avancés, la tumeur peut envahir jusqu'à la séreuse et s'étendre en voisinage. Dans de plus rares cas, la tumeur n'est pas visible macroscopiquement ; le carcinome est alors identifié en histologie.

WHO Classification of tumours of the uterine corpus^{a,b}

Epithelial tumours and precursors		Dissecting (cotyledonoid) leiomyoma	8890/0
Precursors		Diffuse leiomyomatosis	8890/1
Hyperplasia without atypia		Intravenous leiomyomatosis	8890/1
Atypical hyperplasia / Endometrioid intraepithelial neoplasia		Metastasizing leiomyoma	8898/1
Endometrial carcinomas		Smooth muscle tumour of uncertain malignant potential	8897/1
Endometrioid carcinoma	8380/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Squamous differentiation	8570/3	Epithelioid leiomyosarcoma	8891/3
Villoglandular	8263/3	Myxoid leiomyosarcoma	8896/3
Secretory	8382/3	Endometrial stromal and related tumours	
Mucinous carcinoma	8480/3	Endometrial stromal nodule	8930/0
Serous endometrial intraepithelial carcinoma	8441/2*	Low-grade endometrial stromal sarcoma	8931/3
Serous carcinoma	8441/3	High-grade endometrial stromal sarcoma	8930/3
Clear cell carcinoma	8310/3	Undifferentiated uterine sarcoma	8805/3
Neuroendocrine tumours		Uterine tumour resembling ovarian sex cord tumour	8590/1*
Low-grade neuroendocrine tumour	8240/3	Miscellaneous mesenchymal tumours	8900/3
Carcinoid tumour		Rhabdomyosarcoma	
High-grade neuroendocrine carcinoma	8041/3	Perivascular epithelioid cell tumour	8714/0*
Small cell neuroendocrine carcinoma		Benign	
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Malignant	8714/3*
Mixed cell adenocarcinoma	8323/3	Others	
Undifferentiated carcinoma	8020/3		
Dedifferentiated carcinoma			
Tumour-like lesions		Mixed epithelial and mesenchymal tumours	
Polyp		Adenomyoma	8932/0
Metaplasias		Atypical polypoid adenomyoma	8932/0
Arias-Stella reaction		Adenofibroma	9013/0
Lymphoma-like lesion		Adenosarcoma	8933/3
		Carcinosarcoma	8980/3
Mesenchymal tumours		Miscellaneous tumours	
Leiomyoma	8890/0	Adenomatoid tumour	9054/0
Cellular leiomyoma	8892/0	Neuroectodermal tumours	
Leiomyoma with bizarre nuclei	8893/0	Germ cell tumours	
Mitotically active leiomyoma	8890/0		
Hydropic leiomyoma	8890/0	Lymphoid and myeloid tumours	
Apoplectic leiomyoma	8890/0	Lymphomas	
Lipomatous leiomyoma (lipoleiomyoma)	8890/0	Myeloid neoplasms	
Epithelioid leiomyoma	8891/0		
Myxoid leiomyoma	8896/0*	Secondary tumours	

^a The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (575A). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /1 for unspecified, borderline or uncertain behaviour, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia and /3 for malignant tumours; ^b The classification is modified from the previous WHO classification of tumours (1906A), taking into account changes in our understanding of these lesions; *These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O in 2013.

Figure 3 : Classification OMS 2014 des cancers du corps utérin (d'après WHO, 2014).

Microscopie

Le carcinome endométriode est représenté par un spectre histologique allant du carcinome très différencié, difficile à distinguer de l'hyperplasie endométriale atypique, jusqu'à des tumeurs très peu différenciées. Une caractéristique du carcinome endométriode est la présence de structures glandulaires ou villo-glandulaires bordées par des cellules cylindriques simples ou pseudostratifiées dont leurs grands axes sont perpendiculaires à la membrane basale avec au moins quelques noyaux allongés polarisés dans la même direction. Plus la différenciation glandulaire diminue et est remplacée par des amas cellulaires empaquetés (plages solides), plus elle est classée comme moins bien différenciée (haut grade).

Classification FIGO

La Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO) a proposé une stadification anatomochirurgicale du cancer de l'endomètre qui repose sur le principe d'une prise en charge chirurgicale complète, comportant une hystérectomie totale avec annexectomie bilatérale, lymphadénectomies pelvienne bilatérale et lombo-aortique. Cette démarche part du fait que la connaissance du statut ganglionnaire est un facteur pronostique essentiel dans le cancer de l'endomètre. La classification FIGO de 2009 est rappelée dans la Figure 4.

FIGO (2009)	DESCRIPTION	TNM (2009)
Stades I*	Tumeur limitée au corps utérin	T1
IA	Tumeur limitée à l'endomètre ou ne dépassant pas la moitié du myomètre	T1a
IB	Tumeur envahissant la moitié du myomètre ou plus de la moitié du myomètre	T1b
Stades II*	Tumeur envahissant le stroma cervical mais ne s'étendant pas au-delà de l'utérus	T2
Stades III*	Extension locale et/ou régionale comme suit :	T3 et/ou N1
IIIA	Séreuse et/ou annexes**	T3a
IIIB	Envahissement vaginal et/ou paramétrial**	T3b
IIIC	Atteinte des ganglions lymphatiques régionaux**	N1
IIIC1	Ganglions pelviens	
IIIC2	Ganglions para-aortiques +/- ganglions pelviens	
Stades IV*	Extension à la muqueuse vésicale et/ou intestinale et/ou métastases à distance	T4 et/ou M1
IVA	Extension à la muqueuse vésicale et/ou intestinale	T4
IVB	Métastases à distance incluant les métastases intra-abdominales et/ou ganglions inguinaux	M1

Figure 4 : Classification FIGO 2009 du cancer de l'endomètre (INCa, 2010).

Classification en niveaux de risque

Dans le cadre des dernières recommandations pour la pratique clinique, l'INCa a proposé une classification selon le niveau de risque pour les tumeurs de stade I (FIGO), tenant compte du stade FIGO, du type histologique et du grade (Figure 5) (Colombo et al., 2016). Elle a pour but de déterminer la population pour laquelle on pourrait surseoir à la réalisation d'un geste ganglionnaire. Il n'est pas réalisé chez les patientes placées dans le groupe à bas risque alors qu'il est effectué systématiquement chez les patientes du groupe à haut risque. Il est une option à discuter dans les cas intermédiaires.

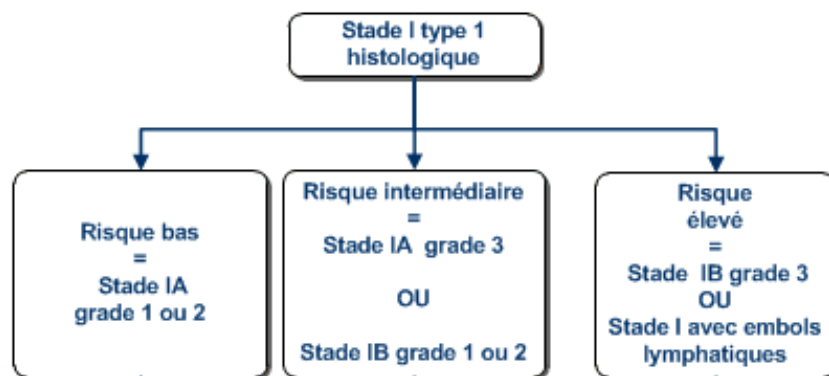


Figure 5 : Classification ESMO 2016 du cancer de l'endomètre (Colombo et al., 2016)

D. Sous-groupes moléculaires

Les analyses menées au sein du groupe de recherche du *Cancer Genome Atlas* sur les différentes formes de la maladie ont confirmé son caractère hétérogène (Kandoth et al., 2013). Grâce au consortium international TransPORTEC, ont été identifiés quatre sous-groupes moléculaires distincts, après caractérisation génomique, transcriptomique et protéomique de 373 carcinomes de l'endomètre :

Type I :

- Un sous-groupe caractérisé par une mutation de la polymérase ϵ (POLE) associée à un phénotype ultra-muté de très bon pronostic (Figure 4).
- Un sous groupe où domine une instabilité microsatellitaire (MSI).
- Un sous groupe présentant une faible quantité d'altérations du nombre de copies des gènes (*copy number [CN] - low*).
-

Type II :

- Un dernier sous-groupe avec une quantité élevée d'altération du nombre de copies (*CN high*), essentiellement associé aux formes séreuses, de haut grade, et de mauvais pronostic (Figure 4).

Les tumeurs séreuses et 25 % des carcinomes endométrioides de haut grade présentent en effet des altérations importantes du nombre de copies, peu de modifications de la méthylation de l'ADN, de faibles taux d'ER / PR et de mutations fréquentes de *TP53*. La plupart des tumeurs endométrioides ont peu d'altérations du nombre de copies ou de mutations *TP53*, mais des mutations fréquentes de *PTEN*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *ARID1A*, et *KRAS*.

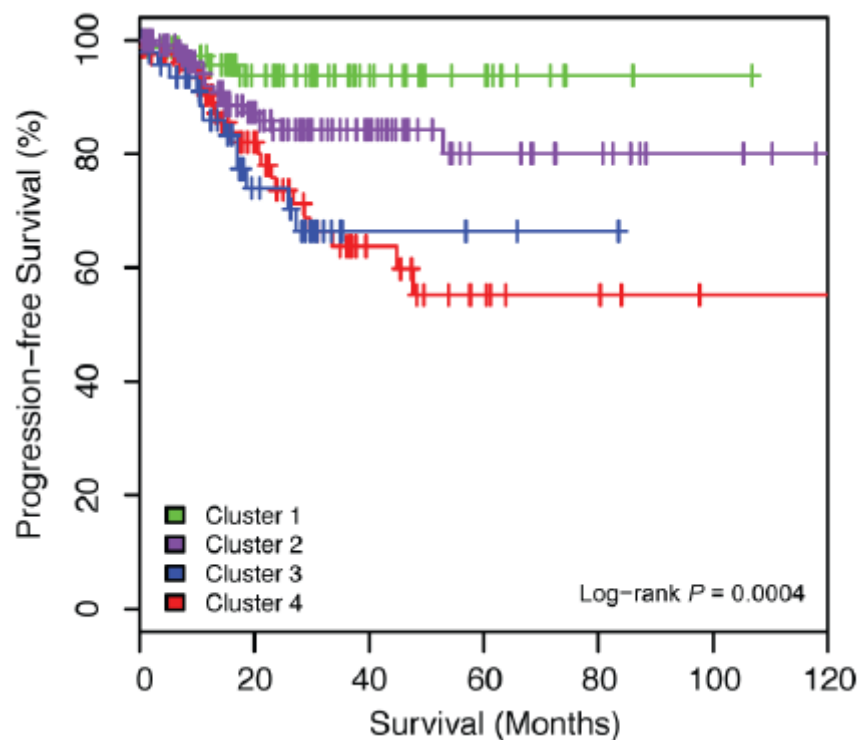


Figure 6 : Analyses de survie en fonction des sous-groupes moléculaires (d'après Kandoth et al., 2013). Courbes de Kaplan-Meier avec tests du log-rank pour la SSP. Cluster 1 : POLE ; 2 : MSI ; 3 : CN-Low ; 4 : CN-High.

E. Marqueurs de prolifération

Les marqueurs de prolifération pourraient constituer des marqueurs pronostiques intéressants dans les cancers de l'endomètre. Il en existe différents types dont 2 seront développés dans cet exposé. Les marqueurs de prolifération, y compris Ki-67, ne sont pas utilisés de manière systématique dans le cancer de l'endomètre. Plusieurs études ont examiné la corrélation de Ki-67 avec la progression tumorale et la survie, avec des résultats divergents quant à sa valeur pronostique (Salvesen et al., 1999 ; Oreskovic et al., 2004 ; Chakravarty et al., 2010 ; Gassel et al., 1998).

1. Ki-67

Il s'agit d'une protéine de 360 kDa exprimée dans les cellules en prolifération. Elle fut décrite pour la première fois en 1983 dans les cellules de lymphome Hodgkinien chez la souris (Gerdel et al., 1983). Le gène codant pour Ki-67 est situé sur le chromosome 10 en position 10q25ter et comprend 15 exons (Duchrow et al., 1996). Elle est exprimée lors de toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) et absente dans les phases de quiescence (G0) (Gerlach et al., 1997). Sa quantité augmente progressivement tout au long du cycle, en particulier à partir de la phase S, pour diminuer fortement lors des phases ultimes de la mitose (anaphase et télophase) (Bruno et al., 1992 ; Du Manoir et al., 1991). Son expression uniquement dans les cellules en cycle en fait un marqueur reconnu d'estimation de la prolifération tumorale. Son taux est corrélé à l'évolution clinique dans divers types de cancer. Son niveau de marquage est même un argument décisionnel important dans la prise en charge thérapeutique d'autres cancers comme les adénocarcinomes mammaires, ou les tumeurs neuroendocrines (Ishihara et al., 2013 ; Sorbier et al., 2012 ; Ciano et al., 2012 ; Strosberg et al., 2012).

Dans le cancer de l'endomètre, ce marqueur a été étudié dans plusieurs séries et les résultats divergent. Dans la plupart de celles-ci, Ki-67 est corrélé au grade, au stade FIGO et à la survie (Salvesen et al., 1998 ; Kostantinos et al., 2013). Dans certaines d'entre elles, l'expression de Ki-67 n'est corrélée à aucune donnée anatomo-pathologique et n'impacte pas la survie (Oreskovic et al., 2004 ; Chakravarty et al., 2010). Une grande variabilité inter-laboratoire dans l'intensité et le pourcentage de cellules marquées a été décrite (Mengel et al., 2002). Ces différences s'expliquent par des variations dans le temps de fixation, dans la procédure de démasquage de l'antigène, ou dans les étapes de détection immunohistochimique du signal.

2. MCM6

Les protéines MCM (mini-chromosome maintenance) sont des facteurs essentiels de l'initiation de la réplication de l'ADN, à l'origine identifiées comme des protéines nécessaires à l'entretien de minichosomes dans les *Saccharomyces cerevisiae* (Tye, 1999). Les plus connues d'entre elles sont une famille de six protéines structurellement apparentées (MCM2-7) interagissant les unes avec les autres. Elles forment un complexe hexamérique de protéines à l'origine de la réplication de l'ADN, formant une partie du complexe pré-réplicatif (Chong et al., 1995 ; Kubota et al., 1995 ; Tanaka et al., 1997). Elles seraient également impliquées dans la formation des fourches de réplication et dans le recrutement d'autres protéines liées à la réplication de l'ADN. Ce complexe MCM a une activité hélicase et intervient au début de la phase S du cycle cellulaire, lors des étapes d'initiation et d'élongation (Labib et al., 2000 ; Lee et Hurwitz, 2000 ; You et al., 1999). La corrélation entre la prolifération cellulaire et l'expression des protéines MCM a été utilisée comme un indicateur de carcinogenèse et pourrait se révéler être un outil pronostique efficace pour certains cancers (Hiraiwa et al., 1997 ; Hiraiwa et al., 1998).

MCM6 est la plus longue des 6 protéines, composée de 1017 AA (Tye, 1999). Son gène codant est situé sur le chromosome 2 en position 2q21. Il comprend 17 exons (Harvey et al., 1996). MCM6 est donc directement impliquée dans le cycle cellulaire et joue un rôle crucial dans sa régulation. Elle est exprimée des phases G1 à M du cycle cellulaire, mais avec une expression plus précoce au cours de G1 que Ki-67, permettant d'obtenir un marquage d'une proportion plus importante de cellules (Figure 7) (McCallum et al., 2000 ; Bochman et Schwacha, 2009).

La corrélation entre la prolifération cellulaire et l'expression des protéines MCM a été utilisée comme un indicateur de carcinogenèse et pourrait se révéler être un outil pronostique efficace pour certains cancers. Dans 2 études réalisées au sein de notre unité de recherche, portant sur les méningiomes ainsi que dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules, MCM6 était corrélée significativement au grade histologique ainsi qu'à la survie (Gauchotte et al., 2012 ; Vigouroux et al., 2015).

Deux équipes ont évalué l'intérêt de ce complexe protéique dans les cancers de l'endomètre. La première étude, menée par Li, a recherché l'impact pronostique de la protéine MCM7 (Li et al., 2005). Elle a montré une corrélation significative de MCM7 avec les grades histologiques plus élevés et la survie globale, étudié conjointement à la protéine Ki-67. Les auteurs concluaient en une supériorité de

MCM7. Dans l'étude de *Kato et al.*, l'expression de MCM2 et MCM3 étaient fortement corrélée à la prolifération cellulaire dans les tissus normaux et hyperplasiques, alors que dans les tissus cancéreux, l'expression était plus faible et moins fortement en lien avec la prolifération (Kato et al., 2003). La reproductibilité de ces marqueurs n'a pas été évaluée dans ces études.

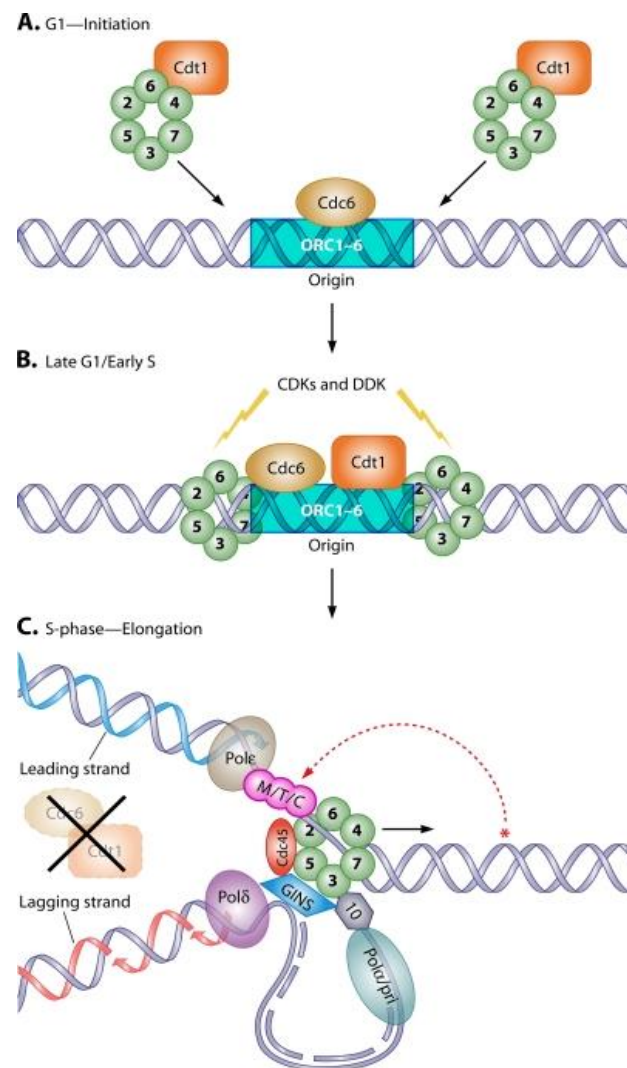


Figure 7 : Rôle des protéines MCM 2 à 7 lors des différentes étapes du cycle cellulaire (Bochman et Schwacha, 2009).

F. Principes du traitement

1. Stades précoces

Le traitement des stades I est essentiellement chirurgical, la chirurgie constituant la première étape essentielle au traitement. Elle comprend une hystérectomie totale avec annexectomie bilatérale, et détermine le stade chirurgical de la maladie (Koh et al, 2018). Elle est le plus souvent associée à de la curiethérapie, à visée de diminution des récidives vaginales, excepté dans les stades Ia, grade 1 histologique OMS pour laquelle l'option chirurgicale suffit. Dans ce dernier cas, en cas de désir de grossesse, un traitement médical seul par progestatifs fortes doses peut se concevoir.

En cas de facteurs défavorables (stade Ib, ou grade élevé avec facteurs histopronostiques défavorables), une radiothérapie externe est associée. La prise en charge des stades II est similaire (Koh et al, 2018).

Enfin, en cas de non-opérabilité, la curiethérapie et la radiothérapie externe sont l'alternative de choix, combinée si possible.

2. Stades avancés

Environ 13 % des femmes diagnostiquées avec un cancer de l'endomètre présentent une maladie de stade avancé (stades III / IV FIGO). Le traitement standard du cancer avancé de l'endomètre consiste en une chirurgie de cytoréduction, dont le principe est comparable à celle décrite ci-dessus, dans la limite de la faisabilité, suivie d'une radiothérapie, ou d'une chimiothérapie, ou les deux à titre systématique, et éventuellement d'une hormonothérapie.

Les associations sont préférées et les plus classiques sont :

- Carboplatine / paclitaxel
- Cisplatine / doxorubicine
- Cisplatine / doxorubicine / paclitaxel
- Carboplatine / docétaxel
- Ifosfamide / paclitaxel (pour le carcinosarcome)
- Cisplatine / ifosfamide (pour le carcinosarcome)
- Everolimus / létrozole (pour le type endométrioïde).

Une méta-analyse a ainsi inclus 4 études randomisées contrôlées multicentriques portant sur 1269 femmes présentant un stade FIGO III / IV ayant bénéficié d'une chirurgie de cytoréduction. Deux essais, évaluant 620 femmes (83 % stade III, 17 % stade IV), ont comparé la chimiothérapie adjuvante à la radiothérapie adjuvante ; un essai évaluant 552 femmes (88 % de stade III, 12 % de stade IV) a comparé la chimiothérapie CDP (cisplatine / doxorubicine / paclitaxel) à l'association cisplatine / doxorubicine (CD) associée à une radiothérapie adjuvante. La survie globale (SG) et la survie sans progression (SSP) étaient plus longues avec la chimiothérapie adjuvante qu'avec la radiothérapie adjuvante seule (OS : hazard ratio (HR) 0,75 et 0,74, IC à 95 % (IC)), et indépendantes du stade. Les effets indésirables hématologiques et neurologiques et l'alopécie étaient plus importants pour la chimiothérapie (surtout pour l'association CDP) que pour la radiothérapie adjuvante. L'adjonction de paclitaxel n'augmentait pas la PFS (552 femmes, HR 0,90, IC à 95 % 0,69 à 1,17) (Galaal et al., 2014).

3. Thérapies ciblées

La prolifération vasculaire est importante pour la progression clinique du CE (Stefansson et al., 2006). Le bévaccizumab en association avec d'autres thérapies ciblées, la chimiothérapie ou la radiothérapie a démontré une activité antitumorale prometteuse dans le CE (Bogliolo et al., 2015). Dans la première étude de phase 2, 7 patientes (13,5 %) ont présenté une réponse clinique (une réponse complète et six réponses partielles, la durée de réponse médiane étant de 6 mois), et 21 patientes (40,4 %) ont survécu sans progression pendant au moins 6 mois. Les SSP et SG médianes étaient de 4,2 et 10,5 mois, respectivement (Aghajanian et al., 2011). De bons résultats ont été retrouvés en association avec une chimiothérapie de type carboplatine / paclitaxel (Simkins et al., 2015).

Par ailleurs, les inhibiteurs du checkpoint immunitaire sont une option intéressante dans les CE POLE-ultra-mutés et MSI-H. Les CE POLE ultra-mutés et les MSI-H ont montré un micro-environnement tumoral exprimant un nombre élevé de néo-antigènes et une quantité élevée de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Les résultats préliminaires d'un essai clinique de phase 1 ont démontré une activité antitumorale du pembrolizumab dans le CE, tout comme pour le nivolumab (Mittica et al., 2017).

Les combinaisons d'avenir comprennent les inhibiteurs d'immunocheckpoint, la chimiothérapie et les inhibiteurs de la tyrosine kinase afin de renforcer la réponse immunitaire.

4. Hormonothérapie

La place de l'hormonothérapie dans le cancer de l'endomètre métastatique n'est pas bien identifiée. Deux types d'approches sont possibles, notamment en cas de situation palliative. L'utilisation d'agents progestatifs de type mégestrol notamment ou d'une action anti-estrogène par inhibiteurs de l'aromatase, fulvestrant ou tamoxifène (Boglioli et al., 2016 ; Koh et al, 2018).

II. Le cancer de l’ovaire

A. Epidémiologie

Le cancer de l’ovaire (CO) est l’un des cancers gynécologiques les plus fréquents, et s’associe à un pronostic sombre. Il existe 238700 nouveaux cas estimés en 2012, représentant 4 % de tous les nouveaux cas de cancer chez les femmes dans le monde. Le nombre de décès annuel est estimé à 151900, ce qui en fait la huitième cause de décès par cancer chez la femme (Ferlay et al., 2015). L’incidence du cancer de l’ovaire est inégalement répartie dans le monde, avec les taux les plus élevés dans les pays occidentaux, et les taux les plus bas en Afrique (Ferlay et al., 2015). Généralement, le cancer de l’ovaire est diagnostiqué au stade avancé, du fait d’une paucisymptomatologie initiale. La survie moyenne à 5 ans est faible, à seulement 37,6 % (IC à 95 %, 37,1-38,0) dans les populations européennes étudiées entre 1999-2007 (De Angelis et al., 2014).

En France, avec environ 4615 nouveaux cas en 2012 (IC à 95 %, 4095-5136), le CO représentait 2,9 % de tous les cancers chez les femmes et était le 8^e type de cancer le plus fréquent. Avec 3140 décès en 2012, le CO représentait 5 % de tous les décès liés au cancer chez les femmes, ce qui en fait la 5^{ème} cause de décès. Entre 1989 et 2012, la survie à 1, 5 et 10 ans après le diagnostic était respectivement de 76 %, 42 % et 33 % (Tretarre et al., 2015).

B. Facteurs de risque

Facteurs génétiques

On estime qu’environ 10 % des CO sont dus à un contexte génétique, les mutations germinales de *BRCA1* ou *BRCA2* représentant 90 % des cas. Les femmes atteintes de mutations *BRCA1* et *BRCA2* ont respectivement un risque de survenue de CO de 30 à 40 %, et de 10 à 20 % avant l’âge de 70 ans (Antoniou et al., 2003 ; Arts-de Jong et al., 2016 ; Levy-Lahad et Friedman, 2007 ; Risch et al., 2001). Les mutations *BRCA* augmentent particulièrement le risque d’adénocarcinomes séreux de haut grade. Récemment, d’autres gènes participant avec *BRCA1 / 2* pour la réparation de l’ADN ont été également reconnus comme responsables de CO héréditaire, comme *ATM*, *CHEK2*, *RAD51*, *BRIP1* et *PALB2* (Toss et al., 2015).

La mutation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs peut aussi être responsable de CO. Le gène *TP53* est muté dans 50 à 80 % des carcinomes ovariens invasifs de haut grade, mais rarement dans d'autres sous-types de cancer de l'ovaire ou des tumeurs séreuses limites, alors que les mutations *PTEN* se retrouvent principalement dans les carcinomes de type endométriöide ou à cellules claires (Lynch et al., 2009 ; Toss et al., 2015).

Le syndrome de Lynch présente un risque de 6 à 12 % de survenue de CO, en périménopause, avec des présentations précoces (85 % aux stades I / II contre 15 % aux stades III / IV, $p < 0,001$), et de sous-types histologiques variés, les types séreux ne représentant que 22 % des CO (Helder-Woolderink et al., 2016). La survie globale est en conséquence bonne (80 % à 5 ans), mais est deux fois moindre dans les formes avancées (Ryan et al., 2017).

Endométriose

Dans une méta-analyse incluant 444 225 femmes, l'endométriose est fortement associée à un surrisque de survenue de CO, plutôt de bon pronostic, de stade précoce, et de bas grade (Kim et al., 2014). L'endométriose est associée à un risque significativement augmenté d'ACO à cellules claires (OR 3,05, IC à 95 % : 2,43-3,84, $p < 0,0001$), et endométriöides (OR 2,04, 1,67-2,48, $p < 0,0001$), sans association avec les autres types histologiques (Pearce et al., 2012).

Traitement de l'infertilité et de la ménopause

L'infertilité semble augmenter l'incidence du CO (Risch et al., 1994 ; Rizzuto et al., 2013). De nombreuses études ont montré que les traitements de stimulation ovarienne notamment en fécondation in vitro (FIV) pourraient entraîner un risque accru de tumeurs ovariennes borderline, mais sans preuve majeure d'un risque accru de cancer invasif (Ness et Al., 2002 ; Tomao et al., 2014). Le THM par œstrogènes seuls (RR = 1,37, IC à 95 % : 1,19 à 1,58) ou en association aux progestatifs (RR = 1,27, IC à 95 % : 1,18 à 1,36 ; $p < 0,001$) augmente le risque d'ACO séreux (Shi et al., 2016).

Obésité

Plusieurs études ont rapporté le lien entre obésité et sur-risque de CO. Dans une étude cas-témoins de 775 cas de cancer de l'ovaire et 846 témoins, il y avait un risque accru de cancer de l'ovaire avec une augmentation de l'IMC : OR = 1.9, IC de 95 %, 1,3-2,6 (Purdie et al., 2001). L'obésité semble augmenter le risque de sous-types histologiques moins fréquents du cancer de l'ovaire, mais elle n'augmente pas le risque d'ACO séreux de haut grade (Olsen et al., 2013).

Tabagisme

Une analyse de 21 études a démontré que le tabagisme augmentait le risque d'ACO mucineux invasif (OR = 1,31 ; IC 95 % : 1,03-1,65) et borderline (OR = 1,83 ; IC 95 % : 1,39-2,41), tandis que le tabagisme sevré augmenterait le risque d'ACO séreux (OR = 1,30 ; IC 95 % : 1,12-1,50) (Faber et al., 2013).

Facteurs de protection

La parité, l'allaitement maternel, la contraception orale ainsi que la chirurgie gynécologique comme la ligature des trompes et l'hystérectomie peuvent diminuer le risque de développer un cancer de l'ovaire. Une étude cas-témoin a montré que la parité (3 naissances à terme vs. nulliparité) était inversement associée au risque de CO (Koushik et al., 2017). L'utilisation de la contraception oestro-progestative avant la première grossesse menée à terme est associée à une réduction du risque de 9 % (IC 95 % : 0,86-0,96) pour les ACO de haut grade (Cook et al., 2017). Cette réduction du risque est rémanente et dépendante de la durée de la prise. Une méta-analyse a montré que les RR de la ligature des trompes est de 0,70 (IC à 95 % : 0,64-0,75) et de l'hystérectomie de 0,74 (IC à 95 % : 0,65-0,84) (Rice et al., 2012).

C. Histologie et classifications

La plupart des tumeurs de l'ovaire peuvent être classées en trois types selon l'origine de la tumeur, les tumeurs épithéliales, les tumeurs stromales et les tumeurs germinales (Figure 8). Environ 90 % des CO sont d'origine épithéliale. Elles sont classées en différents sous-types basés sur l'aspect morphologique selon la classification histopathologique de l'OMS, comprenant les tumeurs séreuses, endométrioïdes, à cellules claires, mucineuses et indifférenciées (Figure 8).

WHO Classification of tumours of the ovary

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

Figure 8 : Classification OMS 2014 des cancers de l'ovaire d'origine épithéliale (d'après WHO, 2014).

Carcinomes séreux

Les ACO séreux sont classés en lésions de bas et de haut grades, qui sont cliniquement et moléculairement distinctes. Les ACO séreux de haut grade sont issus de l'épithélium ovarien mais aussi de lésions de carcinome intra-épithélial tubaire (Kindelberger et al., 2007) et représentent 68 % des cas (Kobel et al., 2010). Les mutations *TP53* sont un événement princeps retrouvé dans 96 % des cas, et dans les autres cas, la dérégulation de p53 est causée par des mécanismes post-traductionnels (Ahmed et al., 2010, Cancer Genome Atlas Research, 2011). Une altération de la voie BRCA est retrouvée dans 51 % des cas dans une cohorte de 489 cas (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Dans cette étude, il y avait 17 % de mutations germinales, et 3 % de mutations somatiques de *BRCA1 / 2*. Dans 11 % des cas, il existait une altération épigénétique de *BRCA* (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Les ACO séreux de bas grade représentent 3 à 4 % de tous les cas (Kobel et al., 2010). Les mutations communes sont celles des oncogènes *KRAS*, *BRAF* et *ERBB2* (Singer et al., 2003 ; Vang et al., 2009), en amont de la cascade des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Hsu et al., 2004), dans deux tiers des cas (Bonome et al., 2005).

Carcinomes endométrioides

Environ 11 % des ACO sont de type endométrioides (Kobel et al., 2010). La plupart des carcinomes endométrioides se développent lentement à partir des lésions endométriosiques (Pearce et al., 2012). Les mutations les plus fréquentes sont celles de *CTNNB1*, codant pour β -caténine (Palacios et Gamallo, 1998), *PTEN* (Obata et al., 1998), *KRAS* (Cuatrecasas et al., 1997), et *PIK3C* (Samartzis et al., 2013).

Carcinomes à cellules claires

Les ACO à cellules claires représentent 12 % des cas (Kobel et al., 2010), et sont le plus souvent d'origine endométriosique (Lim et Oliva, 2013). Près de 50 % des ACO à cellules claires présentent des mutations *ARID1A* (Jones et al., 2010) et *PIK3CA* (Anglesio et al., 2011). Les amplifications *C-MET* ont également été décrites (Yamashita et al., 2013). Ces carcinomes sont presque toujours non mutés pour *TP53* et ont un faible niveau d'instabilité chromosomique (Anglesio et al., 2011).

Carcinomes mucineux

Les carcinomes mucineux représentent 3 à 4 % des ACO et progressent lentement à partir de lésions muqueuses (Kobel et al., 2010). La mutation *KRAS* est fréquente et précoce dans leur évolution (Gemignani et al., 2003). La surexpression ou l'amplification *ERBB2* est observée dans 15-20 % des cas (Anglesio et al., 2013).

La Figure 9 montre la classification FIGO du CO (Prat, 2014). Elle différencie les stades du CO en fonction de l'avancée clinico-pathologique de la maladie, déterminant le pronostic ainsi que la prise en charge thérapeutique.

Stades précoces	
Stade IA	Cancer limité à un ovaire ou une trompe. Pas de cellules tumorales en surface de l'ovaire ou de la trompe, ni dans le péritoine.
Stade IB	Cancer limité aux deux ovaires ou aux deux trompes. Pas de cellules tumorales en surface des ovaires ou des trompes, ni dans le péritoine.
Stade IC	Cancer limité à un ou deux ovaires (une ou deux trompes)
Stade IC1	Rupture chirurgicale
Stade IC2	Rupture pré-opératoire ou cellules tumorales à la surface de l'ovaire ou de la trompe
Stade IC3	Cellules tumorales dans le lavage péritonéal
Stade IIA	Atteinte d'un ou deux ovaires (ou trompe) associée à une extension pelvienne sous le détroit supérieur (utérus, trompe, ovaire)
Stades avancés	
Stade IIB	Extension aux autres organes pelviens
Stade III	Atteinte de l'abdomen ou des ganglions
Stade IIIA	Atteinte ganglionnaire ou abdominale microscopique
Stade IIIA1	Atteinte ganglionnaire isolée (IIIA1i <10mm ; IIIA1ii >10mm)
Stade IIIA2	Atteinte microscopique abdominale +/- ganglionnaire
Stade IIIB	Atteinte abdominale <2cm +/- ganglionnaire
Stade IIIC	Atteinte abdominale >2cm +/- ganglionnaire
Stade IVA	Épanchement pleural avec une cytologie positive
Stade IVB	Métastase parenchymateuse ou extra-abdominale

Figure 9 : Classification FIGO 2014 du cancer de l'ovaire (d'après Prat, 2014)

Une classification basée sur la génétique moléculaire divise les CO en deux types (Kurman et Shih, 2011 ; Vang et al., 2009) :

- Type I, relativement stables génétiquement, incluent les adénocarcinomes endométrioides de bas grade, mucineux et à cellules claires et les tumeurs de Brenner. Ils sont généralement retrouvés à

des stades précoces, relativement stables génétiquement, et caractérisés par des mutations spécifiques, notamment *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* et *PPP2R1A*, qui ciblent des voies de signalisation cellulaire spécifiques.

- Type II, génétiquement hautement instables, incluent les adénocarcinomes séreux et endométrioides de haut grade et les carcinomes indifférenciés / mixtes (carcinosarcomes). Ils sont agressifs, présents à un stade avancé, et présentent une fréquence très élevée de mutations *TP53* et une altération de l'expression de *BRCA*.

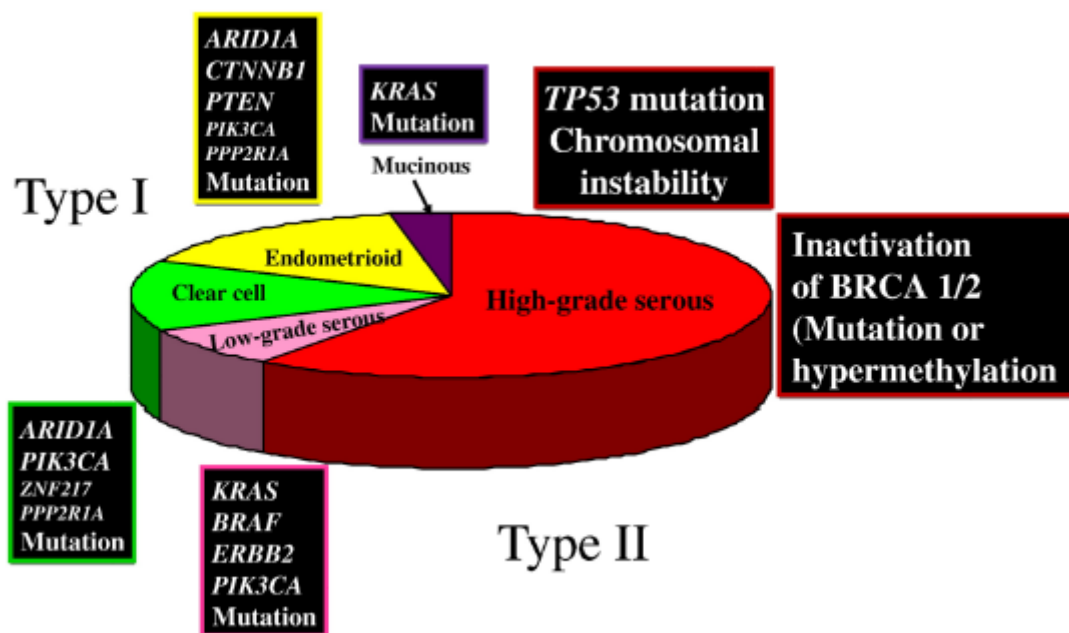


Figure 10 : Prévalence des types histologiques des ACO et leurs profils moléculaires associés (d'après Kurman et Shih, 2011).

D. Principes du traitement

Traitement standard

La chirurgie première de *debulking* suivie d'une chimiothérapie adjuvante est le traitement standard pour le CO. La chirurgie comprend généralement l'ovariectomie bilatérale, l'hystérectomie totale élargie, l'omentectomie et l'exérèse de toutes les lésions tumorales visibles. L'objectif est d'éliminer le maximum de masse tumorale, la survie tendant à être meilleure lorsque la tumeur résiduelle ne dépasse pas 1 cm (DiSaia et Tewari, 2001). Seuls les patientes stades IA et IB peuvent être traitées sans

chimiothérapie adjuvante. La chimiothérapie standard comprend une association de platine et de taxane (Thigpen et al., 2011). À la fin des années 1980, le cisplatine a été établi comme la chimiothérapie de première intention, plusieurs études le comparant au cyclophosphamide et à la doxorubicine (Bhoola et Hoskins, 2006). Puis, le paclitaxel a été introduit dans le cadre de la résistance au platine. Plusieurs essais, ont montré que le bras paclitaxel/cisplatine avait un taux de réponse global plus élevé (77 % contre 66 %, $p = 0,02$) comparé au bras cyclophosphamide/cisplatine. Le carboplatine a peu à peu supplanté le cisplatine devant une efficacité comparable en association au paclitaxel avec une plus faible toxicité gastro-intestinale et neurologique et une meilleure qualité de vie (du Bois et al., 2003 ; Neijt et al., 2000). Une chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une chirurgie est encore controversée (Vergote et al., 2011).

Traitement de la récurrence / rechute

La réponse à la chimiothérapie est positive dans 80 % des cas avec 40 à 60 % de réponse complète dans le CO avancé. Cependant, 90 % de ces patientes font une rechute dans les 2 ans (Agarwal et Kaye, 2003), l'objectif étant alors de prolonger la survie, de contrôler les symptômes liés à la maladie, et de maintenir la qualité de vie (Jelovac et Armstrong, 2011). La chirurgie cytoréductive secondaire peut être envisagée avec les mêmes objectifs de cytoréduction (Jelovac et Armstrong, 2011). Sur la base de 3 essais randomisés, la référence est la combinaison de carboplatine associé au paclitaxel, à la gemcitabine ou à la doxorubicine. Dans l'essai ICON4 / AGO-OVAR-2.2, l'association du platine au paclitaxel améliore le taux de réponse (54 % vs 66 %), le temps de progression de la maladie (9 mois vs 12 mois), et la survie médiane (24 mois vs 29 mois) (Parmar et al., 2003). L'association à la gemcitabine améliore de même le taux de réponse (47,2 % vs 30,9 % $p = 0,0016$) et la SSP médiane (8,6 mois vs. 5,8 mois ; IC à 95 %) sans entamer la qualité de vie (Pfisterer et al., 2006). Enfin, l'association à la doxorubicine a montré une meilleure efficacité que celle au paclitaxel (SSP de 11,3 mois vs. 9,4 mois) (Pujade-Lauraine et al., 2010). Le choix de la chimiothérapie dépendra donc majoritairement des profils de toxicités. Le CO résistant au platine sera traité par une chimiothérapie séquentielle pouvant associer de nombreuses molécules, dont le topotécan avec un taux de réponse de 9-20 %, la doxorubicine et la gemcitabine avec une efficacité similaire (Jelovac et Armstrong, 2011). Les thérapies ciblées, anti-angiogéniques et inhibiteurs de PARP (poly ADP ribose polymérase), seuls ou en association à une chimiothérapie, ont montré leur efficacité dans le CO résistant au platine.

Thérapie antiangiogénique

Le bévécizumab, anticorps humanisé monoclonal ciblant le VEGF (vascular endothelial growth factor), est le premier médicament anti-angiogénique utilisé dans le CO. Plusieurs essais ont montré que le

bévacizumab pendant et jusqu'à 10 mois après la chimiothérapie par carboplatine et paclitaxel prolonge la SSP médiane (Burger et al., 2011 ; Pujade-Lauraine et al., 2014). L'amélioration de la survie est plus forte pour les patientes présentant un risque élevé de progression (Oza et al., 2015, Perren et al., 2011). Il améliore également la SSP en association au carboplatine et à la gemcitabine dans le CO sensible au platine (12,4 mois vs. 8,4 mois) (Aghajanian et al., 2012). D'autres stratégies anti-angiogéniques comme les inhibiteurs des récepteurs du VEGF et d'autres récepteurs tyrosine kinases ont été également développées.

Inhibiteurs de PARP

L'inhibition de PARP, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN simple brin, entraîne une cytotoxicité accrue dans les cellules tumorales présentant une altération de la voie BRCA (Ashworth, 2008). Dans une étude préliminaire, 21 des 46 (46 %) patientes avec une mutation *BRCA* ont répondu au traitement (Jelovac et Armstrong, 2011). Dans un essai randomisé, le traitement d'entretien par olaparib (400 mg deux fois par jour) chez les patientes *BRCA* mutées sensibles au platine, a amélioré la SSP médiane (11,2 mois vs. 4,3 mois) (Ledermann et al., 2014). Enfin, l'immunohistochimie (IHC) *BRCA* est corrélée aux altérations *BRCA* et pourrait être prédictive de la réponse aux inhibiteurs de PARP (Garg et al., 2013).

III. Le complexe NTS/NTSR1

A. Métabolisme de la neurotensine

La neurotensine (NTS) est un tridecapeptide linéaire de 1733 Da isolé fortuitement à partir d'extraits d'hypothalamus bovins lors de la purification de la substance P (Carraway et Leeman, 1973). La NTS a ensuite été retrouvée dans les extraits intestinaux de bovins et d'humains par le développement du dosage radioimmunologique (Hammer et al., 1980 ; Kitabgi et al., 1976). La NTS a été définie comme neuromodulateur dans le système nerveux central (SNC) et comme une hormone digestive.

La séquence humaine présente la séquence d'acides aminés suivante : pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-COOH (Hammer et al., 1980). La séquence d'hexapeptide terminale (8-13) qui est fortement conservée chez la plupart des vertébrés (Rostene et Alexander, 1997) contient les propriétés biologiques du peptide entier (Kitabgi et al., 1985). C'est aussi la partie de la séquence la plus sensible à la dégradation enzymatique, qui inactive rapidement le peptide dans la circulation.

Comme la plupart des neuropeptides, la NTS est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 170 acides aminés (AA). La maturation de la pro-NTS conduit à la libération de deux peptides, la NTS et la neuromédine N (NN) (Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH). Les deux peptides partagent un tétrapeptide C-terminal commun et des activités pharmacologiques similaires (Kitabgi et al., 1992a). Les peptides NTS et NN sont localisés en tandem, séparés par trois séquences dibasiques Lys-Arg (Dobner et al., 1987) qui constituent les sites de clivage par les endopeptidases, engendrant diverses combinaisons dont la NTS, la NN et leurs fragments dit longs (Felicangeli et Kitabgi, 2002) (Figure 11).

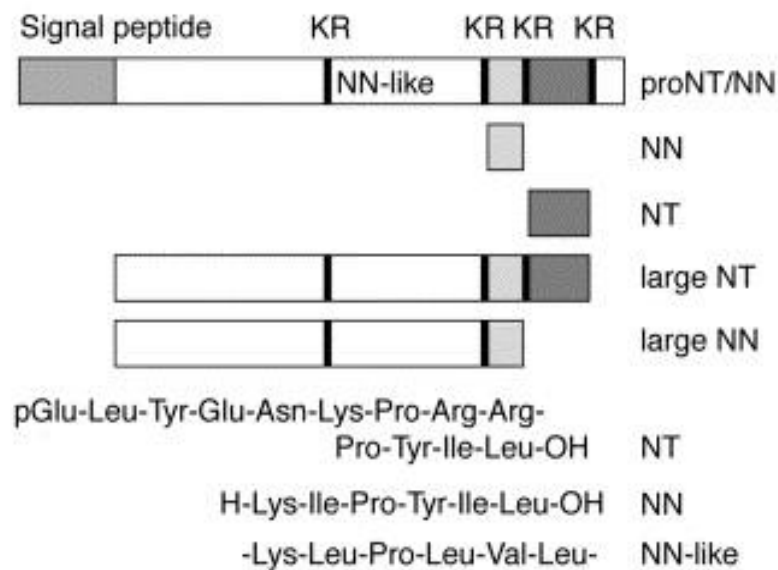


Figure 11 : Schéma représentant la protéine précurseur de la NTS / NN et les différents peptides produits (d'après Kitabgi et al, 2006).

En périphérie, le précurseur NTS/NN est synthétisé et maturé dans les cellules endocrines N situées dans la muqueuse intestinale grêle (Kitabgi et Freychet, 1978). Le peptide est stocké dans les granules de sécrétion cytoplasmiques dans la partie basale et sécrété en fonction de différents stimuli (Ferris et al., 1991). Chez l'homme, l'ingestion massive d'acides gras entraîne une augmentation significative de la NTS dans le plasma, allant de 2 pM à 26 pM, 15 à 60 minutes après un repas à forte teneur en matières grasses (Drewe et al., 2008 ; Ferris et al., 1991 ; Theodorsson-Norheim et Rosell, 1983).

Une fois libérée par des cellules sécrétrices périphériques, la NTS est soumise à une inactivation protéolytique par des peptidases qui ciblent la séquence 8-13 (Kitabgi, 2006a). Le foie joue un rôle majeur dans la clairance de la NTS par la libération systémique d'une peptidase, limitant ainsi l'action du peptide (Brook et al., 1987 ; Ferris et al., 1991). En outre, les reins jouent également un rôle important dans l'élimination du peptide par filtration (Gillatt et al., 1990). Chez l'homme, sa demi-vie est estimée à environ 4 minutes (Blackburn et al., 1980).

B. Le gène de la neurotensine

Le gène humain de la NTS est situé sur le chromosome 12 en q21 (Bean et al., 1992). Le gène NTS/NN englobe 10,2 kb et comprend trois introns et quatre exons, dont le quatrième code pour la NTS et la NN (Kislauskis et al., 1988). L'exon 1 contient uniquement la séquence codant pour le peptide signal (AA 1-22). Les exons 2, 3 et 4 codent respectivement pour les fragments 23-44, 45-119 et 120-169 AA du précurseur (Rostene et Alexander, 1997).

L'expression du gène est principalement limitée aux neurones et aux cellules N endocrines dans l'intestin grêle. Dans le promoteur NTS / NN chez le rat et l'homme, les principaux éléments régulateurs ont été caractérisés sur les 216 pb proximaux en amont du site de transcription (Bean et al., 1992 ; Kislauskis et al., 1988 ; Kislauskis et Dobner, 1990). Ce promoteur contient une boîte TATA et plusieurs séquences régulatrices telles que AP-1 (Activator Protein 1), GRE (Glucocorticoid Response Element) et un site proximal CRE / AP-1 qui se lie à un complexe de protéines comprenant les facteurs c-Jun, JunD et CRE-binding (cAMP response-element-binding, CREB), (Evers et al., 1995a) (Figure 12).

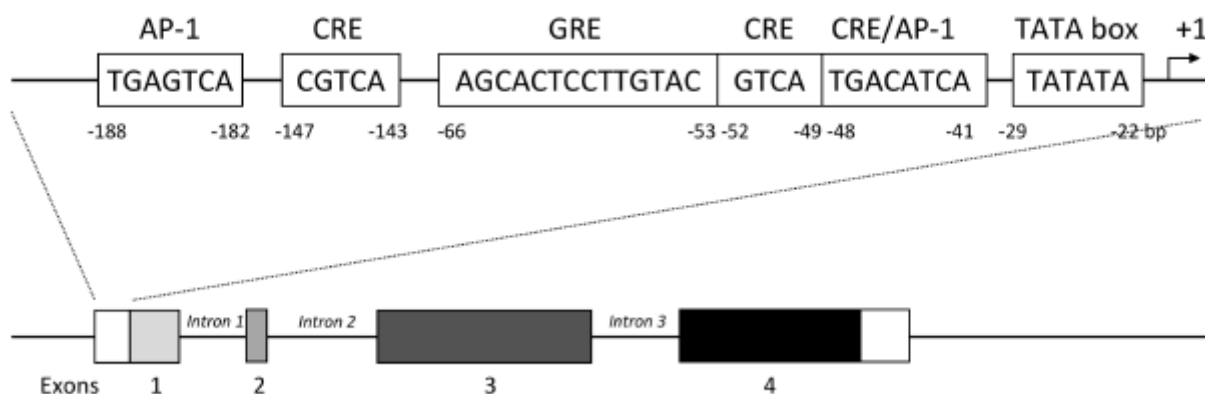


Figure 12 : Le gène de la neurotensine et sa séquence promotrice contenant les séquences éléments de réponse AP-1, CRE et GRE (d'après Rostene et Alexander, 1997).

L'estradiol (E2) augmente l'expression de la NTS dans plusieurs régions du cerveau exprimant le récepteur ER α chez le rat femelle en dépit de l'absence d'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) dans le promoteur du gène (Alexander, 1993 ; Alexander et Leeman, 1994), par activation de la voie AMPc (adénosine monophosphate cyclique)/protéine kinase A (PKA). L'estradiol induit l'accumulation

d'AMPC et favorise la phosphorylation de la protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPC (CREB). En effet, l'inhibiteur de la PKA peut bloquer l'action des œstrogènes sur la transcription de la NTS (Aronica et al., 1994 ; Watters et Dorsa, 1998).

C. Les récepteurs de la neurotensine

Les effets de la NTS sont principalement médiés par trois récepteurs (NTSRs). Les récepteurs NTSR1 et NTSR2 appartiennent tous deux à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Le site à haute affinité de NTSR1 ($K_d = 0.1-0.3$ nM) est sensible aux ions Na^+ et à la GTP (guanosine triphosphate). Le site de moindre affinité de NTSR2 ($K_d = 3-10$ nM), est moins sensible aux ions Na^+ et insensible à la GTP. Le troisième récepteur, NTSR3 (ou gp95/sortiline), présente une affinité pour la NTS entre 0,1 et 0,5 nM. (Mazella et al., 1988). Son gène code une protéine de 833 acides aminés contenant un peptide signal N-terminal, un site de clivage, un domaine luminal long, un seul domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (Mazella et al., 1998 ; Vincent et al., 1999). Ce récepteur est exprimé de manière quasi ubiquitaire dans les cellules normales. Il est majoritairement localisé dans le compartiment transgolgien et est considéré comme une protéine d'adressage (Vincent et al., 1999).

Dans les tumeurs, le NTSR1 est considéré comme le récepteur principal présidant aux effets de la NTS spécifiquement sur la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Kim et al., 2015). Le NTSR2 montre une distribution localisée et son expression a été détectée dans le cancer de la prostate et les cellules B (Swift et al., 2010) de la leucémie lymphocytaire chronique (Saada et al., 2012). Contrairement aux NTSR1 et NTSR2 qui sont spécifiques de la NTS (et des NN et xenopsine), le NTSR3 lie de nombreux autres facteurs, comme le RAP (receptor associated protein), le proNGF (précurseur du NGF, nerve growth factor) ou la lipoprotéine lipase (Nykjaer et Willnow, 2012).

La séquence peptidique du NTSR1 humain isolé à partir d'une lignée cellulaire de cancer du côlon, HT-29 (Vita et al., 1993) comprend 418 AA (46 kDa) et possède une séquence de 84 % d'homologie avec la séquence du rat (424 AA, 47 kDa). Il comprend sept hélices transmembranaires hydrophobes, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires, une courte extrémité C-terminale intracellulaire et une longue extrémité N-terminale extracellulaire (Tanaka et al., 1990) (Figure 13). La liaison de la NTS à la surface extracellulaire de NTSR1 induit les changements conformationnels des domaines intracellulaires, ce qui leur permet d'interagir avec les protéines G. La 3e boucle intracellulaire a été

identifiée pour interagir et activer la voie de signalisation Gq (Kitabgi, 2002) et la phospholipase A2 (PLA2). Alors que la partie proximale de l'extrémité C-terminale intracellulaire active Gs et Gi/Go (Gailly et al., 2000).

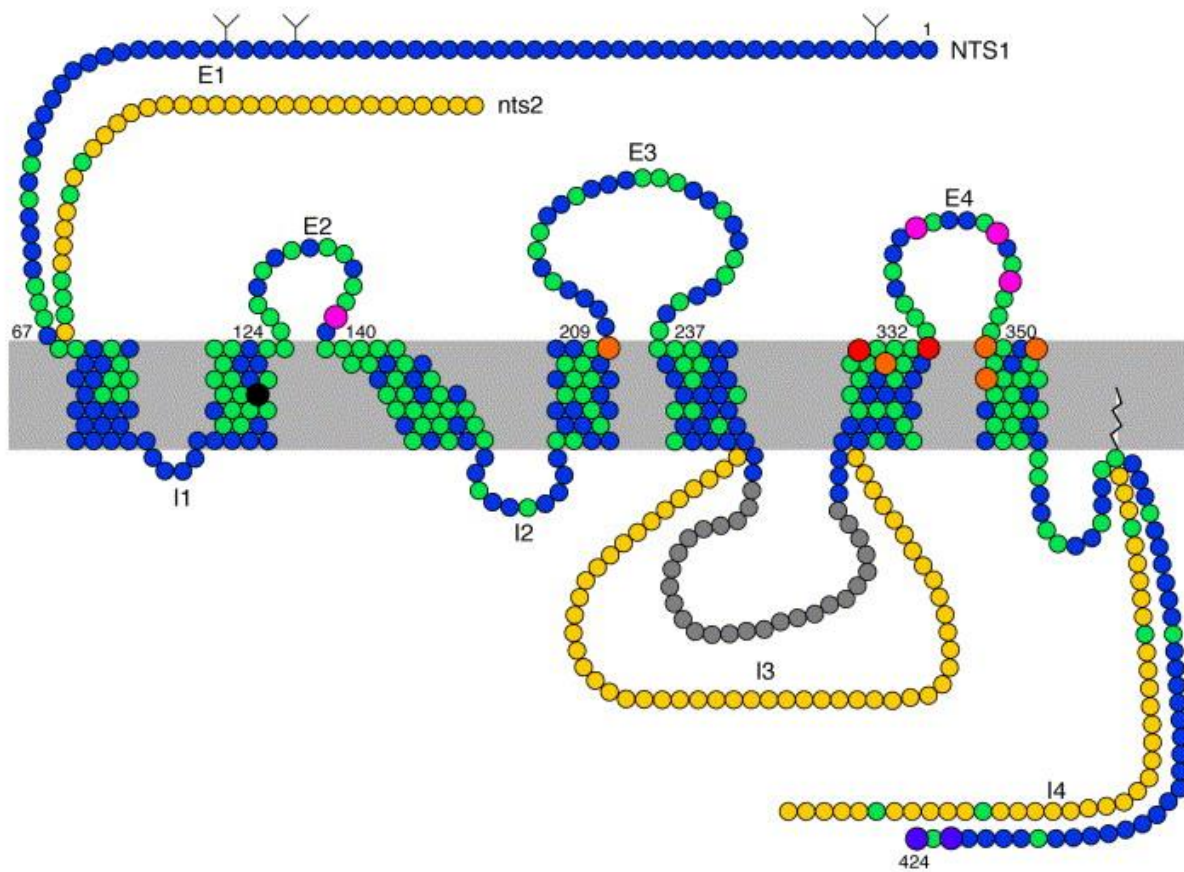


Figure 13 : Schéma représentant le NTSR1, récepteur à 7 domaines transmembranaires (d'après Vincent et al., 1999). E représente les boucles extracellulaires et I représente les boucles intracellulaires. Les AA invariants entre les récepteurs NTSR1 et NTSR2 sont colorés en vert, ceux qui diffèrent étant indiqués en jaune. Le site de liaison Na (Asp113) de NTSR1 est représenté en noir. Les AA en rose sont impliquées dans la liaison à la NTS, en orange SR48692 un antagoniste spécifique du NTSR1, ou en rouge pour les deux, Les AA en violet sont impliqués dans l'internalisation. La région intracellulaire (I3) essentiel pour le couplage à la phospholipase C est en gris.

Chez l'homme, l'ARNm (acide ribonucléique messager) codant le NTSR1 a d'abord été identifié par Northern Blot dans l'intestin grêle (Vita et al., 1993). Plus récemment, l'analyse par RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) a indiqué l'absence d'ARNm de NTSR1 dans la majorité des tissus humains normaux, y compris la prostate, le cœur, le thymus, l'ovaire et la glande mammaire (Elek et al., 2000).

L'interaction entre un ligand et un RCPG entraîne la transmission du signal extracellulaire à divers médiateurs intracellulaires. Cependant, pour éviter la stimulation excessive de la cellule cible, l'expression du récepteur membranaire est régulée par son ligand. Généralement, le signal de transmission s'accompagne d'une désensibilisation cellulaire rapide comprenant le découplage de la protéine G, suivie de la séquestration du récepteur activé dans les compartiments intracellulaires provoquant la disparition transitoire des sites actifs de la membrane, aboutissant à une inhibition de l'action. Après une période de latence, les cellules subissent une resensibilisation du signal par recyclage ou synthèse de novo du récepteur. Cette régulation de NTSR1 a été démontrée dans plusieurs lignées cellulaires (Turner et al., 1990). En effet, la préincubation d'un segment de colon de rat avec 5 nM de NTS pendant 20 minutes entraîne une diminution significative de la réponse à la NTS alors qu'elle est complètement supprimée avec 10 nM, puis un lavage complet du tissu la réhabilite (Mule et al., 1995). Un mécanisme majeur de désensibilisation est la phosphorylation de résidus spécifiques intracellulaires du NTSR1, entraînant le désaccouplement du récepteur de la protéine G (Ser415, Ser417 et Tyr416), suivi de l'internalisation du récepteur (Thr422 et Tyr424) (Chabry et al., 1995 ; Oakley et al., 2001), par des puits enduits de clathrine (Vandenbulcke et al., 2000).

Cependant, d'autres travaux montrent que les traitements chroniques avec une dose saturée d'agoniste modifient le trafic et induisent le recyclage du NTSR1 à la membrane après une accumulation transitoire dans le compartiment de recyclage périnucléaire dans plusieurs lignées cellulaires (CHO, CHP212 et N1E-115) (Najimi et al., 1998 ; Souazé et al., 1997 ; Toy-Miou-Leong et al., 2004). En outre, la transcription du gène du récepteur est stimulée si l'exposition à l'agoniste est très intense, persistante ou chronique (Najimi et al., 1998). Il en résulte la maintenance de l'activation des voies de signalisation associées au NTSR1 (Najimi et al., 2002b, Somai et al., 2002, Souazé et Forgez, 2006) (Figure 14).

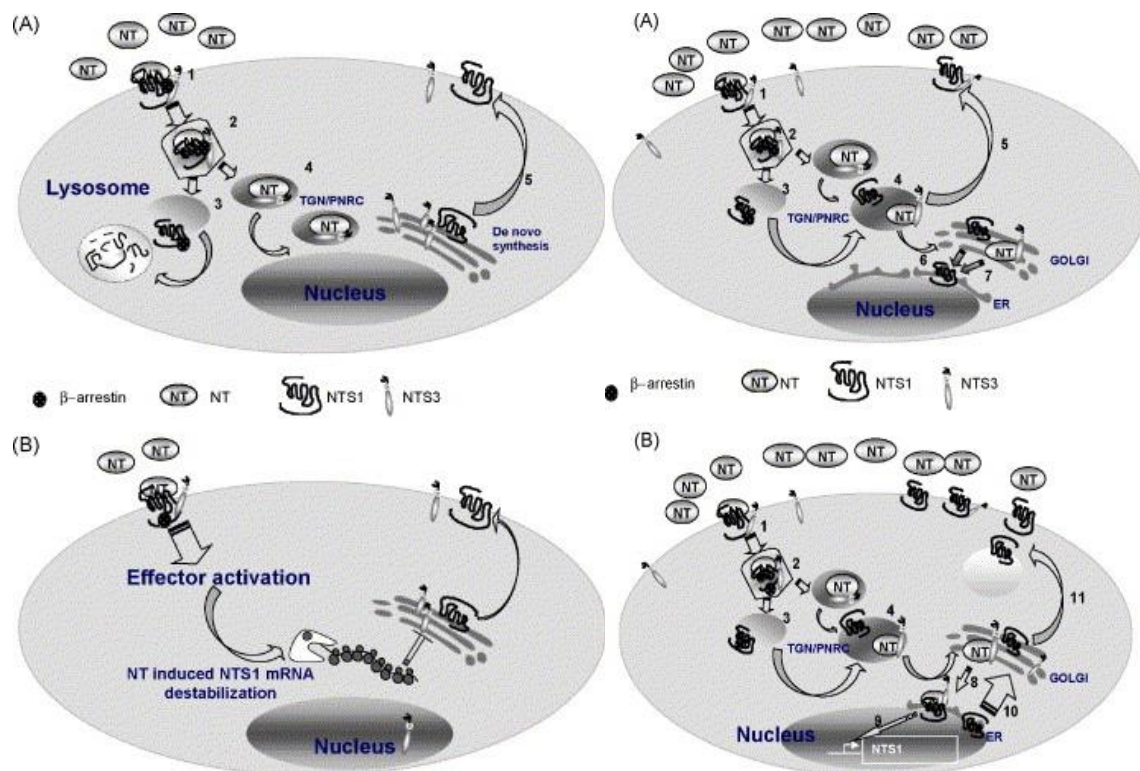


Figure 14 : Schéma représentant le transport cellulaire du couple NTS/NTSR1 (d'après Souazé et Forgez, 2006). En cas d'exposition aiguë / faible (à gauche, A), la resensibilisation s'effectue plusieurs heures après le signal par la synthèse de novo limitée de NTSR1 (B) ; en cas d'exposition chronique / forte (à droite, A), il existe un recyclage à la membrane plasmique, et à une accumulation dans les compartiments sous-membranaires ; la resensibilisation s'effectue immédiatement, et est amplifiée par une synthèse accrue de NTSR1 (B).

D. Physiologie de la NTS

La majorité des fonctions de la NTS concerne la digestion et la réponse inflammatoire dans le système digestif, ainsi que la modulation des stimuli au niveau du système nerveux central (SNC).

La NTS exerce un rôle physiologique dans l'amélioration de l'absorption des nutriments en :

- inhibant la sécrétion d'acide gastrique (Degolier et al., 1997)
- stimulant la sécrétion exocrine pancréatique et biliaire (Harada et al., 1986)
- inhibant la motilité intestinale (Kitabgi et Freychet, 1978 ; Mule et al., 1995)
- favorisant la translocation des acides gras (Armstrong et al., 1986).

De plus la NTS active l'immunité dans le tube digestif (Castagliuolo et al., 1999 ; Brun et al., 2005).

La NTS module les systèmes dopaminergique, serotonergique, GABAergique, glutamatergique et cholinergique (Nemeroff et al., 1977). La NTS préside notamment ainsi à :

- la diminution de l'activité locomotrice (Rouibi et Rompre, 2014)
- la diminution de la température corporelle et le sommeil (Nemeroff et al., 1980)
- un effet antinociceptif résultant de l'interaction avec le système opioïde (Mazella et Vincent, 2006 ; Nemeroff et al., 1979), l'analgésie étant médiée par le NTSR2 (Nouel et al., 1999)
- un effet anorexigène (Luttinger et al., 1982b).

La NTS est enfin impliquée dans le système cardiovasculaire, avec modulation de la fréquence cardiaque, la contractilité myocardique, la pression artérielle systémique, et la régulation des flux du tractus digestif (Osadchii, 2015).

E. Physiopathologie du complexe NTS / NTSR1

La NTS a été impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies neuropsychiatriques telles la schizophrénie, l'autisme, la maladie de Parkinson, les troubles des conduites alimentaires, mais également dans les pathologies inflammatoires et la progression tumorale que nous détaillerons ci-dessous (Boules et al., 2013).

1. Surexpression des NTS et NTSR1

La dérégulation de la voie neurotensinergique a été observée dans de nombreux cancers tels que l'adénocarcinome colique (Ulich et al., 1983), le cancer du poumon à petites cellules (Moody et al., 1985), le carcinome médullaire de la thyroïde (Baca et Schmidt-Gayk, 1981), le carcinome hépatocellulaire (Ehrenfried et al., 1994), le cancer du pancréas (Wang et al., 2011a), le cancer du sein (Dupouy et al., 2009), et le cancer du poumon non à petites cellules (Alifano et al., 2010). La NTS y est largement surexprimée par rapport aux tissus normaux correspondants. De même, le NTSR1 a été montré surexprimé dans les médulloblastomes (Giangaspero et al., 1985), les méningiomes (Mailleux et al., 1990), les tumeurs neuroendocrines (Kim et al., 2015) et les gliomes (Ouyang et al., 2015). L'expression aberrante de NTSR1 est également détectée dans la majorité des cancers solides et des lignées cellulaires cancéreuses, y compris lorsqu'elle est absente ou très faiblement exprimée dans les

tissus normaux correspondants comme dans le cancer du sein (Dupouy et al., 2009 ; Souazé et al., 2006), le cancer du colon (Gui et al., 2008), le cancer du pancréas (Wang et al., 2011a), l'adénocarcinome de prostate (Valerie et al., 2011), et le cancer du poumon non à petites cellules (Alifano et al., 2010). L'activation du complexe NTS / NTSR1 a été corrélée positivement à la croissance tumorale et à la survenue de métastases dans les tumeurs expérimentales du sein et du poumon (Dupouy et al., 2014, Younes et al., 2014). Il existe ainsi de nombreux arguments qui permettent de considérer le complexe NTS / NTSR1 comme un acteur majeur de la progression du cancer (Dupouy et al., 2011).

2. Les voies de signalisation

Les voies de signalisation consécutives à l'interaction NTS/NTSR1 ont été étudiées dans plusieurs lignées cellulaires et sont résumées dans la Figure 15. La NTS via le couplage du NTSR1 avec la sous-unité $G\alpha_q/11$ conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC) (Wang et Wu, 1996) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), un phospholipide membranaire, en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP₃). Tandis que l'IP₃ accroît la concentration intracellulaire en calcium aboutissant à la régulation de nombreux gènes via HDAC notamment, le DAG induit la stimulation de la protéine kinase C (PKC) (Amar et al., 1986 ; Bozou et al., 1989 ; Turner et al., 1990). Ceci est confirmé par le blocage de l'activation de la PKC par l'antagonisation spécifique du NTSR1 par le SR48692.

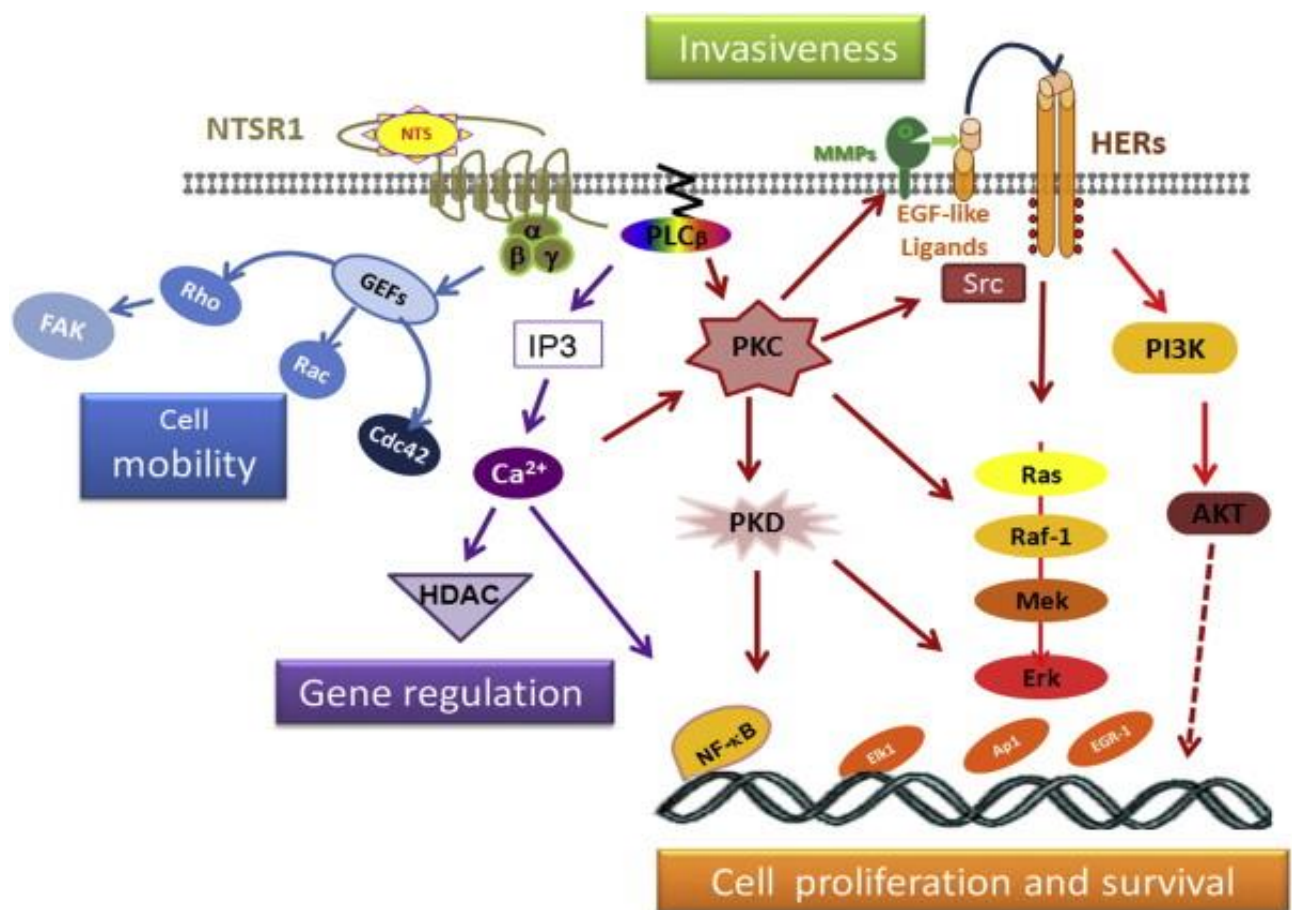


Figure 15 : Voies de signalisation consécutives à l'interaction NTS/NTSR1 (d'après Dupouy et al., 2011). NTS interagit avec NTSR1 pour activer trois voies majeures : en bleu, l'activation des petites GTPases, qui sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette cellulaire et la mobilité ; en violet, la mobilisation intracellulaire du Ca^{2+} qui est impliqué dans de nombreuses régulations génétiques ; en orange, la voie de la PKC/D aboutissant à l'activation directe de ERK, ou indirecte par la transactivation de l'EGFR.

Les effets oncogènes de prolifération cellulaire et de survie induits par la NTS sont donc en grande partie dépendants de la PKC. L'activation de la PKC peut induire ainsi :

- la stimulation de la cascade des MAP-kinases (MAPK), et notamment ERK 1/2 (Muller et al., 2011)
- la stimulation de la PKD1 (Guha et al., 2002), conduisant à une prolifération cellulaire et agissant comme un amplificateur de progression du cancer motilité et l'angiogenèse (LaValle et al., 2010)
- la transactivation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) par la libération de plusieurs de ses ligands par clivage protéolytique de pro-ligands membranaires impliquant des protéines de la famille des métalloprotéases (Zhao et al., 2004), ainsi que par la phosphorylation d'EGFR en

Tyr845 et de C-Src, activateur de la transcription 5b (Stat5b) associée à l'expression de gènes de prolifération, de différenciation et de survie (Amorino et al., 2007).

Dans les cellules de cancer de la prostate PC-3, la NTS stimule la mitogenèse par une transactivation d'EGFR dépendante de PKC (Hassan et al., 2004). Au contraire, dans la lignée cellulaire du cancer du pancréas Panc-1, la NTS stimule le c-Raf-1-MEK-ERK puis induit la synthèse de l'ADN indépendamment de la transactivation de l'EGFR (Guha et al., 2003), suggérant que la PKC stimule directement Raf-1 indépendamment de l'activation de Ras.

Enfin, les petites RhoGTPases Rac1 et Cdc42 sont responsables du potentiel de migration cellulaire, par action sur le cytosquelette. Dans la lignée cellulaire du glioblastome humain U373, la NTS a été associée à la stimulation de l'activité des protéines Rac1 et Cdc42 mais pas à RhoA, ce qui a été corroboré à d'autres données obtenues sur des cellules épithéliales du côlon humain surexprimant NTSR1 (Zhao et al., 2003). De plus, dans les cellules cancéreuses pulmonaires à petites cellules, la NTS active la phosphorylation de la tyrosine de FAK (*focing adhesion kinase*), également impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire (Leyton et al., 2002).

3. *Processus impliqués*

Les principaux processus impliqués dans la progression tumorale via l'activation du complexe NTS/NTSR1 sont donc la prolifération cellulaire, la survie, la migration, l'invasion et la néoangiogénèse (Figure 16).

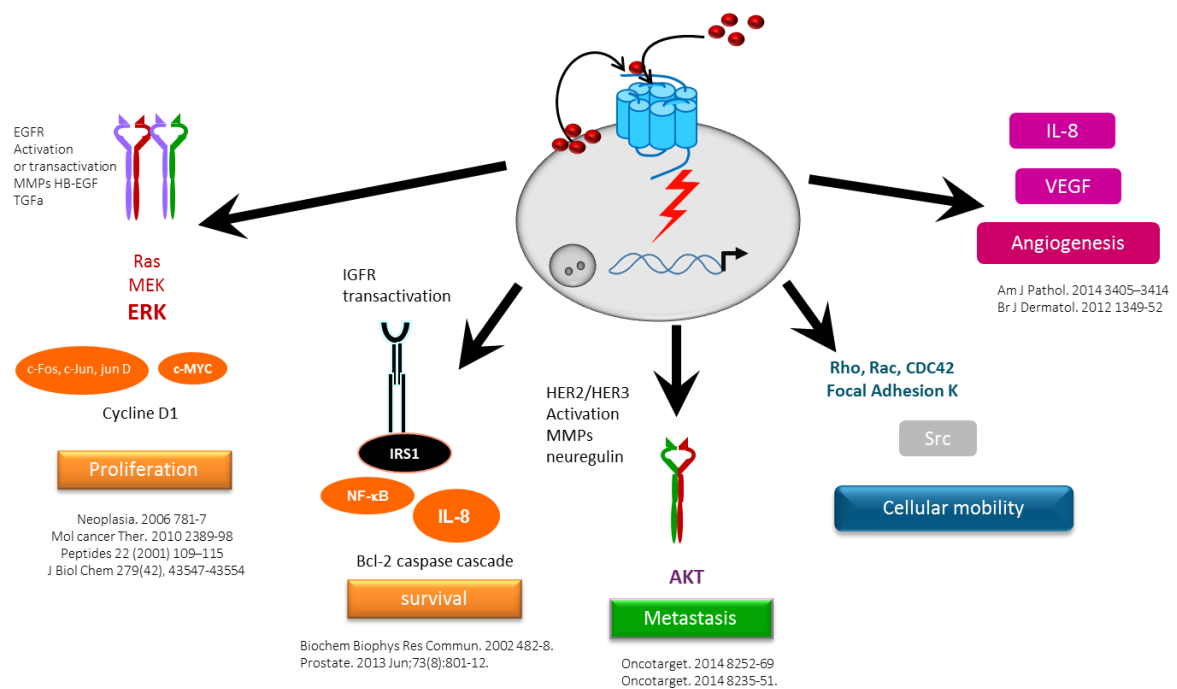


Figure 16 : Principaux processus impliqués dans la progression tumorale via l'activation du complexe NTS/NTSR1 : prolifération cellulaire, survie, migration, invasion et néoangiogénèse (d'après Wu et al., 2012).

La NTS induit en effet la stimulation de la prolifération des cellules tumorales du pancréas, du colon, de la prostate et du cancer pulmonaire à petites cellules (Guha et al., 2002 ; Seethalakshmi et al., 1997). Les effets anti-apoptotiques induits par la NTS ont été décrits dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein MCF-7. Ces effets ont été accompagnés d'une augmentation concomitante de l'expression de la protéine Bcl-2, en lien avec la stimulation des MAPK et de l'EGFR.

L'analyse du transcriptome du carcinome épidermoïde du pharynx exposées traitée à la NTS a confirmé la surexpression de gènes impliqués dans le processus métastatique comme la MMP-1 (matrix metalloproteinase) et l'interleukine IL-8 (Shimizu et al., 2008). De même, la NTS accélère la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein (Souazé et al., 2006 ; Dupouy et al., 2014), du colon (Wang et al., 2006), et du pancréas (Mijatovic et al., 2007) notamment.

Enfin, la NTS peut favoriser la néoangiogénèse via le récepteur de l'urokinase (Ushiro et al., 1997), IL-8 et le CXCL1 (CXC Motif Chemokine Ligand 1) avec activation simultanée (Tang et al., 2012).

F. Pharmacologie de la neurotensine

1. Agoniste de la NTS

La dégradation rapide de la NTS limite les études des processus biologiques associés à ses effets à long terme. Pour surmonter ce problème, un agoniste stable a été développé : le JMV 449, qui est un analogue du fragment 8-13 de la NTS (H-Lysψ(CH₂NH)Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH), présentant le même profil pharmacologique et une affinité sensiblement comparable pour les récepteurs à la NTS.

Les données pharmacocinétiques démontrent que la dégradation rapide de la NTS et sa faible concentration dans la circulation sanguine générale limitent ses effets sur le site de production. Cependant, les formes longues de NTS et NN et les métabolites amino terminaux de la dégradation du peptide ont généralement une stabilité plasmatique plus élevée et sont détectables dans la circulation sanguine périphérique à un taux plus élevé (Friry et al., 2002). Les formes moléculaires longues de la NTS et de la NN sont capables de lier et d'activer le NTSR1, bien qu'avec une affinité 5 à 10 fois inférieure à la NTS ou la NN (Friry et Al., 2002).

Characteristic	NT receptor subtypes		
	NTS ₁ (NTRH)	NTS ₂ (NTRL)	NTS ₃ (gp95/sortilin)
Cloned	rNTS ₁ , mNTS ₁ , hNTS ₁	RNTS ₂ , mNTS ₂ , hNTS ₂	HNTS ₃
Receptor size	50–60 kDa	mNT 2–45 kDa	100 kDa
Receptor classification	G-protein-coupled	G-protein-coupled	Type I amino acid receptor single transmembrane-spanning region
Agonists	7-transmembrane spanning regions • NT($K_d=0.1-0.3$ nM) • NN (neuromedin) • Xenopsin JMV449 (peptide analog of NT resistant to peptidase)	7-transmembrane spanning regions • NT($K_d=3-10$ nM) • NN • Xenopsin • SR48692 (expressed in oocytes or Chinese Hamster Ovary cells) • SR142948A (expressed in oocytes or CHO cells) • Levocabastine (expressed in oocytes or CHO cells) • NT (expressed in oocytes or CHO cells) • SR142948A	• NT($K_d=0.1-0.3$ nM) • Receptor associated protein, a 40 kDa endoplasmic reticulum resident protein • Cleaved sortilin propeptide
Antagonists	• SR48692 • SR142948A • D-Trp¹¹-neurotensin	• Levocabastine (weak agonist)^a	• Uncleaved sortilin propeptide functional antagonist blocks agonist binding until cleaved from receptor • SR48692 and SR142948A do not block NT binding in COS-7 cell extracts but block NT effects in cancer cell lines.

Figure 17 : Caractéristiques des récepteurs de la NTS, agonistes et antagonistes (d'après Kleczkowska et Lipkowski, 2013).

2. Antagoniste non peptidique

Le SR 48692, antagoniste non peptidique du NTSR1, qui passe la barrière hémato-encéphalique, a été développé dans le cadre de la schizophrénie. Comparé à la NTS, le SR 48692 a une affinité inférieure pour le NTSR2 que pour le NTSR1 (Gully et al., 1997) (Figure 17).

La contribution du complexe NTS/NTSR1 dans la stimulation de la croissance tumorale a été rapportée dans plusieurs études en profitant d'antagonistes NTSR1 spécifiques, SR48692 et SR142948A (Gully et al., 1997). Une diminution d'au moins 50 % dans le volume et le poids de la tumeur a été observée chez les xénogreffes de cellules cancéreuses du colon lorsque des animaux ont été traités quotidiennement avec un antagoniste NTSR1 (Maoret et al., 1999, Moody et al., 2001, Liu et al., 2017).

3. Antagoniste peptidique

Le laboratoire INSERM U1007 a conçu et produit deux anticorps monoclonaux anti-NTS. Un anticorps a été développé à partir du peptide mature actif (13 AA) mAb NTS. Un deuxième a été développé à partir d'une séquence du fragment non mature de la NTS, mAb FL NTS. Ils ont été sélectionnés sur leurs propriétés neutralisantes in vitro et sur la stabilité des hybridomes. Ces anticorps montrent une efficacité thérapeutique sur la croissance de tumeurs expérimentales pulmonaires avec une diminution des taux de croissance de 2 à 3 fois (études préliminaires).

IV. Objectifs de la thèse

Les données présentées dans l'introduction suggèrent l'hypothèse que lorsque le NTSR1 est continuellement activé par la NTS, le système neurotensinergique contribue à la progression de la tumeur, à la survenue de métastases, et par conséquent au mauvais pronostic. Le complexe NTS/NTSR1 favorise ainsi la progression du cancer par la prolifération cellulaire, la survie, la migration, l'invasion et la néoangiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Ces données suggèrent également que l'inhibition de NTS/NTSR1 est une stratégie potentiellement intéressante pour les patients porteurs de tumeurs NTS+/NTSR1+. Cependant, jusqu'à ce jour, aucune donnée concernant le système neurotensinergique dans les cancers de l'endomètre et de l'ovaire n'était disponible dans la littérature scientifique.

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la surexpression anormale de NTS et NSTR1 dans les cancers de l'endomètre et de l'ovaire favoriserait la progression néoplasique et diminuerait la survie.

Nous avons ainsi comme objectifs de :

- étudier l'expression de la NTS et du NTSR1 dans l'endomètre et l'ovaire normal et dans les adénocarcinomes correspondants
- rechercher un lien entre l'expression du NTSR1, les facteurs histopronostiques, le stade et la survie dans les adénocarcinomes de l'endomètre et de l'ovaire
- corrélérer l'expression du NTSR1 avec les marqueurs de prolifération (Ki67 et MCM6) dans l'adénocarcinome endométrial
- évaluer le rôle du système neurotensinergique dans la résistance au platine dans l'adénocarcinome ovarien
- déterminer les mécanismes inhérents à la surexpression de NTSR1, en s'attachant à étudier l'amplification de son gène et la méthylation de son promoteur.

VI. Méthodes

A. Cohortes clinico-pathologiques locales

Deux cohortes clinico-pathologiques ont été constituées :

- une série d'adénocarcinomes endométriaux
- une série d'adénocarcinomes ovariens.

Série d'adénocarcinomes endométriaux

Cent cas consécutifs d'adénocarcinomes endométriaux, dont 89 de type endométrioïde, ont été colligés rétrospectivement à partir des dossiers du Département de Pathologie (CHRU de Nancy, France), du 1er janvier 2000 au 30 juin 2008. Soixante-six échantillons d'endomètre non tumoral ont également été colligés, y compris des échantillons d'endomètre normal (n = 17), des polypes endométriaux (n = 14) et des cas d'hyperplasies endométriales simples (n = 13), complexes (n = 9) et atypiques (n = 13).

Les principales données cliniques ont été recueillies rétrospectivement auprès du Département de Chirurgie Gynécologique (CHRU de Nancy, France) et du Département de Radiothérapie (Institut de Cancérologie de Lorraine, France) :

- âge, circonstance de découverte, taille, poids, IMC, parité
- âge de la ménarche et de la ménopause, avec calcul de la durée de la période reproductive
- les antécédents d'HTA, de diabète de type 2, de cancer du sein et de THM
- les stades TNM et FIGO
- les groupes de risque de l'ESMO (*European Society for Medical Oncology*)
- le traitement, incluant la chirurgie, et éventuellement la réalisation d'une radiothérapie externe, d'une curiethérapie, et d'une chimiothérapie
- les dates de chirurgie, récurrence, décès, et dernières nouvelles.

Série d'adénocarcinomes ovariens

Quarante-six cas consécutifs de tumeurs ovariennes ont été colligés à partir des fichiers du Département de Pathologie du CHU de Cochin Port-Royal (AP-HP, Paris, France). Dix échantillons ovariens bénins ont également été étudiés (CHRU de Nancy, Nancy, France).

Les principales données cliniques ont été recueillies rétrospectivement auprès du Département de Chirurgie Gynécologique (Cochin Port-Royal, AP-HP, France) :

- âge, taille, poids, IMC, gestité, parité, période reproductive
- les antécédents d'endométriose, de cancer du sein et de THM
- les stades TNM et FIGO
- les résultats de recherche de mutation génétique (*BRCA*)
- le traitement, incluant la chirurgie, et la chimiothérapie en situation adjuvante ou néo-adjuvante
- les dates de chirurgie, récurrence, décès, et dernières nouvelles.

B. Cohortes du TCGA

Série d'adénocarcinomes endométriaux

Les données de la cohorte d'adénocarcinomes de l'endomètre (UCEC) du *Cancer Genome Atlas* (TCGA), constitué de 373 cas (<http://cancergenome.nih.gov/>), initialement publié dans Nature (Kandoth et al., 2013), ont été récupérées à l'aide du site cBioPortal (NCI, 2008 ; Gao et al., 2013).

Les données suivantes ont été recueillies :

- âge de la patiente
- type et grade histologique et stade FIGO
- groupes de risque de l'ESMO, statuts MLH1 et MSI
- les statuts et durée de survie globale et sans récurrence.

Nous avons également recueilli et analysé les niveaux d'expression en ARNm (RNASeqV2 - Agilent, AffymetrixHuEx, Affymetrix U133A), exprimés en z-scores, des gènes suivants : *NTSR1*, *NTS*, *MCM6* et *MKI67* (Ki-67), disponibles dans 333 cas, ainsi que la variation du nombre de copies (CNA) pour *NTSR1*.

De plus, l'état de méthylation du promoteur du gène *NTSR1*, obtenu par la méthode Illumina Human Methylation 450 (HM450) pour 17 îlots CpG, a été analysé dans 221 cas. Un statut méthylé était défini par une valeur bêta supérieure à 0,20.

Série d'adénocarcinomes séreux de l'ovaire

Les données de la cohorte d'adénocarcinomes séreux de l'ovaire du TCGA, constituée de 491 cas (<http://cancergenome.nih.gov/>), initialement publiées dans Nature (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011), ont également été récupérées à l'aide du site cBioPortal.

Les données suivantes ont été recueillies :

- l'âge de la patiente
- le grade histologique (grade 2 / grade 3) et le stade FIGO
- le statut de résistance au platine
- les statuts et durée de survie globale et sans récurrence.

Nous avons également recueilli et analysé les niveaux d'expression en ARNm (RNASeqV2 - Agilent, AffymetrixHuEx, Affymetrix U133A), exprimés en z-scores, pour le *NTSR1* et la *NTS*.

C. Histologie

Pour les deux cohortes locales, un bloc représentatif de tissu de paraffine fixé par la formaline à partir de chaque cas a été sélectionné afin de confirmer le diagnostic histologique (adénocarcinome endométrial, hyperplasie typique et atypique, endomètre normal, adénocarcinome de l'ovaire, tumeur borderline de l'ovaire, ovaire normal) et de pratiquer l'étude sur le bloc le plus représentatif. Chaque cas a été vérifié par examen microscopique sur l'ensemble des lames colorées par l'hématoxyline éosine safran (HES).

Dans les cas de carcinome endométrial, le sous-type histologique, selon les critères de classification de l'OMS, l'invasion du myomètre, la présence d'embolie néoplasique, l'invasion locale et ganglionnaire le cas échéant, ont été examinés par deux pathologistes expérimentés.

D. Immunohistochimie

1. Marquage

- Après inclusion en paraffine, réalisation de coupes fines (5µm) montées à l'eau sur des lames de verre PolysineTM (LABONORD S.A, Templemars, France).
- Séchage pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis passage à l'étuve à 56 °C pendant quelques heures.
- Déparaffinage et démasquage des sites antigéniques dans l'appareil PT Link (Dako) en tampon citrate de sodium 10 mM (pH 6) pendant 20 minutes à 97°C
- Dilution si nécessaire des anticorps primaires dans le diluant EnVisionTM FLEX Antibody Diluent (DM 830)
- Technique Flex + en automate Dako Autostainer Plus
- Rinçage avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 pendant 5 min
- Blocage des peroxydases endogènes avec le réactif EnVisionTM FLEX Peroxidase Blocking Reagent (SM 801)
- Rinçage pendant 5 min
- Incubation avec l'anticorps primaire (30 min ; sauf NTS, incubation sur la nuit)
- Rinçage pendant 5 min
- Incubation de l'anticorps secondaire EnVisionTM FLEX+ (adapté) pendant 15 min
- Rinçage pendant 5 min
- Dépôt d'un polymère marqué avec EnVisionTM FLEX/HRP (SM802) (dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules secondaires de chèvre dirigées contre les immunoglobulines de lapin et de souris dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur) pendant 20 min
- Rinçage pendant 2 x 5 min
- Révélation avec EnVisionTM FLEX Substrate Buffer (SM 803) (solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le 3'3-diaminobenzidine (DAB)) pendant 10 min
- Rinçage pendant 5 min

- Contre coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) pendant 5 min
- Rinçage pendant 5 min à l'eau distillée
- Montage à l'Eukitt® (LABONORD S.A., Templemars, France) après déshydratation par des bains successifs d'éthanol à 70°, 96° et 100°.

2. Anticorps

L'expression de NTSR1 a été évaluée avec un anticorps primaire anti-NTSR1 (1/50, chèvre polyclonal sc-7596, Santa Cruz, États-Unis). La validation de l'anticorps a été effectuée avec comme contrôle positif des cellules du muscle lisse de côlon humain normal. Le marquage a été neutralisé avec une préincubation avec l'antigène ainsi qu'en omettant l'anticorps primaire (Figure 18) (Souazé et al., 2006). En outre, le marquage du NTSR1 était absent dans les tumeurs expérimentales pulmonaires générées à partir de cellules n'exprimant pas le NTSR1 (Alifano et al., 2010). Des contrôles internes positifs (cellules endothéliales) et des témoins négatifs (sans anticorps primaire) ont été utilisés.

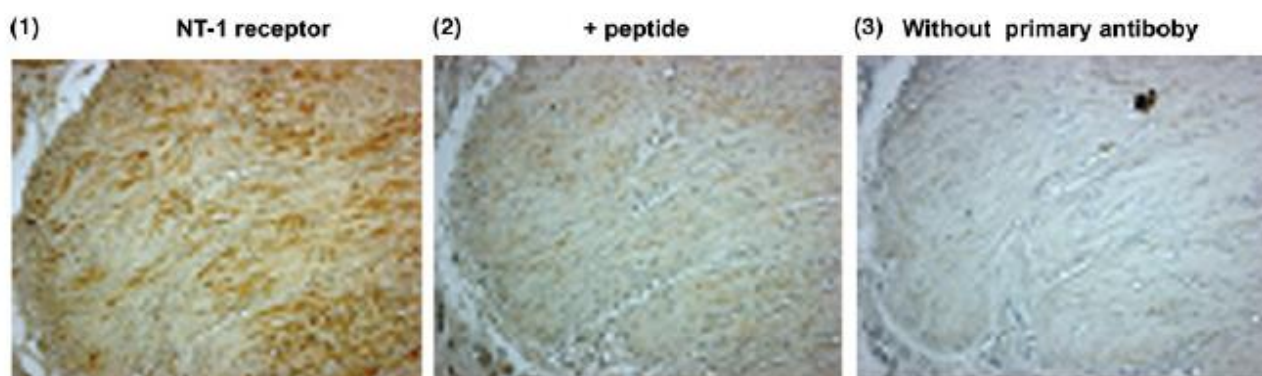


Figure 18 : Expression de NTSR1 dans le muscle lisse du côlon humain normal en tant que (1) témoin positif, (2) préincubé avec le peptide et (3) sans anticorps primaire (Souazé et al., 2006).

En outre, l'expression de la NTS a été évaluée dans 18 échantillons d'adénocarcinome de l'endomètre, 20 échantillons d'hyperplasie et 10 échantillons d'endomètre normal, ainsi que pour l'ensemble des tissus ovariens, en utilisant un anticorps dirigé contre le fragment long de la NTS (1/500 pour l'endomètre et 1/200 pour l'ovaire, *overnight*, anticorps monoclonal de souris, homemade).

Les expressions de p53, MSH6 et PMS2 ont été évaluées dans l'ensemble des cas d'adénocarcinomes endométriaux, avec les anticorps primaires suivants : p53 (1/60, souris monoclonal, DO7, Novocastra,

Newcastle, Royaume-Uni), MSH6 (prêt à l'emploi, lapin, monoclonal, EP49, Dako Cytomation, Glostrup, Danemark), et PMS2 (prêt à l'emploi, lapin, monoclonal, EP51, Dako Cytomation).

Les expressions de MCM6 et de Ki-67 ont été recherchées en utilisant des anticorps primaires, anti-MCM6 (1/400, chèvre polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne) et anti-Ki-67 (1/200, souris monoclonal, MIB-1, DakoCytomation, Glostrup, Danemark).

E. Méthodes de quantification en immunohistochimie

1. *NTSR1 et NTS*

Les marquages cytoplasmique et membranaire pour le NTSR1 ont été évalués tout d'abord à l'aide d'un score semi-quantitatif. L'intensité du marquage a été classée comme suit : 1, faible; 2, moyen; et 3, fort. Un score a été obtenu en multipliant le pourcentage de cellules positives par le niveau d'intensité (score allant de 0 à 300). La lecture a été effectuée de manière indépendante par deux observateurs (G.G. et M.A.). Une valeur moyenne a ensuite été calculée.

En outre, une valeur normalisée de marquage global pour le NTSR1 et la NTS a été obtenue pour les tissus endométriaux en utilisant une méthode d'analyse d'image semi-automatique avec Adobe Photoshop CS2 9.0 (Adobe Systems Incorporated, USA) et Image J 1.42 u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Pour chaque cas, l'acquisition a été effectuée avec la caméra Olympus DP72 au grossissement x100 dans la zone de marquage d'intensité maximale. Ensuite, les zones marquées ont été sélectionnées et copiées dans de nouveaux fichiers JPEG, en utilisant l'outil de sélection Adobe Photoshop Color Range, en pointant une zone marquée avec l'outil de sélection *Sampled Colors*, puis en ajustant sous contrôle visuel avec la barre *Fuzziness*. Après la conversion des images obtenues en niveaux de gris (*Mode/Grayscale*) et en inversion des niveaux de gris avec la fonction *Invert*, la densité intégrée a été mesurée avec ImageJ avec l'outil *Measure*, puis report de la valeur de la colonne IntDen (Gauchotte et al., 2017).

2. *Autres anticorps*

Une tumeur a été considérée comme positive pour p53, lorsque le marquage nucléaire était modéré à fort dans plus de 80 % des cellules tumorales ou lorsque le marquage était strictement absent dans les

cellules tumorales, avec des témoins internes positifs (Alvarez et al., 2012 ; Alkushi et al., 2004). L'expression de MSH6 et de PMS2 a été considérée comme perdue, lorsqu'il y avait une absence complète de coloration nucléaire des cellules tumorales en présence de contrôles positifs internes dans l'endomètre normal, les cellules stromales ou les lymphocytes (Orbo et al., 2003 ; Djordjevic et al., 2013).

L'expression de MCM6 et Ki-67 a été calculée par le pourcentage de cellules présentant l'expression nucléaire, comptant 500 cellules dans les zones les plus marquées (*hotspots*) (Vigouroux et al., 2015). Le marquage nucléaire a été considéré comme positif indépendamment de son intensité. Les scores ont été effectués indépendamment par deux observateurs (J.H. et M.A.). Les valeurs moyennes ont ensuite été calculées. Les deux observateurs ont réévalué indépendamment les échantillons en cas de différences de cotation importantes ($\geq 20\%$). Les valeurs moyennes ont été calculées après réévaluation.

F. Extraction d'ARN et RT-PCR

Les 12 échantillons congelés d'intérêt (10 cas d'adénocarcinomes endométriaux et 2 cas d'endomètre normal) ont été microdisséqués en choisissant soigneusement la zone d'intérêt. Ont été utilisées comme témoins positifs, des cellules des lignées cellulaires d'adénocarcinomes ovariens A2780 et SKOV3.

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les recommandations du fabricant. La transcription inverse a été réalisée en utilisant un kit de synthèse d'ADNc (GE Health Care, UK). La PCR a été effectuée sur un Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sidney, Australie), avec un mix *ad hoc* Absolute Blue QPCR SYBr Green Mix Plus ROX Vial (Thermo Scientific, UK), selon les protocoles standards.

Les réactions ont été effectuées selon le cycle suivant : 95°C pendant 15 min et 40 cycles de 95°C pendant 30 s, puis à 56°C (pour la NTS) et 58°C (pour le NTSR1 et l'actine) pendant 30 s, puis 72°C pendant 30 s, avec une incubation prolongée de la séquence d'amorces de 72°C pendant 15 min.

Les amorces utilisées sont détaillées dans le Tableau 1 (Giorgi et al., 2008 ; Taylor et al., 2012). Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (Agarose haute résolution, Eurobio, France).

Gène	Séquence (5' → 3')
Actine (forward)	ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA
Actine (reverse)	GGG ATA GCA CAG CCT GGA TAG CA
NTS (forward)	GCT TTA GCT TGG AAG CAA TGT T
NTS (reverse)	TCA TAC AGC TGC CGT TTC AG
NTSR1 (forward)	GGC GCC TCAT GTT CTG CTA
NTSR1 (reverse)	GTG CGT TGG TCA CCA TGT AGA

Tableau 1 : Séquences des primers utilisés pour la RT-PCR de l'actine, la NTS et le NTSR1.

G. Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Une FISH de *NTSR1* a été réalisée dans 20 cas de carcinomes endométriaux.

Des sections de paraffine de 5 µm sur lame ont été déparaffinées avec du toluène 2 x 5 min, puis trempées dans l'alcool à 100 ° / 70 ° 2 x 2 min chacune. Après hydratation, les lames ont été immergées dans le tampon de prétraitement (Dako) pendant 11 min à 97°C et 15 min à température ambiante. Après le lavage dans le tampon de lavage DAKO 2 x 3 min, elles ont été recouvertes d'une goutte de pepsine pendant 20 min à 37°C (Dako) avant nouveau lavage et déshydratation (70 % d'éthanol, 85 % d'éthanol et 100 % d'éthanol pendant 2 min) à température ambiante.

Trois microlitres de sondes fluorescentes spécifiques du centromère du chromosome 20 (Cytocell Ltd, Royaume-Uni) et 1 microlitre de sondes spécifiques du *NTSR1* orange-rouge customisées (Agilent Technologies, États-Unis) dans 6 microlitres d'une solution d'hybridation ont été appliquées.

La co-dénaturation de la sonde et de l'ADN cible a été effectuée sur une plaque chauffante à 90°C pendant 5 min. Les lames ont été incubées pendant 17h dans une chambre humide pour l'hybridation puis lavées dans un tampon de lavage stringent (Dako) à 65°C pendant 10 min et par un second lavage (2 x 3 min dans le tampon de lavage (Dako)) à température ambiante puis déshydratées dans une concentration croissante d'éthanol (70 %, 85 %, 100 %) pendant 2 min à température ambiante.

Les noyaux ont été contre-colorés avec 10 µL de DAPI (Dako) puis la lame a été recouverte. Les lames ont été stockées à 4°C pendant 10 min. Pour chaque cas, l'acquisition a été effectuée avec la caméra à

fluorescence Olympus DP72 au grossissement x630 (DAPI / FITC / Texas Red).

H. Analyses statistiques

Le test de χ^2 de Pearson pour comparer les variables qualitatives et le test U de-Mann & Whitney (deux groupes) ou le test de Kruskal-Wallis avec post-analyse de Duns (plus de deux groupes) pour les variables quantitatives, ont été utilisés.

Les coefficients de corrélation de Spearman ont été calculés pour évaluer la corrélation entre les différents niveaux d'expression des ARNm en z-score.

Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Afin de tester la fiabilité du score semi-quantitatif entre les deux évaluateurs, le coefficient de corrélation intraclasse (CCI) a été calculé, avec l'intervalle de confiance de 95 % (IC95 %).

Les fonctions de survie ont été réalisées avec un modèle de Cox univarié et multivarié (*step by step*) et le test du log-rank avec la méthode Kaplan-Meier (seuils pour les variables quantitatives : médiane, 75e percentile, 90e percentile (pour le NTSR1)).

Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.3, et du logiciel free R (version 3.2.4) et ses compléments : survie et ICC (R Core Team, 2015 ; Therneau, 2015 ; Pohlert, 2014).

I. Considérations éthiques

Les recherches présentées ici ont été menées conformément aux principes de la Déclaration d'Helsinki et en accord avec les lois françaises sur la recherche biomédicale (numéro CPP DC2008-459, déclaration CNIL numéro 1209171).

VI. Résultats

Partie 1 - Adénocarcinome de l'endomètre

A. Caractéristiques des populations

1. Cohorte locale

Les caractéristiques cliniques et histologiques des cas d'adénocarcinomes de l'endomètre de la cohorte du CHRU de Nancy sont présentées dans le Tableau 2. L'âge moyen des patientes au diagnostic était de 67,6 ans. Les patientes présentaient les facteurs de risque classiques du carcinome endométrial : obésité (41 %), surpoids (21 %), hypertension (53 %) et diabète de type 2 (20 %). La grande majorité des patients étaient post-ménopausiques (92 %).

Les circonstances diagnostiques comprenaient des saignements post-ménopausiques (81 %), des ménométrorragies pré-ménopausiques (5 %) et des douleurs pelviennes (4 %).

Le sous-type histologique prédominant était l'adénocarcinome endométrioïde (89 %). La répartition selon le grade histologique était la suivante : grade 1 (40 %), grade 2 (40 %), grade 3 (20 %). Un statut N+ était présent dans 6,8 % des cas analysés. La majorité des tumeurs étaient de stade FIGO I avec 56 % de stade Ia et 23 % de stade Ib ; 11 % des patientes étaient métastatiques.

Le suivi médian était de 35 mois. Treize patientes sont décédées des suites du carcinome de l'endomètre. La survie globale était significativement corrélée avec le grade histologique ($p = 0,016$), l'extension vaginale ($p = 0,0025$) et le statut métastatique ($p < 0,0001$). Dans le sous-type endométrioïde, l'extension vaginale, l'invasion myométriale et le stade tumoral FIGO étaient corrélés significativement avec la survie globale (SG, $p < 0,001$; log-rank). La présence de métastases était également un marqueur significatif de mauvais pronostic (SG, $p < 0,001$; log-rank). Le statut N+ n'était corrélé ni avec la SG (test log-rank, $p = 0,1$; log-rank) ni avec survie sans progression (SSP) ($p = 0,5$; log-rank).

Nous avons également effectué une immunohistochimie pour p53, MSH6 et PMS2. P53 était surexprimée dans 10,7 % des cas (9/84), sans aucun cas strictement négatif. Une perte d'expression de MSH6 et PMS2 était trouvée dans 8 % (7/88) et 15,9 % (14/88) des cas, respectivement.

Données cliniques (n=100)	Moyenne $\pm$ DS ou % de patientes
Age (années)	67.58 $\pm$ 11.26
Période reproductive (années)	38.07 $\pm$ 4.94
IMC (kg/m ²)	29.32 $\pm$ 7.48
Parité	2.00 $\pm$ 1.68
Hypertension artérielle	53 %
Diabète de type 2	20 %
Cancer du sein	12 %
THM	20 %
Stade FIGO	
Ia	56 %
Ib	23 %
II	2 %
IIIa	4 %
IIIb	0 %
IIIc	4 %
IVa	0 %
IVb	11 %
Type histologique	
Endometrioïde	89 %
Séreux	6 %
Cellules claires	3 %
Mucineux	2 %
Grade histologique	
1	40 %
2	40 %
3	20 %
Caractéristiques histologiques	
Invasion myométriale $\geq$ 50 %	41 %
Emboles vasculaires	19 %
Thérapie adjuvante	
Curiethérapie	75 %
Radiothérapie externe	23 %
Chimiothérapie	6 %

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et histopathologiques de la cohorte d'adénocarcinomes de l'endomètre du CHRU de Nancy.

2. Cohorte du TCGA

Dans la cohorte définitive *UCEC* du TCGA, parmi les 373 cas d'adénocarcinomes de l'endomètre, 333 cas présentaient des données complètes dont 271 (81,4 %) étaient de type endométrioïde, 52 (15,6 %) de type séreux et 10 (3 %) de type mixte. Les grades histologiques étaient les suivants : 78 (23,4 %) cas de grade 1, 91 (27,3 %) de grade 2 et 164 (49,3 %) de grade 3. Les facteurs de prolifération ont été étudiés dans 307 cas d'adénocarcinomes de type endométrioïde dont 89 (29 %) cas de grade 1, 106 (34,5 %) de grade 2 et 112 (36,5 %) de grade 3. L'âge moyen était de 62 ans. 231 ont été classés FIGO stade I (75,4 %), 18 stade II (5,8 %), 45 stade III (14,6 %), et 10 stade IV (3,2 %).

B. Etude des marqueurs de prolifération

1. Expressions de MCM6 et de Ki-67 dans l'adénocarcinome endométrial de type endométrioïde

Les expressions de MCM6 et Ki-67 dans l'adénocarcinome endométrial de type endométrioïde ont été analysées comme décrit dans la partie méthodes, consistant en une évaluation du taux de cellules marquées (Figure 19). Les scores étaient globalement beaucoup plus élevés pour MCM6 (moyenne : 72,9 %) que pour Ki-67 (moyenne : 18,3 %). Les résultats sont détaillés dans le Tableau 3.

Les scores de MCM6 et de Ki-67 étaient corrélés au grade histologique : taux de cellules marquée pour MCM6 de 66,7 % pour les cas de grade 1, 75,3 % pour le grade 2 et 81,4 % pour le grade 3 ($p < 0,001$; post-test de Dunn), et pour Ki-67 : 12,3 % pour les cas de grade 1, 19,6 % pour le grade 2 et 23,1 % pour le grade 3 ($p < 0,001$; post-test de Dunn) (Figure 19). De plus, l'expression de MCM6 était corrélée de manière significative avec le stade FIGO (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,03$), avec un score moyen de 70,8 % dans les stades I, 78,8 % dans les stades II / III et 77,4 % pour le stade IV. La corrélation entre l'expression de Ki-67 et le stade FIGO n'était pas significative (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,06$).

	n	MCM6		Ki-67	
		Positivité	<i>p</i>	Positivité	<i>p</i>
Grade histologique	89	72.9 %		18.3 %	
Grade 1	39	66.7 %		12.3 %	
Grade 2	39	75.3 %		19.6 %	
Grade 3	11	81.4 %	<i>< 0.001</i>	23.1 %	<i>< 0.001</i>
Stade FIGO	89	72.9 %		18.3 %	
Stade I	71	70.7 %		15.7 %	
Stades II/III	10	78.8 %		22.4 %	
Stade IV	8	77.4 %	<i>0.03</i>	19.4 %	<i>0.06</i>

Tableau 3 : Expression de MCM6 et de Ki-67 selon le grade histologique et le stade FIGO.

L'expression de MCM6 était également significativement associée au risque ESMO, avec un score de 78,1 % dans le groupe à risque élevé par rapport à 70,4 % dans le groupe à risque intermédiaire et 69,3 % dans le groupe à faible risque ($p = 0,01$; Test de Kruskal-Wallis). Une corrélation similaire a été trouvée pour Ki-67 : 19,9 % dans le groupe à risque élevé vs 14,8 % dans le risque intermédiaire et 14,6 % dans les groupes à faible risque, $p = 0,04$; Test de Kruskal-Wallis.

Il est intéressant de noter que l'expression de MCM6 était significativement plus élevée dans les tumeurs p53+ ($p = 0,003$), mais pas pour Ki-67 ($p = 0,23$). De même, l'expression de MCM6 était corrélée de manière significative avec une perte de MSH6 et/ou PMS2 ($p = 0,03$), mais encore une fois, aucune association de ce type n'a été trouvée pour Ki-67 ($p = 0,41$).

Le test de Spearman a montré une forte corrélation entre MCM6 et Ki-67, avec un coefficient Rho mesuré à 0,55 ($p < 0,001$).

Le coefficient de corrélation intra-classe (CCI) était très bon pour MCM6, avec une valeur de 0,84 (IC à 95 % : 0,83 à 0,91), ainsi que pour Ki-67, avec une valeur de 0,84 (IC à 95 % : 0,77-0,90).

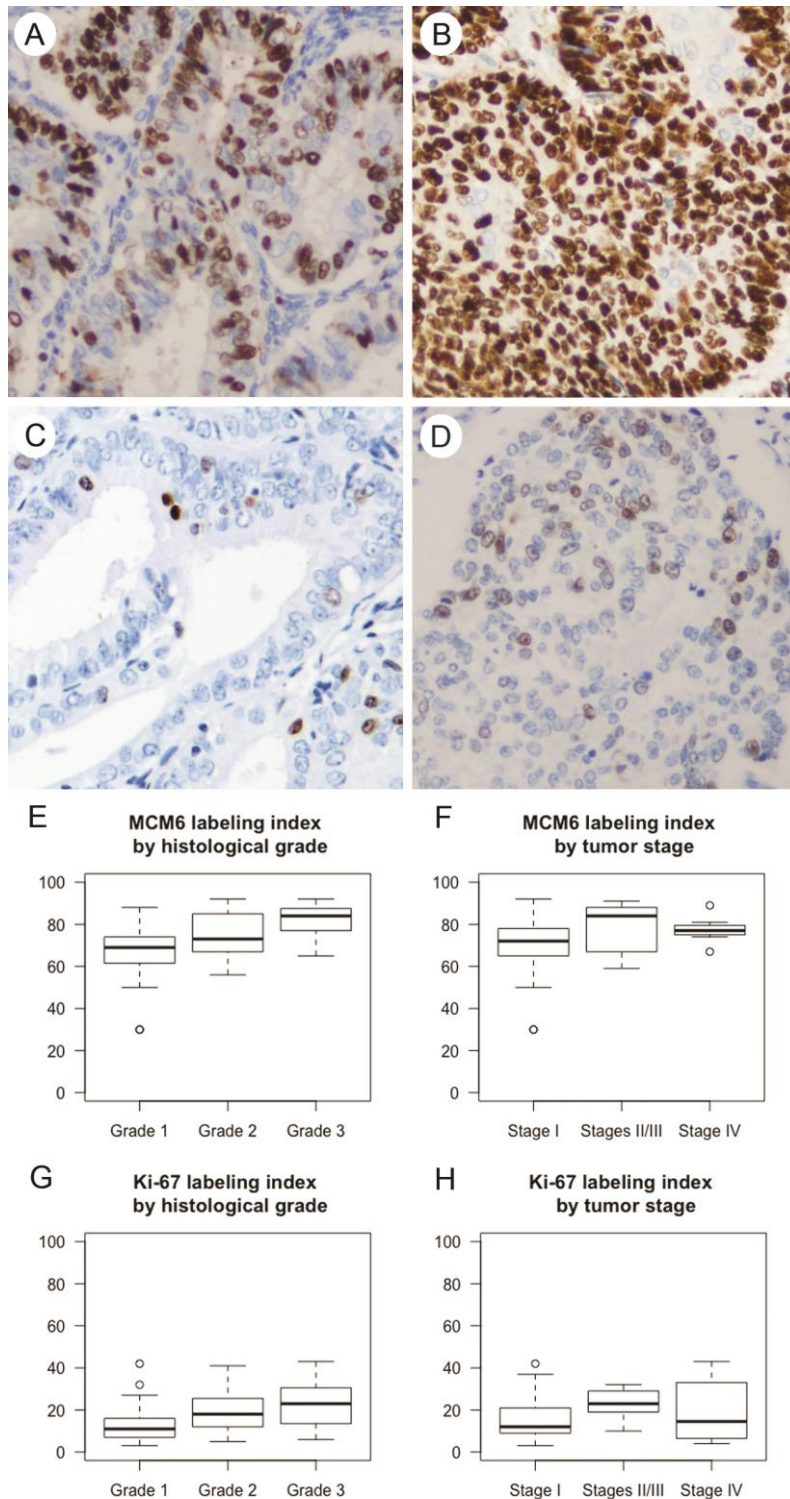


Figure 19 : Immunohistochimie des marqueurs de prolifération Ki-67 et MCM6. Marquage modéré de MCM6 dans un cas de carcinome endométoïde de grade 1 (A, grossissement $\times 400$). Marquage fort de MCM6 dans un cas de carcinome endométoïde de grade 3 (B, $\times 400$). Faible marquage de Ki-67 dans un cas de grade 1 (C, $\times 400$) et modéré dans un cas de grade 3 (D, $\times 400$). Expression de MCM6 en fonction du grade histologique (E) ($p < 0,001$) et du stade FIGO (F) ($p = 0,03$). Expression de Ki-67 (Ki-67) en fonction du grade histologique (G) ($p < 0,001$) et du stade FIGO (H) ($p = 0,06$) (boxplots ; Kruskal-Wallis tests).

Dans les tissus endométriaux bénins, nous avons constaté une expression plus importante en phase proliférative qu'en phase sécrétoire, pour Ki-67 (41 % contre 6 %, $p = 0,002$) et MCM6 (93 % contre 57 %, $p = 0,001$). Cependant, aucune différence significative n'a été retrouvée entre hyperplasie atypique et non atypique (Ki-67 : 15 % contre 16 %, $p = 0,8$; MCM6 : 61 % contre 66 % $p = 0,8$). De même, aucune différence n'a été retrouvée entre hyperplasie atypique et l'adénocarcinome de grade 1 (Ki-67 : 12 % contre 11 %, $p = 0,46$; MCM6 : 61 % contre 69 %, $p = 0,43$).

2. Corrélation à la survie

En utilisant le test du log-rank, la forte expression de MCM6 était associée de manière significative à une moindre SG ($p = 0,02$) et une moindre SSP ($p = 0,02$) (seuil à la médiane ; score : 73 %). En utilisant le modèle Cox univarié, nous retrouvons un hazard ratio (HR) de 4,8 [IC 95 % : 1,1 - 22,8], $p = 0,04$, en SG, et HR = 8,0 [IC à 95 % : 1 à 65], $p = 0,05$, en SSP. En analyse multivariée, MCM6 n'était pas un facteur indépendant. L'expression du Ki-67 n'était pas corrélée à la survie (log-rank test, $p = 0,79$ pour la SG ; $p = 0,74$ pour la SPP) (Figure 20).

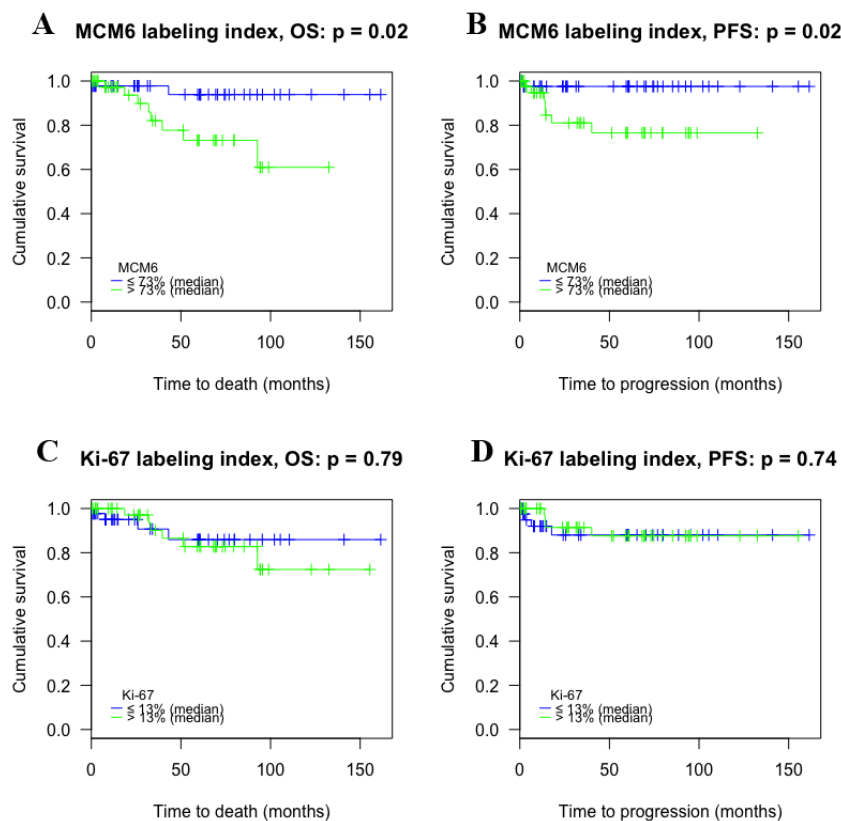


Figure 20 : Analyses de survie en fonction de l'expression du MCM6 et du Ki67 en immunohistochimie. Courbes de Kaplan-Meier avec tests du log-rank. Corrélation entre l'expression du MCM6 et la survie globale (A) ($p =$

0,02) et la survie sans progression (B) ($p = 0,02$) (seuil : médiane, 73 %). Absence de corrélation significative entre l'expression du Ki-67 et la survie globale (C) ($p = 0,79$) et la survie sans progression (D) ($p = 0,74$) (seuil : médiane, 13 %).

3. Valeur pronostique dans la cohorte du TCGA

Après analyse de 307 cas d'adénocarcinomes endométrioïdes, nous avons identifié une corrélation positive entre les niveaux d'expression des ARNm de MCM6 et Ki-67 et le grade de la tumeur (test de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$ pour les deux). En outre, en utilisant le modèle de Cox, nous avons trouvé une association entre les z-scores élevés de MCM6 et une SG plus courte ($p = 0,003$), mais pas pour la SSP ($p = 0,2$). Avec le test du log-rank, nous avons retrouvé une significativité du seuil au-dessus du 75e percentile ($p = 0,04$) (Figure 21). Le niveau d'expression en ARNm du Ki-67 n'était associé ni à la SG ($p = 0,2$) ni à la SSP ($p = 0,46$) (modèle de Cox univarié).

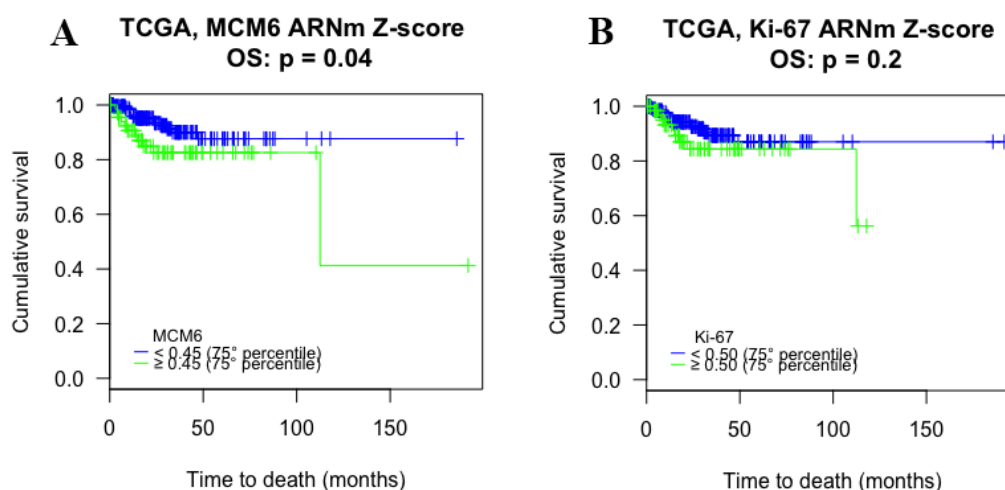


Figure 21 : Analyses de survie en fonction de l'expression du MCM6 et du Ki67 dans la cohorte du TCGA. Courbes de Kaplan-Meier avec tests du log-rank. (A) Corrélation entre l'expression en ARNm du MCM6 et la survie globale ($p = 0,04$) (seuil : 75e centile [0,45]). (B) Absence de corrélation significative entre l'expression en ARNm du Ki-67 et la survie globale ($p = 0,2$) (seuil : 75e percentile [0,50]).

Nous avons ensuite analysé les niveaux d'expression de MCM6 et de Ki-67 dans les 4 sous-groupes moléculaires. Les ARNm de MCM6 et Ki-67 étaient significativement moins exprimés dans le sous-groupe présentant un nombre faible d'altération du nombre de copies (CN bas) ($p < 0,001$). Il n'y avait aucune différence significative entre les autres sous-groupes ($p = 1$) (Figure 22).

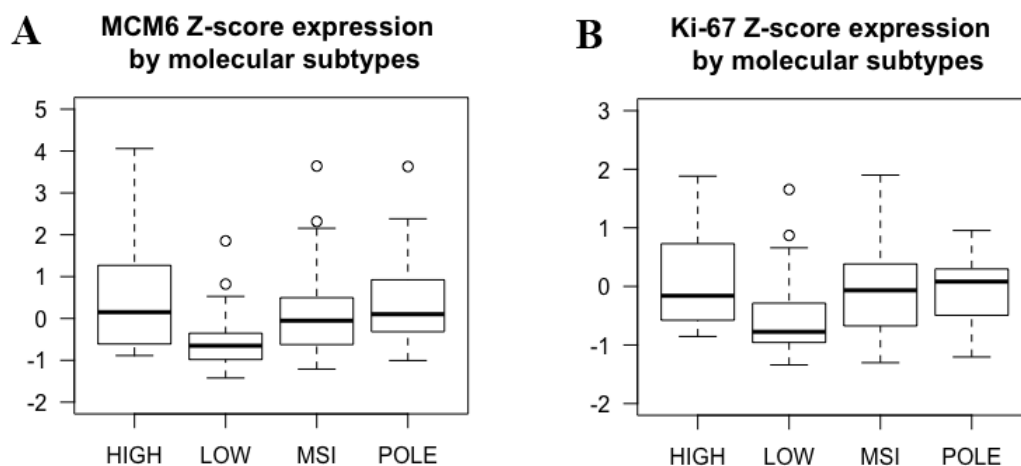


Figure 22 : Expression du MCM6 (A) (CN bas, $p < 0,001$), et du Ki-67 (B) (CN bas, $p < 0,001$) par sous-groupes moléculaires (box-plot, tests de Kruskal-Wallis).

C. Expression de NTS et NTSR1 dans l'endomètre

1. Expression de NTSR1 dans l'endomètre non tumoral et l'adénocarcinome endométrial

Nous avons étudié l'expression du récepteur NTSR1 dans 100 cas d'adénocarcinome, 17 cas d'endomètre normal, 35 cas d'hyperplasie et 14 polypes.

Soixante-douze pour cent des cas ont été marqués positivement avec l'anticorps anti-NTSR1 dans les échantillons bénins (48/66). Dans l'endomètre normal, indépendamment des phases du cycle menstruel, l'expression du NTSR1 était négative ou très faible (Figure 23A). Dans les cas d'hyperplasie et les polypes, le NTSR1 était faiblement positif avec une localisation préférentiellement membranaire (Figure 23B).

Dans les cas d'adénocarcinome, l'expression de NTSR1 était dans la plupart des cas hétérogène. Quarante-vingt dix pour cent des cas étaient marqués positivement avec l'anticorps anti-NTSR1. Le marquage cytoplasmique des cellules tumorales était, dans la plupart des cas, granulaire. Dans les adénocarcinomes de grades 1 et 2, le marquage était souvent volontiers membranaire et surtout apical, mais également cytoplasmique avec un marquage d'intensité faible à modérée (Figures 23C, 23D et 23E). En revanche, les adénocarcinomes de haut grade présentaient un marquage le plus souvent fort pour NTSR1, et de localisation cytoplasmique (Figure 23F).

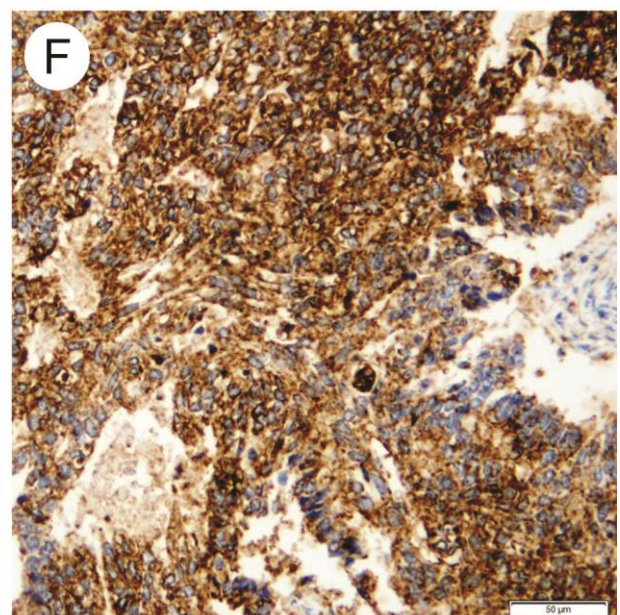
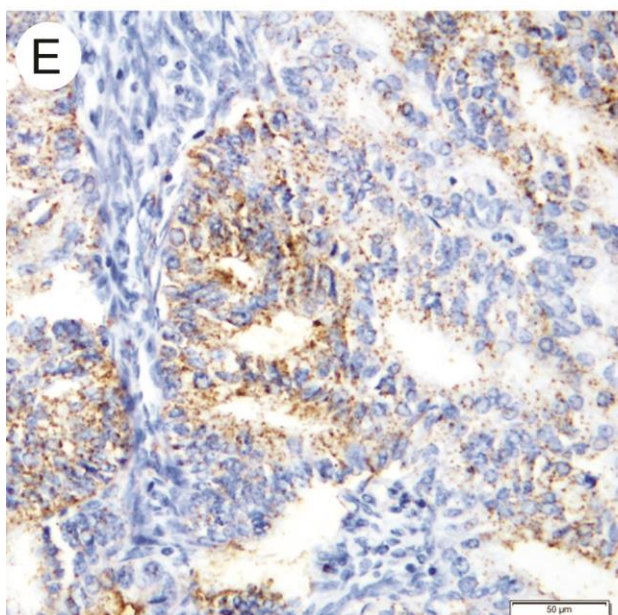
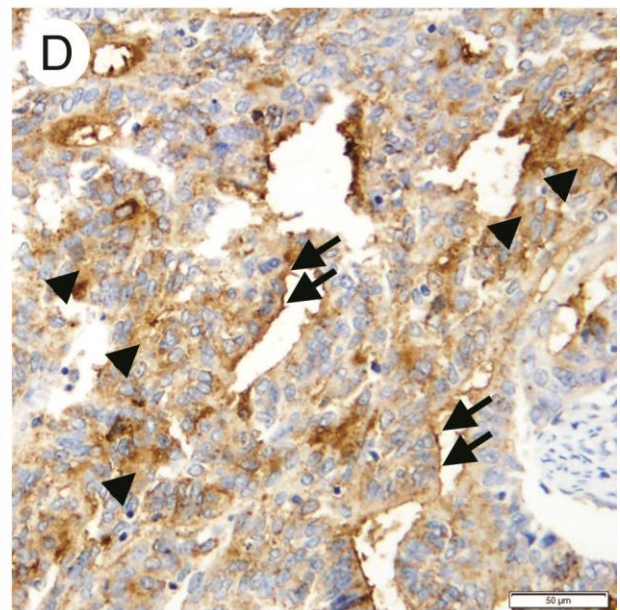
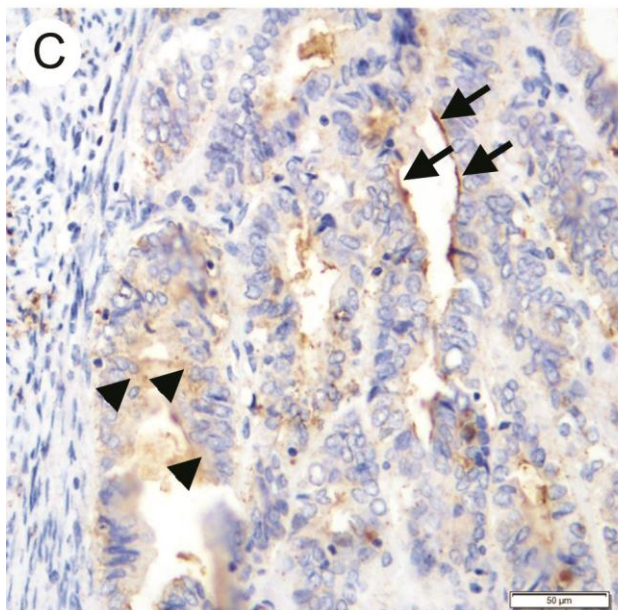
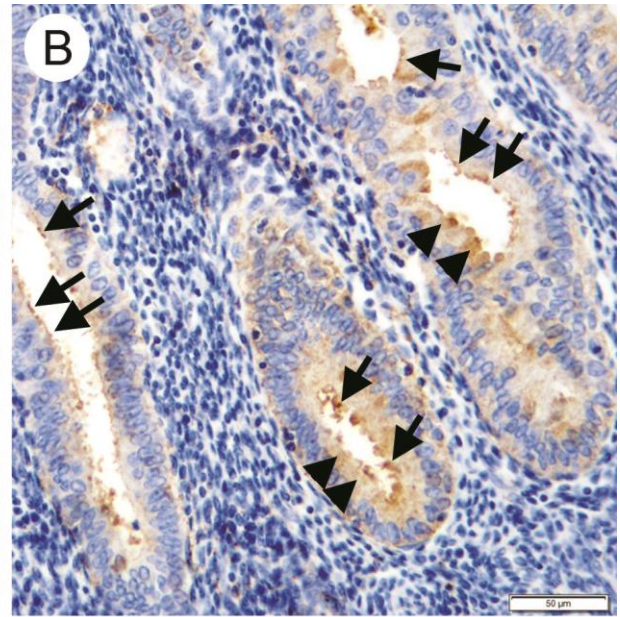
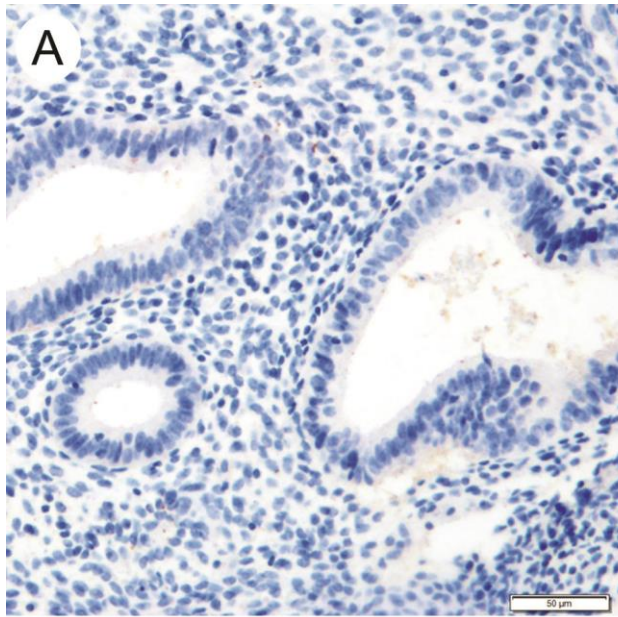


Figure 23 : Immunohistochimie du NTSR1 dans l'endomètre bénin et tumoral. (A) Négativité dans un endomètre normal en phase proliférative. (B) Faible expression membranaire dans un cas d'hyperplasie simple. (C) Faible expression membranaire et cytoplasmique dans un cas d'adénocarcinome endométrioïde de grade 1. (D) Expression membranaire et cytoplasmique modérée dans un cas d'adénocarcinome de grade 2. (E) Expression cytoplasmique modérée dans un cas d'adénocarcinome de grade 2. (F) Expression cytoplasmique forte dans un cas d'adénocarcinome de grade 3 (grossissement x200).

Pour chaque cas, nous avons établi 2 scores semi-quantitatifs pour NTSR1, membranaire et cytoplasmique. La reproductibilité inter-observateur était très bonne pour le score cytoplasmique (CCI : 0,8909 [IC à 95 % : 0,8553 ; 0,9181]) et bonne pour le score membranaire (CCI : 0,7775 [IC à 95 % : 0,7106 ; 0,8304]). En outre, la densité globale du marquage a été calculée par analyse d'image, comme décrit dans la partie méthodes.

2. Surexpression dans l'adénocarcinome

L'immunohistochimie a montré une surexpression significative de NTSR1 dans les échantillons de cancer, par rapport aux tissus bénins, avec une densité globale 14 fois plus élevée dans l'adénocarcinome endométrial ($p < 0,001$) (Tableau 4). De même, la densité globale NTSR1 était significativement plus élevée dans les adénocarcinomes que dans les cas d'hyperplasie ($p = 0,01$). Les scores de NTSR1 cytoplasmique et membranaire étaient significativement augmentés dans l'adénocarcinome de l'endomètre versus l'endomètre bénin ($p < 0,001$ pour les 2 scores), sans différence significative entre les différents types d'échantillons bénins.

L'expression de NTSR1 a également été étudiée selon le grade histologique. Le score de densité globale pour NTSR1 montre une augmentation significative de 6 fois dans les adénocarcinomes de grade 3 versus ceux de grade 1 ($p = 0,001$). En analysant l'expression différenciée par localisation de l'expression du NTSR1, nous avons retrouvé cette expression très élevée dans les adénocarcinomes de grade 3 pour le score cytoplasmique ($p < 0,001$). À l'inverse, l'expression membranaire du NTSR1 n'était pas différente selon le grade histologique ($p = 0,428$). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les différents sous-types histologiques d'adénocarcinomes.

	NTSR1 Densité globale (X 10 ⁵)	p	NTSR1 Score Cytoplasmique	p
Type histologique				
Adénocarcinome endométrial (n=100)	75.83 ± 15.90	p < 0.001	49 ± 5	p < 0.001
Endomètre bénin (n=66)	5.53 ± 0.66		15 ± 2	
Hyperplasie (n=35)	5.86 ± 1.01		14 ± 3	
Polype (n=14)	4.33 ± 1.24		14 ± 4	
Endomètre normal (n=17)	5.86 ± 1.10		18 ± 6	
Grade histologique		p = 0.01		p = 0.004
1 (n=40)	29.42 ± 4.33		30 ± 5	
2 (n=40)	67.29 ± 18.92		45 ± 7	
3 (n=20)	185.72 ± 64.56		94 ± 13	

Tableau 4 : Expression de NTSR1 selon le type histologique et le grade histologique. Test de Kruskal-Wallis : adénocarcinome vs. échantillons bénins; grade 3 vs. grade 1 + grade 2 ; les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± écart type.

L'expression de NTSR1 n'était pas corrélée avec le stade FIGO, l'invasion myométriale ou la présence d'embolies vasculaires.

3. Corrélation avec les marqueurs de prolifération

Nous avons ensuite corrélié l'expression du NTSR1 avec l'expression des marqueurs de prolifération. Nous n'avons retrouvé aucune corrélation. L'expression de NTSR1 n'était pas associée aux expressions de MCM6 et de Ki-67 (test de Spearman).

4. Expression de NTS

Nous avons également évalué l'expression de NTS (fragment long) dans l'adénocarcinome endométrial (n = 18), l'hyperplasie endométriale (n = 20) et l'endomètre normal (n = 10), avec une mesure standardisée de la densité globale, afin de pouvoir déterminer l'activation potentielle de NTSR1 par son ligand selon un mode autocrine / paracrine. Dans tous les cas d'adénocarcinomes, la quasi-totalité des

cellules tumorales était positivement marquée avec des anticorps anti-NTS (Figure 24). Le marquage anti-NTS était cytoplasmique et homogène. L'expression de NTS était significativement plus élevée dans l'adénocarcinome de l'endomètre que dans l'endomètre normal ($p < 0,0001$) et l'hyperplasie de l'endomètre ($p < 0,0001$).

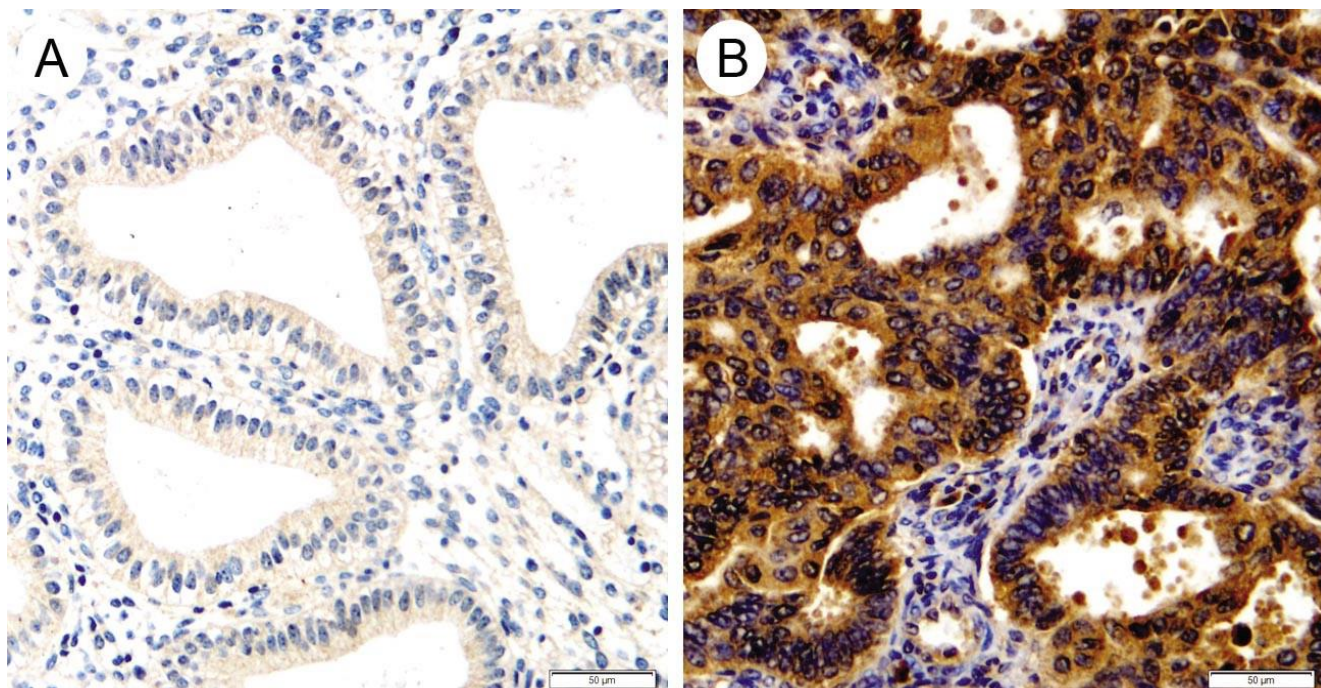


Figure 24 : Immunohistochimie de la NTS dans l'endomètre normal et tumoral. (A) Expression très faible de la NTS dans l'endomètre normal. (B) Expression cytoplasmique forte de la NTS dans un cas d'adénocarcinome de grade 2 (grossissement x200).

5. Expression des transcrits du NTSR1 et de la NTS

Nous avons vérifié l'expression de NTSR1 et NTS en analysant la présence de leurs transcrits respectifs dans des tissus congelés. Comme le montre la Figure 25, NTS était présente dans tous les échantillons d'adénocarcinomes de l'endomètre analysés. Les transcrits NTS ont été détectés dans un seul tissu normal sur les deux analysés. Les niveaux de transcription de NSTR1 étaient également très variables dans l'adénocarcinome de l'endomètre. Une expression élevée, similaire aux lignées cellulaires des contrôles positifs ART et SKOV3, a été détectée dans trois échantillons, quatre échantillons présentaient une expression d'intensité moyenne et les autres échantillons présentaient une faible expression.

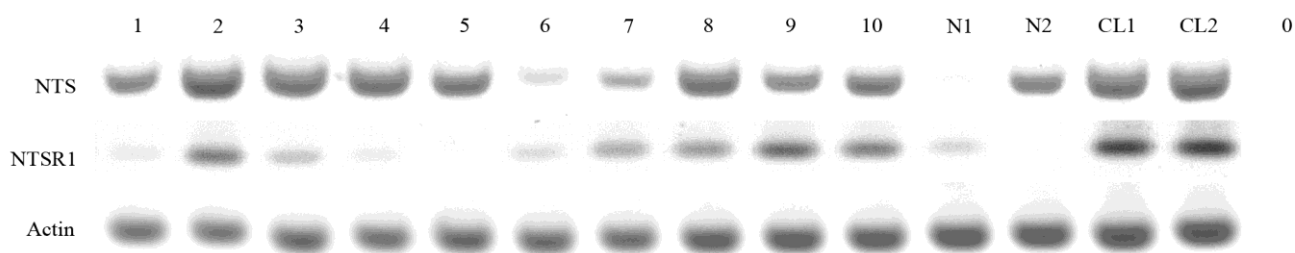


Figure 25 : Profil d'expression des ARNm de la NTS et du NTSR1 (RT-PCR). Cas d'adénocarcinomes de l'endomètre (1-10), cas d'endomètre normal (N1 et N2), témoins positifs (CL1 et CL2, lignées cellulaires A2780 et SKOV3, respectivement) et contrôle négatif (0).

D. Valeur pronostique de l'expression de NTSR1

1. Immunohistochimie

Le suivi et les données de survie à 5 ans étaient disponibles pour 97 % et 77 % des patientes, respectivement. En utilisant le test du log-rank, nous avons constaté que la SG était corrélée significativement au grade histologique ($p = 0,015$), et avec une tendance pour la SSP ($p = 0,08$) (Figure 26 A et B). La présence de métastases était également un marqueur pronostique indépendant ($p < 0,001$).

En utilisant le modèle de Cox univarié, l'expression cytoplasmique de NTSR1, ainsi que sa densité globale étaient corrélées négativement avec la survie globale globale ($p = 0,02$ et $p = 0,009$, respectivement). Le risque de décès chez les femmes à forte expression de NTSR1 par rapport aux femmes présentant une faible expression de NTSR1 était significativement augmenté. Cette corrélation est restée significative en excluant les sous-types non endométrioides ($p = 0,04$ et $p = 0,02$, respectivement). L'expression membranaire du NTSR1 n'était pas en revanche associée à une diminution de la survie ($p > 0,50$). Dans l'analyse multivariée *step by step*, la surexpression de NTSR1 restait un marqueur de mauvais pronostic indépendant, corrélée négativement avec la SG pour le score cytoplasmique ($p = 0,004$) et la densité globale ($p = 0,0035$).

En utilisant le test du log-rank, la surexpression de NTSR1 au-dessus du 95e percentile (score cytoplasmique supérieur à 130) était associée à une SG moindre (log-rank : $p < 0,001$; SG à 5 ans de 40 % pour un score cytoplasmique supérieur ou égal à 130 contre 83 % si inférieur à 130 ($p < 0,001$) ; densité globale : $p = 0,001$) (Figure 26 C et E). Avec le même seuil, la surexpression de NTSR1 était

également corrélée négativement à la SSP (score cytoplasmique : $p = 0,001$, densité globale : $p = 0,02$), (Figure 26 D et F).

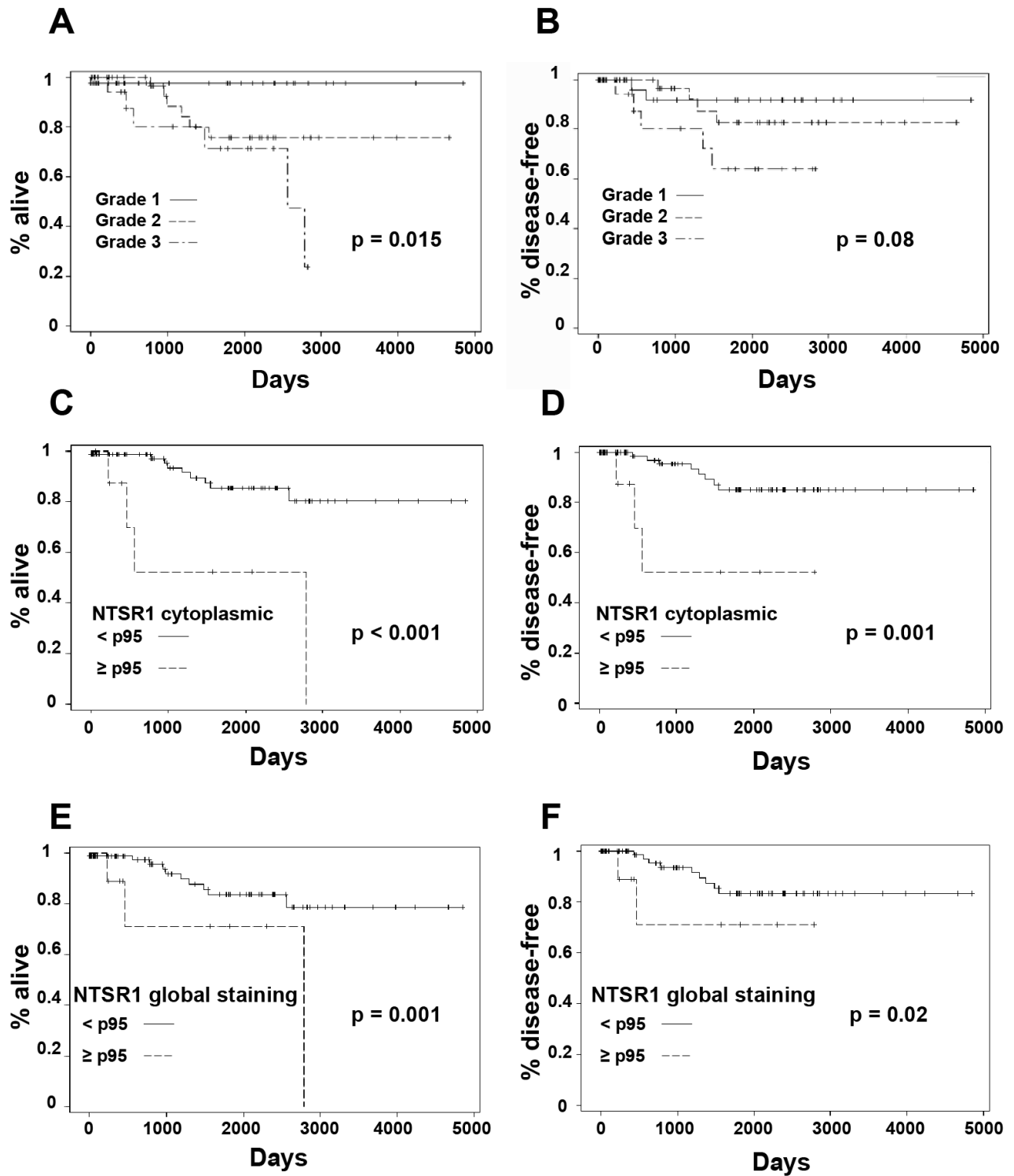


Figure 26 : Analyses de survie en fonction du grade et de l'expression de NTSR1 en IHC. Courbes de Kaplan-Meier avec tests du log-rank pour la SG et la SSP. (A) et (B) : Selon grade histologique ; (C) et (D) : selon le score cytoplasmique de NTSR1 (seuil : 95e percentile, score: 130) ; (E) et (F) : selon la densité globale de NTSR1 (seuil : 95e percentile).

2. Valeur pronostique de l'expression en ARNm de NTSR1 dans la base de données du TCGA

L'expression de l'ARNm de NTSR1 était significativement augmentée dans les tumeurs de plus haut grade ($p = 0,0008$). En utilisant le test du log-rank (Figure 27), le niveau d'expression en ARNm de NTSR1 au-dessus du 90e percentile était associé à une moindre SG (log-rank : $p = 0,0012$) et une moindre SSP (log-rank : $p = 0,0116$). En incluant uniquement les adénocarcinomes de type endométrioïde, le niveau d'ARNm de NTSR1 était également négativement corrélé à la SG (log-rank : $p < 0,0001$) et à la SSP (log-rank : $p = 0,002$).

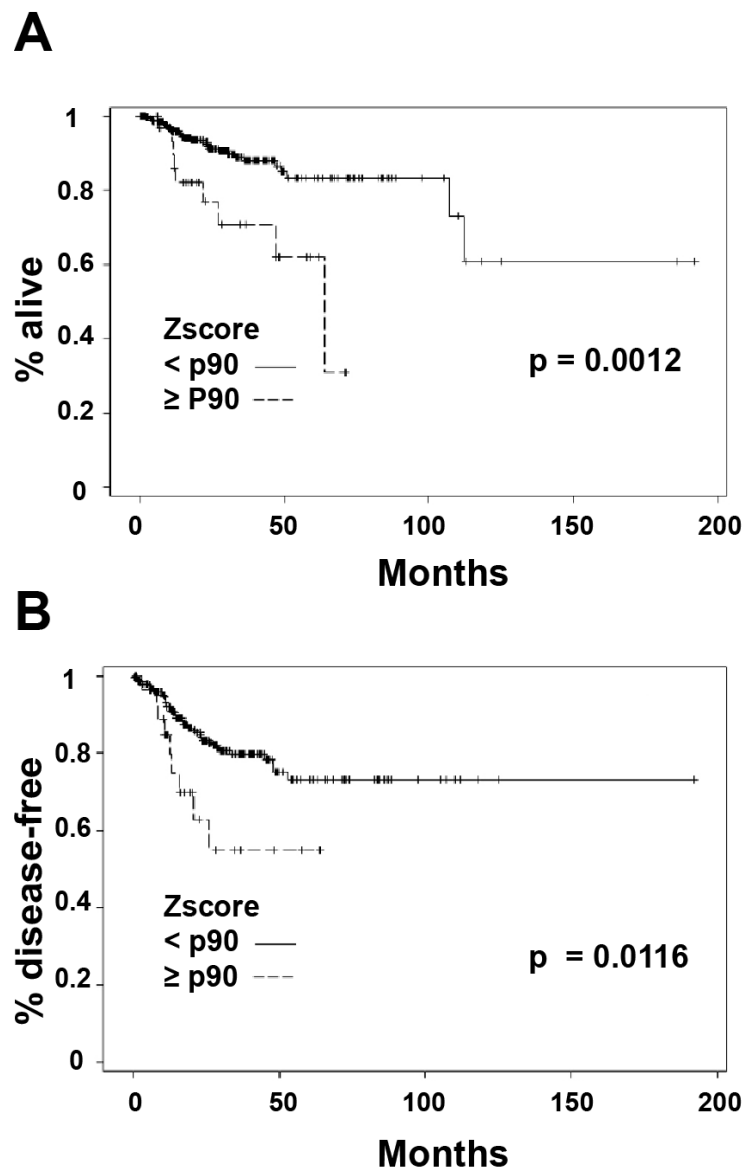


Figure 27 : Analyses de survie en fonction de l'expression de NTSR1 (z-score de l'ARNm). Courbes de Kaplan-Meier avec test du log-rank : (A) survie globale ; (B) survie sans progression (seuil : 90e percentile).

En utilisant le modèle de Cox, nous avons retrouvé des résultats similaires. L'expression élevée des transcrits de NTSR1 exprimés en z-score était significativement associée à une SG et une SSP moindres, en analyse univariée (SG : $p = 0,0005$ et SSP : $p = 0,0382$) et en multivarié (SG : $p = 0,0154$; SSP : $p = 0,0048$), et ce indépendamment du grade histologique. Après l'exclusion des sous-groupes séreux et mixtes, les niveaux d'ARNm de NTSR1 sont restés corrélés négativement avec la SG (univariée : $p = 0,0001$; multivariée : $p = 0,0019$) et la SSP (univariée : $p = 0,0005$; multivariée : $p = 0,37$).

E. Mécanismes impliqués dans la surexpression de NTSR1

1. Sous-groupes moléculaires

L'expression de NTSR1 a d'abord été analysée dans la base de données TCGA selon les 4 sous-groupes moléculaires tels que définis par *Kandoth et al.* ($n = 198$). Le niveau d'ARNm de NTSR1 était significativement plus élevé dans le groupe avec un nombre élevé d'altérations du nombre de copies (CN haut) ($p < 0,0001$). Cette corrélation restait significative lorsque les sous-types histologiques séreux et mixtes ont été exclus ($p = 0,01$). Aucune différence significative entre le groupe MSI, le groupe POLE ou le groupe présentant un nombre faible de copies (CN bas) n'a été retrouvée (Figure 28).

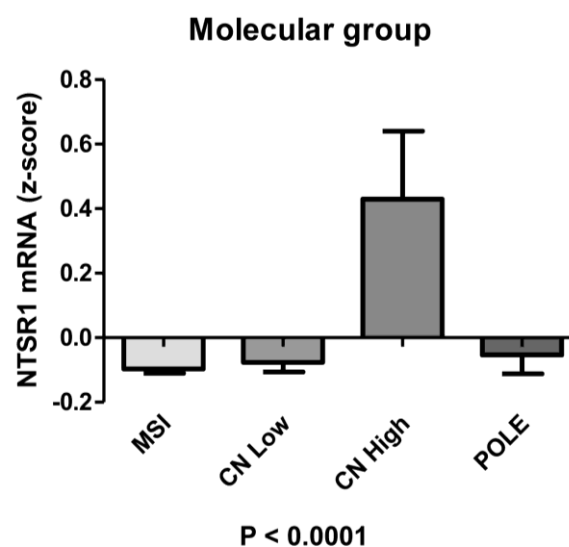


Figure 28 : Expression de *NTSR1* en ARNm selon les sous-groupes moléculaires de la cohorte d'adénocarcinomes de l'endomètre du TCGA ($n = 198$). Surexpression significative dans le sous-groupe avec un nombre élevé de copies microsatellitaires (CN haut) ($p < 0,0001$).

Par ailleurs, l'expression de l'ARNm du *NTSR1* était significativement corrélée avec une altération du nombre de copies du gène *NTSR1* ($p = 0,0005$), montrant un z-score de l'ARNm du *NTSR1* plus élevé dans les cas caractérisés par un gain de faible niveau (14 % ; 45/324) ou une amplification de haut niveau (3 % ; 9/324) par rapport aux cas diploïdes (82 % ; 266/324).

Dans notre cohorte, afin de déterminer si l'amplification du gène *NTSR1* pourrait expliquer une forte expression de la protéine NSTR1, nous avons évalué le nombre de copies du gène *NTSR1* par hybridation in situ (20 cas). Nous n'avons retrouvé d'amplification du gène dans aucun des 17 cas analysés interprétables (10 cas avec une forte expression du *NTSR1* en immunohistochimie, 7 cas avec une faible expression).

2. Méthylation du promoteur du *NTSR1*

Enfin, nous avons analysé la corrélation entre la méthylation de l'ADN du promoteur du gène *NTSR1* et le niveau d'expression de l'ARNm du *NTSR1* exprimé en z-score (Figure 29 A). Les données provenant de 15 sondes sur 17 couvrant les îlots CpG du promoteur du gène *NTSR1* étaient disponibles dans 220 cas. Pour trois de ces 15 îlots CpG (CpG 1, CpG 5 et CpG 11), la perte de méthylation était significativement associée à un niveau d'ARNm du *NTSR1* plus élevé (Tableau 5). En outre, en étudiant ces 3 îlots CpG, nous avons démontré qu'ils étaient significativement plus fréquemment en état non méthylé dans des adénocarcinomes de grade 3, que dans les tumeurs de grades 1 et 2 (Figure 29 B).

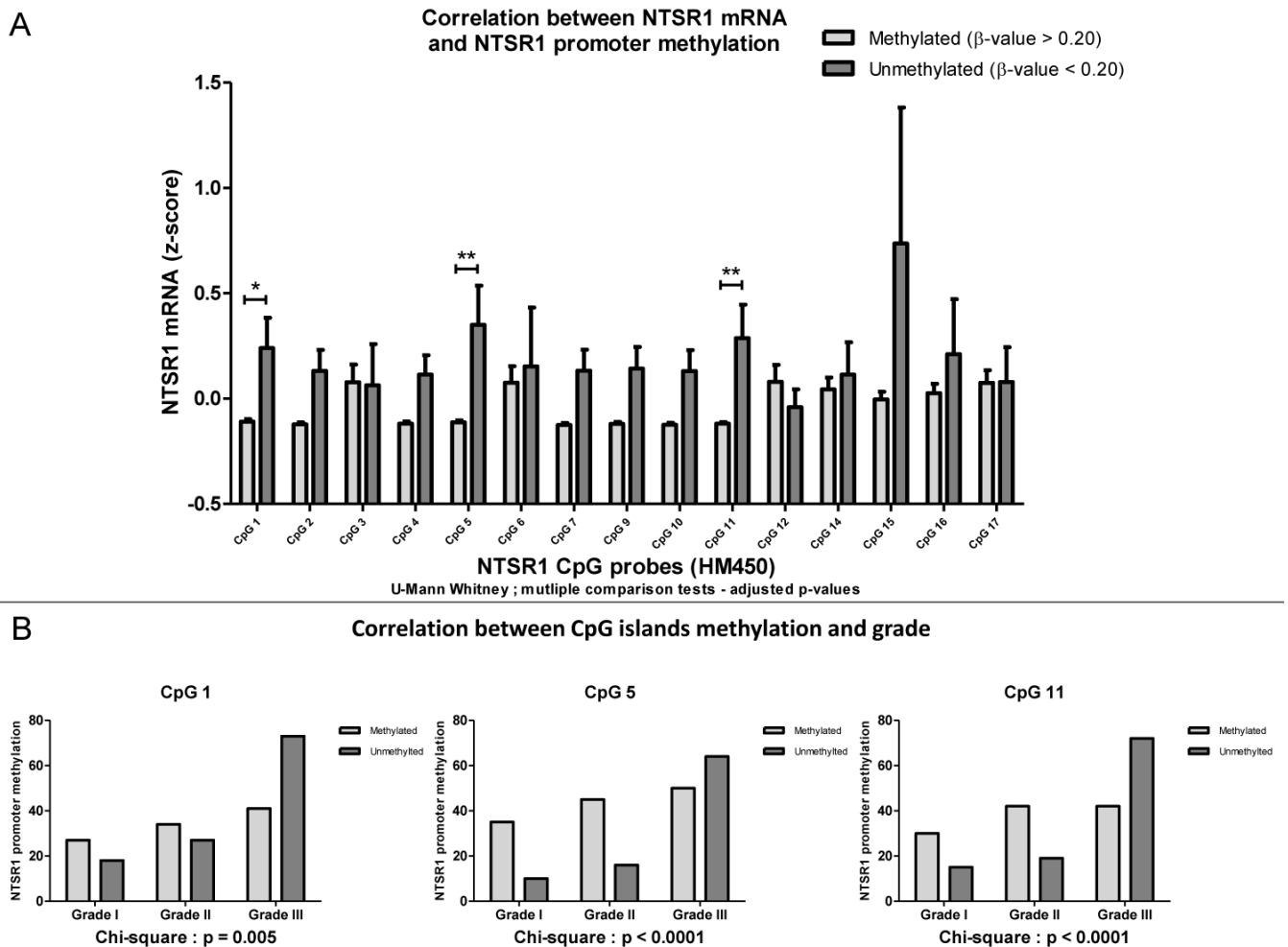


Figure 29 : Analyse de la méthylation du promoteur de *NTSR1* dans la cohorte d'adénocarcinome de l'endomètre du TCGA (HM450). (A) Corrélation entre le niveau d'expression exprimé en z-score de l'ARNm du *NTSR1* (RNASeq V2) et la méthylation du promoteur du *NTSR1* (valeur bêta > 0,20) ; Test de U-Mann Whitney, correction de Bonferroni pour des comparaisons multiples (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$). (B) Corrélation entre le statut de méthylation des îlots CpG 1, 5 et 11 du promoteur du gène *NTSR1* et le grade histologique (test du χ^2).

CpG		Position	Cas méthylés	ARNm NTSR1 (Z-Score moyen)		p-value
				Non méthylés	Méthylés	
CpG 1	cg00254133	61340542	46.8 % (103/220)	0.237	-0.109	0.047
CpG 2	cg01539036	61340116	21.8 % (48/220)	0.132	-0.123	0.642
CpG 3	cg02216247	61342017	91.4 % (201/220)	0.062	0.078	1
CpG 4	cg02658437	61339804	15.9 % (35/220)	0.113	-0.119	1
CpG 5	cg03567830	61339871	59.1 % (130/220)	0.350	-0.113	0.002
CpG 6	cg04834228	61392703	99.1 % (218/220)	0.153	0.076	1
CpG 7	cg05295038	61340107	21.8 % (48/220)	0.133	-0.126	0.278
CpG 8	cg07938252	61340827	100 % (220/220)	NA	0.076	NA
CpG 9	cg08678514	61340340	25 % (55/220)	0.142	-0.120	1
CpG 10	cg09893588	61340109	21.4 % (47/220)	0.131	-0.125	0.351
CpG 11	cg11877251	61339875	51.8 % (114/220)	0.287	-0.119	0.002
CpG 12	cg12910641	61343222	96.8 % (213/220)	-0.041	0.080	1
CpG 13	cg13213889	61371658	NA	NA	NA	NA
CpG 14	cg13292703	61371808	53.2 % (117/220)	0.113	0.044	1
CpG 15	cg14871138	61340885	89.1 % (196/220)	0.736	-0.004	1
CpG 16	cg16430535	61342164	72.7 % (160/220)	0.211	0.026	1
CpG 17	cg24235518	61371425	57.7 % (127/220)	0.078	0.075	1

Tableau 5 : Profil de méthylation du promoteur de NTSR1 et corrélation à l'expression de l'ARNm de NTSR1 (HM450 ; n = 220) ; test de U-Mann Whitney, correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples.

Partie 2 - Adénocarcinome de l’ovaire

A. Caractéristique des populations

1. Cohorte locale

Les caractéristiques cliniques et histologiques des patientes figurent dans le Tableau 6. Les patientes présentaient les facteurs de risque classiques de l’adénocarcinome ovarien : mutations de *BRCA*, nulliparité, endométriose, traitement hormonal de la ménopause. Le sous-type histologique prédominant dans les adénocarcinomes ovariens était la différenciation séreuse (66,7 %). La majorité des tumeurs étaient de stades FIGO III (48,5 %) et IV (30,3 %).

Données cliniques (n=46)	Moyenne ± DS ou % de patientes
Age (années)	56 ± 13.8
IMC (kg/m ²)	26 ± 3.6
Parité	1.28 ± 1.15
Mutation <i>BRCA</i>	11 %
THM	18 %
Endométriose	13 %
Stade FIGO (n=33)	
I	18 %
II	3 %
III	49 %
IV	30 %
Type histologique (n=33)	
Séieux	67 %
Endometrioïde	12 %
Cellules claires	12 %
Mucineux	6 %
Mixte	3 %
Grade histologique (n=33)	
Bas grade	13 %
Haut grade	87 %

Tableau 6 : Caractéristiques cliniques et histopathologiques de la cohorte ovarienne du CHU Cochin Port-Royal.

2. Cohorte du TCGA

Les expressions des ARNm de NTS et NTSR1 ont été analysées dans la cohorte de 491 adénocarcinomes séreux ovariens de haut grade provenant de la base de données TCGA. Les stades FIGO étaient disponibles pour 484 patientes. 24 (4,9 %) tumeurs étaient de stade II de la classification FIGO (3 stade IIa, 4 stade IIb, 17 stade IIc), 381 (78,8 %) tumeurs de stade III (7 stade IIIa, 21 stade IIIb, 353 stade IIIc) et 79 (16,3 %) tumeurs de stade IV.

B. Expression de NTS et de NTSR1 dans l'ovaire

1. Expression de NTSR1 dans l'ovaire

Les expressions de NTS et NTSR1 ont été analysées par immunohistochimie dans 46 échantillons ovariens. La Figure 30 A montre un marquage typique, positif et négatif, pour les deux marqueurs dans, respectivement, des adénocarcinomes séreux de bas grade. Dans les tumeurs de type borderline et les adénocarcinomes, la distribution du NTSR1 était dans la plupart des cas homogène (Figure 30 B). Un score de Hirsch supérieur à 50 était considéré comme positif. Avec ce score, respectivement 72 % et 74 % des cas étaient marqués positivement avec les anticorps anti-NTSR1 et anti-NTS (fragment long). La localisation cytoplasmique de NTSR1 et NTS était prédominante, et 67 % des échantillons étaient positifs de façon concomitante pour les deux marqueurs. L'expression de NTSR1 était significativement plus élevée dans les adénocarcinomes à cellules claires. Les expressions de NTSR1 et NTS ont également été analysées dans 10 tissus bénins. Le marquage était négatif ou très faible dans 9/10 échantillons (Figure 30 B).

2. Surexpression de NTSR1 dans l'adénocarcinome ovarien

L'expression de NTSR1 était significativement plus élevée dans les adénocarcinomes ($102,1 \pm 54,4$) que dans les tumeurs borderline ($67,7 \pm 33,8$) et les tissus ovariens normaux ($16 \pm 23,5$) ($p < 0,001$). L'expression de la NTS était également significativement plus élevée dans les adénocarcinomes ($97,3 \pm$

48,2) que dans les tumeurs borderline ($81,2 \pm 55,6$) et les tissus ovariens normaux ($28,5 \pm 32,5$) ($p < 0,001$) (Figure 30 C).

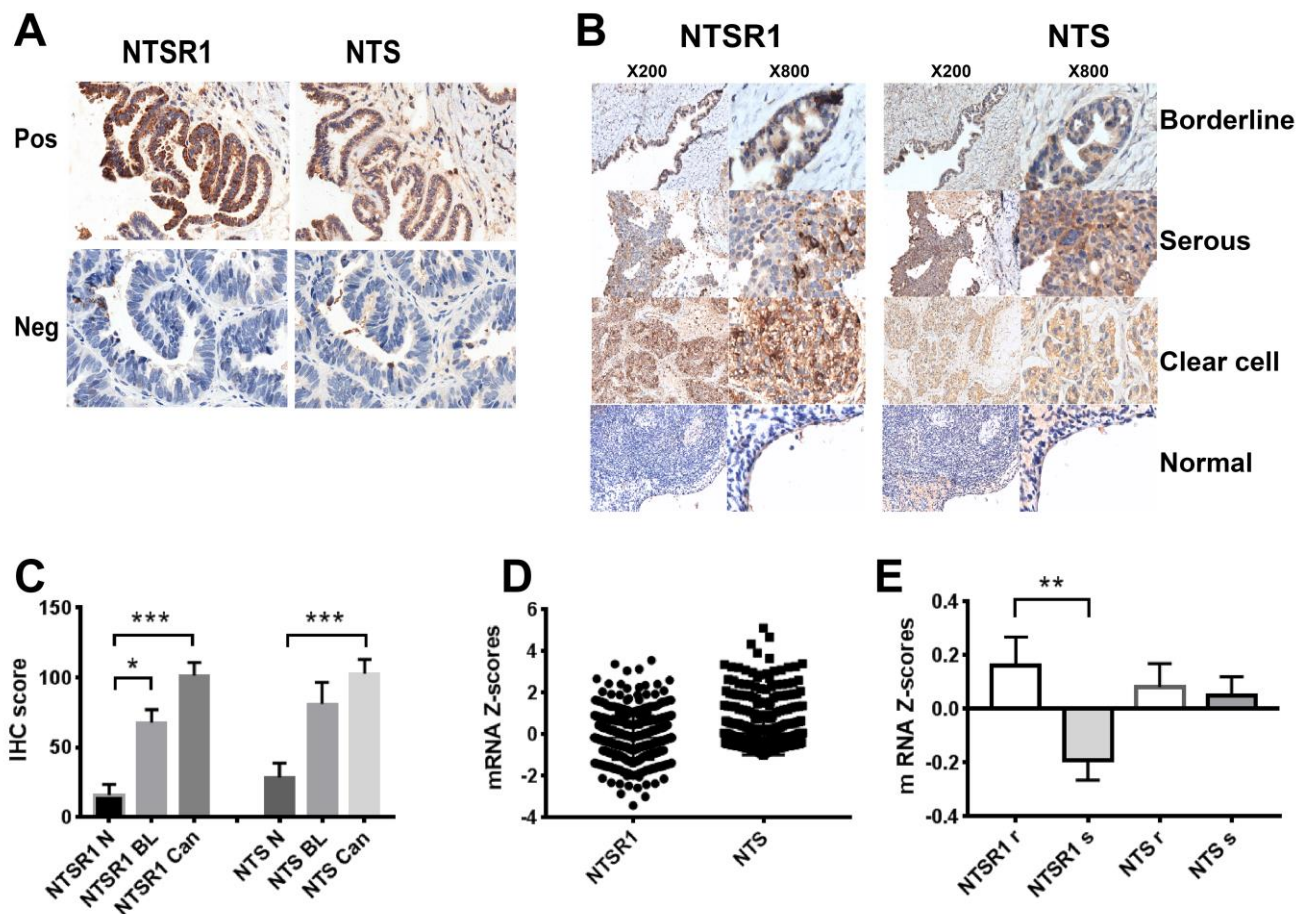


Figure 30 : Expression de NTSR1 et NTS dans l'ovaire normal et tumoral. L'expression de NTSR1 est corrélée avec la résistance au carboplatine. (A) : Marquage positif et négatif pour NTSR1 et NTS dans des adénocarcinomes ovariens séreux de bas grade. (B) : Expression de NTSR1 et NTS dans une tumeur séreuse borderline, un adénocarcinome séreux, un adénocarcinome à cellules claires, et du tissu ovarien normal (grossissement $20 \times$ et $80 \times$). (C) : Distribution des scores IHC pour NTSR1 et NTS dans les tissus normaux (N), borderline (BL), ou les adénocarcinomes (Can) montrant une surexpression de NTSR1 et NTS dans les adénocarcinomes. (D) : Distribution des z-scores des ARNm de NTSR1 et NTS, dans une cohorte de 491 cystadénocarcinomes séreux ovariens du TCGA. (E) : Analyse de la résistance au platine en fonction du niveau d'expression de NTSR1 et NTS (287 patients), montrant surexpression significativement de NTSR1 dans le groupe de chimiorésistance (r) par rapport au groupe chimiosensible (s) (** $p = 0,0076$).

C. Valeur pronostique de NTSR1

Les expressions des ARNm de NTS et NTSR1 ont été analysées dans les 491 adénocarcinomes ovariens séreux de la cohorte du TCGA. La Figure 30 D montre la répartition des z-scores des ARNm de NTSR1 et NTS dans cette cohorte. L'expression de l'ARNm de NTSR1 était significativement augmentée dans les stades avancés ($p = 0,012$ pour les stades IV et IIIC vis-à-vis des stades inférieurs) (Figure 31 B). De même, l'expression de NTSR1 était plus élevée ($p = 0,072$) dans les adénocarcinomes de grade 3 que dans les cas de grade 2 (Figure 31 C). L'analyse en log-rank de la SSP a montré que la surexpression en ARNm de NTSR1 (z-score au-dessus du 90e percentile) était associée à un moins bon pronostic ($p = 0,019$) avec une survie médiane de 13.3 et 17.5 mois, respectivement (Figure 31 A).

D. Résistance au platine

Le statut de sensibilité au platine était disponible pour 287 patientes de la cohorte du TCGA ; 90 patientes (26,1 %) étaient résistantes et 197 (57,1 %) étaient sensibles. La surexpression de l'ARNm de NTSR1 était significativement associée à un état de résistance au platine ($p = 0,0076$), alors que l'expression de l'ARNm de NTS n'était pas différente entre les groupes résistant ou sensible (Figure 30 E).

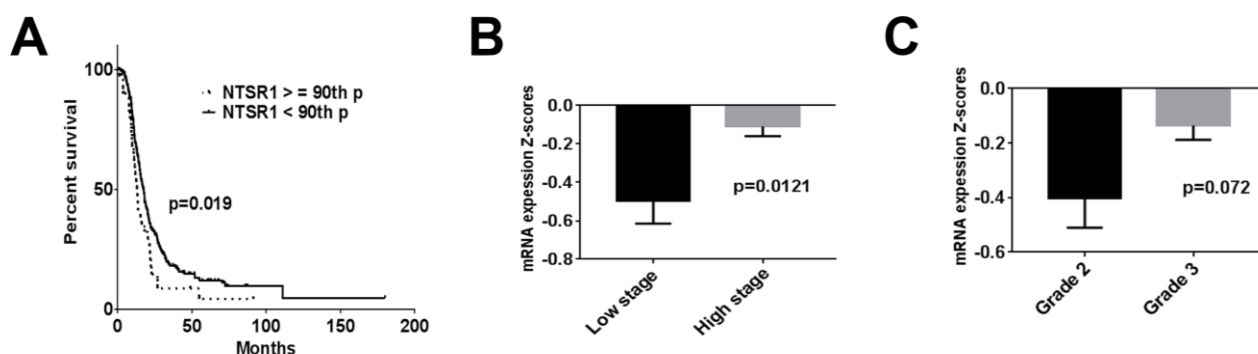


Figure 31 : Valeur pronostique de l'expression des ARNm de NTSR1 et NTSR3 dans la cohorte d'adénocarcinomes ovariens du TCGA. (A) : Analyse de la SSP en fonction de l'expression de l'ARNm de NTSR1 ($n = 408$). Expression de l'ARNm du NTSR1 selon : (B) le stade FIGO ($n = 484$) ; (C) le grade histologique ($n = 477$).

VII. Discussion générale

L'amélioration de la thérapeutique avec comme corolaire l'amélioration du pronostic tant en terme de survie que de non-progression de la maladie tumorale est l'un des objectifs principaux de la recherche en oncologie. Pour ce faire, il est essentiel d'améliorer la compréhension des mécanismes de la tumorigénèse, la prolifération, la migration, et de la réponse au traitement.

Il n'y a à ce jour que peu de marqueurs pronostiques ou théranostiques dans les cancers gynécologiques. La recherche de biomarqueurs permettant un diagnostic plus précoce, une stadification pronostique plus performante, ou encore en tant que cible thérapeutique potentielle reste ainsi encore nécessaire, en particulier dans l'adénocarcinome endométrial, et de manière encore plus prégnante dans l'adénocarcinome ovarien, qui, diagnostiqué plus tardivement, porte un pronostic plus sombre.

C'est dans le cadre de ces objectifs que l'étude de NTS et NTSR1 ainsi que des marqueurs de prolifération dans les cancers de l'endomètre et de l'ovaire présente un intérêt majeur.

A. NTS et NTSR1 dans l'appareil reproducteur de la femme

Nous avons présenté au début de ce travail le rôle physiologique de la NTS notamment au niveau gastro-intestinal dans la fonction de digestion ainsi que dans le SNC. Les fonctions centrales et périphériques de la NTS sont transmises à la cellule par ses interactions avec trois récepteurs : NTSR1, NTSR2 et NTSR3. NTSR1 est peu ou pas exprimé dans la plupart des tissus, mais nous avons déjà démontré que sa surexpression est un facteur pronostique défavorable, notamment dans les cancers du sein et du poumon. La localisation intracellulaire du récepteur permet son activation par des mécanismes autocrines et paracrines (Dupouy et al., 2011). Son ligand, la NTS, est exprimé de façon variable dans les tissus normaux.

Les données concernant le rôle physiologique de la NTS dans la gonade ainsi qu'au niveau du tractus génital de la femme sont peu nombreuses.

Des premières études ont rapporté la présence de la NTS dans l'utérus de rats (Mistry et Vijayan, 1985 ; Pettibone et Totaro, 1987). Il a été démontré que la NTS joue également un rôle dans l'implantation.

L'injection intra-utérine de NTS au 4e ou 5e jour de grossesse chez le rat a significativement réduit le nombre de fœtus viables ainsi que leur poids de naissance (Vijayan et Mistry, 1992). Sa présence a été démontrée dans l'endomètre bovin (Sakumoto et al., 2015). Chez l'humain, la NTS et son récepteur NTSR1 ont été retrouvés colocalisés dans le myomètre normal et dans les leiomyomes chez la femme (Rodriguez et al., 2010 ; Rodriguez et al., 2011). La présence de la NTS a été également confirmée par immunohistochimie dans l'endomètre ainsi que dans les épithéliums de l'isthme et de l'ampoule tubaire.

Plus récemment, l'expression de NTSR1 dans les spermatozoïdes épидидymaires a été démontrée chez le bovin (Umezu et al., 2016 ; Hiradate et al., 2014). *Hiradate et al.* ont montré l'effet de la NTS sur la capacitation des spermatozoïdes et la réaction acrosomique (mobilisation intracellulaire de calcium, blocage par l'inhibition sélective de NTSR1 et NTSR2).

Par ailleurs, les femmes prises en charge par fécondation *in vitro* présenteraient une expression accrue, en accord avec l'œstrogénodépendance. De plus, la NTS et NTSR1 sont surexprimés dans 20 % des cancers du sein RE+ (Dupouy et al., 2009 ; Souazé et al. 2006). L'adénocarcinome endométrial étant hautement estrogénodépendant, des mécanismes similaires pourraient ainsi se produire dans la tumorigénèse de l'endomètre (Shapiro et al., 1985).

Le couple NTS/NTSR1 pourrait en conséquence être un bon candidat à une implication dans la progression tumorale des adénocarcinomes de l'endomètre et de l'ovaire.

B. Implication de NTS/NTSR1 dans les adénocarcinomes de l'endomètre et de l'ovaire

La NTS et NTSR1 sont impliqués comme nous l'avons vu dans plusieurs fonctions liées à la progression tumorale, y compris la prolifération des cellules tumorales dans le pancréas, la prostate, le colon, le poumon et le sein (Evers et al., 2006), ou encore la résistance des cellules cancéreuses contre l'apoptose (Somai et al., 2002), et l'acquisition d'un potentiel invasif des cellules cancéreuses du colon, du sein et du poumon. Ces aspects ont notamment été étudiés par notre équipe dans le cancer du poumon, le cancer du sein et le carcinome hépatocellulaire (Alifano et al., 2010 ; Dupouy et al., 2014 ; Toy-Miou-Leong et al., 2004 ; Ye et al., 2016 ; Younes et al., 2014, Wu et al, 2014). L'impact

pronostique péjoratif du complexe NTS/NTSR1 dans la progression de la tumeur sont étayées par la corrélation inverse entre la surexpression de NTSR1 et la survie globale dans plusieurs séries cliniques.

Nous avons démontré dans ce travail que NTS et NTSR1 sont exprimés dans l'endomètre normal et l'ovaire normal, et surexprimés dans les adénocarcinomes. En concordance avec les autres modèles, nous avons retrouvé que la surexpression de NTSR1 est un marqueur de mauvais pronostic dans le carcinome de l'endomètre. L'expression de NTSR1, dans 2 cohortes, est ainsi corrélée au grade histologique, ainsi qu'à la survie globale et la survie sans récurrence. Le NTSR1 est un facteur de pronostic indépendant en analyse multivariée, ce qui soutient son rôle majeur de contributeur à la progression du cancer de l'endomètre. Nous avons retrouvé des résultats similaires ont été retrouvés dans l'adénocarcinome de l'ovaire, dans la cohorte du TCGA.

C. Mécanismes d'activation et de surexpression de NTSR1

Nous émettons l'hypothèse que la contribution du NTSR1 à la tumorigénèse provient de la production locale du ligand plutôt que de la NTS circulante, car la NTS est un peptide hautement dégradable et sa concentration sanguine diminue rapidement après sa libération post-prandiale. Le fragment long de la NTS, moins dégradable que le peptide, pourrait également jouer le rôle de ligand. L'activation du NTSR1 se produit donc sur un mode autocrine / paracrine, la surexpression concomitante NTS/NTSR1 dans les tissus tumoraux s'inscrivant dans cette hypothèse.

Par ailleurs, en étudiant grâce à l'immunohistochimie la localisation subcellulaire de NTSR1, nous avons constaté que c'est l'accumulation cytoplasmique de NTSR1 qui était corrélée aux marqueurs de la progression tumorale et à la diminution de la survie, et non sa présence membranaire. Des résultats similaires ont été observés dans le cancer du poumon (Younes et al., 2014). Des études antérieures dans notre laboratoire ont également révélé que, lors d'une exposition prolongée à son ligand, NTSR1 ne restait pas localisé à la membrane cellulaire, mais, après endocytose, s'accumulait dans le cytoplasme à partir duquel il est recyclé vers la surface cellulaire. Ce recyclage permanent de NTSR1 induit une sensibilisation cellulaire constante et conduit à une activation continue du signal neurotensinergique (Toy-Miou-Leong et al., 2004).

Enfin, nous avons recueilli des données probantes suggérant que la surexpression du NTSR1 pourrait être consécutive à la déméthylation du promoteur du *NTSR1*. De façon similaire, dans les tumeurs

colorectales, il a été rapporté que cette même déméthylation pourrait contribuer à la progression tumorale par l'activation de la transcription de *NTSR1* (Kamimae et al., 2015), alors que les formes méthylées de *NTSR1* seraient associées à un caractère non invasif. De même, dans les tumeurs neuroendocrines, la déméthylation de l'ADN est associée à la surexpression du *NTSR1* (Kim et al., 2015).

De façon originale, les analyses que nous avons effectuées dans la cohorte du TCGA suggèrent que l'amplification du gène *NTSR1* pourrait être un autre mécanisme de surexpression de *NTSR1*. En effet, nous avons observé une corrélation significative entre le niveau d'expression de *NTSR1* et l'existence d'un gain du nombre de copies de *NTSR1* ($p < 0.0005$). Cependant, l'altération du nombre de copie de *NTSR1* était un événement relativement rare (17 % des cas), et les analyses par hybridation in situ que nous avons effectuées dans notre cohorte n'ont pas mis en évidence d'amplification de ce gène. Ceci pourrait s'expliquer par la fréquence probablement faible de l'évènement et par le fait que nous n'avons testé qu'un nombre limité de cas.

D. Marqueurs pronostiques

Dans le carcinome endométrial, l'invasion myométriale et le grade histologique sont utilisés à visée pronostique. Ces critères histopronostiques n'ont cependant qu'un impact limité, et ne peuvent de plus être évalués que sur pièce d'exérèse. Dans d'autres types de cancer, des marqueurs de prolifération, comme Ki-67, sont utilisés en routine afin d'aider à évaluer le pronostic et pour orienter la prise en charge thérapeutique. Aucun marqueur de prolifération n'a actuellement été validé dans le carcinome de l'endomètre. Ki-67 a été évalué dans différentes études, avec des résultats contradictoires. Dans ce cadre, nous avons souhaité mettre en exergue la valeur pronostique de MCM6 dans l'adénocarcinome de l'endomètre de type endométrioïde, montrant une forte corrélation avec le grade et la survie, et ce avec une très bonne reproductibilité. Comme MCM6 est un marqueur pronostique, de réalisation peu coûteuse, facile, et hautement reproductible, il pourrait être considéré comme un nouveau marqueur pronostique pour une utilisation de routine dans le carcinome endométrioïde de l'endomètre, probablement plus performant que Ki-67. Le taux de cellules marquées pour MCM6 était généralement nettement supérieur à celui de Ki-67. Ki-67 est exprimé à la fin de la phase G1 et n'est pas ainsi exprimé par toutes les cellules proliférantes, en particulier les cellules sortant de la phase quiescence G0 et à la phase précoce de G1. Il peut être difficile d'identifier une zone de marquage maximal et de trouver des différences de quelques pour cent entre les cas de bon et mauvais pronostic. Ceci pourrait

probablement expliquer les difficultés rencontrées dans l'utilisation de ce marqueur dans les tumeurs utérines dans la pratique clinique. D'autres études sont cependant nécessaires pour confirmer sa valeur pronostique, l'indépendance vis à vis des autres paramètres, et pour évaluer sa reproductibilité inter-laboratoire.

Bien que l'expression du NTSR1 soit corrélée à la survie, son impact pronostique semble avoir un intérêt limité en pratique aux rares cas présentant une forte surexpression. Il pourrait permettre cependant de détecter, par exemple sur biopsie, les tumeurs les plus agressives, en complément du grade histopronostique. Par ailleurs, comme nous le discuterons ci-après, l'analyse de l'expression de NTSR1 par immunohistochimie pourrait être utilisée en situation pré-thérapeutique, afin de sélectionner les patientes qui pourraient être éligibles à une thérapie ciblée. Récemment, a ainsi été proposée l'étude de l'expression NTS / NTSR1 afin d'élargir la population éligible à une thérapie ciblée par inhibiteur de la tyrosine kinase HER (human epidermal growth factor receptor) dans les cancers du sein (Dupouy et al., 2014).

E. Perspectives thérapeutiques

En raison de la contribution du système neurotensinergique dans la progression du cancer de l'endomètre, nous sommes en mesure de le proposer en tant que potentielle cible thérapeutique (Dupouy et al., 2011 ; Morgat et al., 2014, Wu et al., 2012). Sur la base de nos résultats, les stratégies thérapeutiques ciblant l'abolition de l'activation de NTSR1 pourraient être considérées comme une nouvelle alternative dans le traitement du cancer de l'endomètre, surtout en phase avancée après une étude spécifique de l'expression de NTSR1.

Le ciblage de NTS/NTSR1 a d'ores et déjà été proposé comme outil thérapeutique. Par exemple, DOTA-NT-20.3 est un candidat prometteur pour l'imagerie par ⁶⁸Ga-PET des tumeurs positives au récepteur de la NTS, et pour une thérapie avec le peptide marqué par l'yttrium (Alshoukr et al., 2011).

De même, l'antagonisation de la voie neurotensinergique par le SR48692 sensibilise les cellules de cancer de la prostate à la radiothérapie en augmentant l'apoptose des cellules tumorales (Valerie et al., 2011).

Dans l'adénocarcinome ovarien, tout comme dans le cancer du poumon non à petites cellules, le carboplatine et le cisplatine, chimiothérapies de première ligne, présentent une efficacité équivalente (Go et Adjei, 1999). La résistance au platine est un écueil majeur au niveau de l'évolution de la maladie et de son pronostic. Nous avons analysé le statut de sensibilité aux sels de platine de 287 patientes provenant de la base de données TCGA, dont 90 (26,1 %) cas résistants et 197 (57,1 %) cas sensibles. La surexpression de NTSR1 était significativement associée au statut de chimiorésistance aux sels de platine, suggérant que l'ajout d'un inhibiteur de NTS / NTSR1 pourrait optimiser la chimiothérapie à base de sels de platine. Ainsi, dans les lignées cellulaires d'adénocarcinome ovarien surexprimant NTSR1 et les tumeurs expérimentales induites, nous avons montré que l'addition d'un antagoniste du NTSR1 ou d'un anticorps anti-NTS a largement amélioré l'inhibition de la prolifération cellulaire causée par le carboplatine, et la réponse à la chimiothérapie, respectivement, en améliorant la mort cellulaire induite par le carboplatine grâce à l'activation de la caspase et à la modulation de l'expression de Bcl-2. Le blocage de NTSR1 facilite ainsi l'accumulation de platine dans le noyau et augmente les casses de l'ADN double brin, en réduisant l'efflux de carboplatine, via les ATPases de transport de type P (ATP7A, ATP7B) et MRP2 (Liu et al., 2017).

Au total, le système neurotensinergique présente les caractéristiques d'un bon candidat pour le développement de molécules à des fins thérapeutiques dans les cancers gynécologiques. Nos résultats exposés dans ce manuscrit indiquent que l'inhibition de la signalisation NTS / NTSR1 pourrait être utilisée en combinaison avec un autre traitement.

VIII. Conclusions et perspectives

Nous avons fourni des arguments en faveur de l'implication du couple NTS / NTSR1 dans la progression des cancers de l'endomètre et de l'ovaire via la surexpression du NTSR1. Cette surexpression pourrait être expliquée par une perte de la méthylation du promoteur de *NTSR1* et, de façon plus ponctuelle, par une amplification de *NTSR1*. Nous avons souligné la valeur pronostique de NTSR1, ce marqueur étant un marqueur indépendant d'une survie diminuée. Le score cytoplasmique du NTSR1 pourrait être facilement utilisé pour évaluer à visée pronostique et théranostique. L'ajout d'un antagoniste de NTSR1 augmente l'accumulation de platine intracellulaire, augmentant les dégâts sur l'ADN, et induisant l'apoptose. L'anticorps anti-NTS inhibe la croissance des tumeurs ovariennes expérimentales. Ces résultats appuient le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la voie neurotensinergique. Ces données, qui mériteraient d'être confirmées dans d'autres modèles expérimentaux, pourraient à terme mener au développement d'essais cliniques chez l'homme.

Bibliographie

- Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jul;3(7):502-16.
- Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 10 ;30(17):2039-45. doi: 10.1200/JCO.2012.42.0505.
- Aghajanian C, Sill MW, Darcy KM, Greer B, McMeekin DS, Rose PG, Rotmensch J, Barnes MN, Hanjani P, Leslie KK. Phase II trial of bevacizumab in recurrent or persistent endometrial cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 1 ;29(16):2259-65. doi: 10.1200/JCO.2010.32.6397. Epub 2011 May 2.
- Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, Stewart C, Fereday S, Caldas C, Defazio A, Bowtell D, Brenton JD. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol*. 2010 May;221(1):49-56. doi: 10.1002/path.2696.
- Alexander MJ, Leeman SE. Estrogen-inducible neurotensin immunoreactivity in the preoptic area of the female rat. *J Comp Neurol*. 1994 Jul 22 ;345(4):496-509.
- Alexander MJ. Estrogen-regulated synthesis of neurotensin in neurosecretory cells of the hypothalamic arcuate nucleus in the female rat. *Endocrinology*. 1993 Oct;133(4):1809-16.
- Alifano M, Souazé F, Dupouy S, Camilleri-Broët S, Younes M, Ahmed-Zaïd SM, Takahashi T, Cancellieri A, Damiani S, Boaron M, Broët P, Miller LD, Gespach C, Regnard JF, Forgez P. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Sep 1 ;16(17):4401-10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0659.
- Alkushi A, Lim P, Coldman A, Huntsman D, Miller D, Gilks CB. Interpretation of p53 immunoreactivity in endometrial carcinoma: establishing a clinically relevant cut-off level. *Int J Gynecol Pathol*. 2004 Apr;23(2):129-37.
- Alshoukr F, Prignon A, Brans L, Jallane A, Mendes S, Talbot JN, Tourwé D, Barbet J, Gruaz-Guyon A. Novel DOTA-neurotensin analogues for ¹¹¹In scintigraphy and ⁶⁸Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug Chem*. 2011 Jul 20 ;22(7):1374-85. doi: 10.1021/bc200078p.
- Alvarez T, Miller E, Duska L, Oliva E. Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma? *Am J Surg Pathol*. 2012 May;36(5):753-61. doi: 10.1097/PAS.0b013e318247b7bb.
- Amar S, Kitabgi P, Vincent JP. Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *FEBS Lett*. 1986 May 26 ;201(1):31-6.
- Amorino GP, Deeble PD, Parsons SJ. Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene*. 2007 Feb 1 ;26(5):745-56. Epub 2006 Jul 24.
- Anglesio MS, Carey MS, Köbel M, Mackay H, Huntsman DG; Vancouver Ovarian Clear Cell Symposium Speakers. Clear cell carcinoma of the ovary: a report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, 2010. *Gynecol Oncol*. 2011 May 1 ;121(2):407-15. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.01.005. Epub 2011 Jan 26.
- Anglesio MS, Kommoss S, Tolcher MC, Clarke B, Galletta L, Porter H, Damaraju S, Fereday S, Winterhoff BJ, Kalloger SE, Senz J, Yang W, Steed H, Allo G, Ferguson S, Shaw P, Teoman A, Garcia JJ, Schoolmeester JK, Bakkum-Gamez J, Tinker AV, Bowtell DD, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN. Molecular characterization of mucinous

ovarian tumours supports a stratified treatment approach with HER2 targeting in 19 % of carcinomas. *J Pathol.* 2013 Jan;229(1):111-20. doi: 10.1002/path.4088.

- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003 May;72(5):1117-30. Epub 2003 Apr 3.
- Armstrong MJ, Parker MC, Ferris CF, Leeman SE. Neurotensin stimulates [3H]oleic acid translocation across rat small intestine. *Am J Physiol.* 1986 Dec;251(6 Pt 1):G823-9.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 30 ;91(18):8517-21.
- Arts-de Jong M, de Bock GH, van Asperen CJ, Mourits MJ, de Hullu JA, Kets CM. Germline BRCA1/2 mutation testing is indicated in every patient with epithelial ovarian cancer: A systematic review. *Eur J Cancer.* 2016 Jul;61:137-45. doi: 10.1016/j.ejca.2016.03.009. Epub 2016 May 19.
- Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol.* 2008 Aug 1 ;26(22):3785-90. doi: 10.1200/JCO.2008.16.0812. Epub 2008 Jun 30.
- Baća I, Schmidt-Gayk H. Neurotensin and medullary carcinoma of the thyroid gland. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1981 ;100(2):229-30.
- Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2014 Sep-Oct;20(5):748-58. doi: 10.1093/humupd/dmu012. Epub 2014 Mar 30.
- Bean AJ, Dagerlind A, Hökfelt T, Dobner PR. Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience.* 1992 Sep;50(2):259-68.
- Bergman L, Beelen ML, Gallee MP, Hollema H, Benraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. *Lancet.* 2000 Sep 9 ;356(9233):881-7.
- Bhoola S, Hoskins WJ. Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2006 Jun;107(6):1399-410.
- Blackburn AM, Fletcher DR, Adrian TE, Bloom SR. Neurotensin infusion in man: pharmacokinetics and effect on gastrointestinal and pituitary hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980 Dec;51(6):1257-61.
- Bochman ML, Schwacha A. The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2009 Dec;73(4):652-83.
- Bogliolo S, Cassani C, Gardella B, Musacchi V, Babilonti L, Venturini PL, Ferrero S, Spinillo A. Current opinion on bevacizumab on endometrial cancer treatment. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Feb;15(2):299-307. doi: 10.1517/14712598.2015.995624. Epub 2014 Dec 24.
- Bogliolo S, Gardella B, Dominoni M, Musacchi V, Cassani C, Zanellini F, De Silvestri A, Gaggero CR, Babilonti L, Spinillo A. Effectiveness of aromatase inhibitors in the treatment of advanced endometrial adenocarcinoma. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Apr;293(4):701-8. doi: 10.1007/s00404-015-3974-9. Epub 2015 Dec 15.

- Bonome T, Lee JY, Park DC, Radonovich M, Pise-Masison C, Brady J, Gardner GJ, Hao K, Wong WH, Barrett JC, Lu KH, Sood AK, Gershenson DM, Mok SC, Birrer MJ. Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res.* 2005 Nov 15 ;65(22):10602-12.
- Boules M, Li Z, Smith K, Fredrickson P, Richelson E. Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Mar 22 ;4:36. doi: 10.3389/fendo.2013.00036.
- Bozou JC, Rochet N, Magnaldo I, Vincent JP, Kitabgi P. Neurotensin stimulates inositol trisphosphate-mediated calcium mobilization but not protein kinase C activation in HT29 cells. Involvement of a G-protein. *Biochem J.* 1989 Dec 15 ;264(3):871-8.
- Brinton LA, Sakoda LC, Lissowska J, Sherman ME, Chatterjee N, Peplonska B, Szeszenia-Dabrowska N, Zatonski W, Garcia-Closas M. Reproductive risk factors for endometrial cancer among Polish women. *Br J Cancer.* 2007 May 7 ;96(9):1450-6. Epub 2007 Apr 10.
- Brook CW, Shulkes A, Sewell RB, Smallwood RA. Hepatic metabolism of neurotensin. *Endocrinology.* 1987 Apr;120(4):1397-402.
- Brun J., Cortez A, Donnadiou A-C, Bazot M, Driguez P-A, Merviel P. Pathologie tumorale endométriale bénigne et lésions frontières de l'endomètre. Doi : 10.1016/S0246-1064(10)45875-2.
- Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, Stefani A, Barzon L, Sturniolo GC, Palù G, Castagliuolo I. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Apr;288(4):G621-9.
- Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992 Jan;25(1):31-40.
- Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX; Gynecologic Oncology Group. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29 ;365(26):2473-83. doi: 10.1056/NEJMoa1104390.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011 Jun 29 ;474(7353):609-15. doi: 10.1038/nature10166.
- Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem.* 1973 Oct 10 ;248(19):6854-61.
- Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, Pasha A, Nikulasson S, Carraway RE, Pothoulakis C. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(6):843-9.
- Chabry J, Botto JM, Nouel D, Beaudet A, Vincent JP, Mazella J. Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J Biol Chem.* 1995 Feb 10 ;270(6):2439-42.
- Chakravarty D, Gupta N, Goda JS, Srinivasan R, Patel FD, Dhaliwal L. Steroid receptors, HER2/neu and Ki-67, in endometrioid type of endometrial carcinoma: Correlation with conventional histomorphological features of prognosis. *Acta Histochem.* 2010 Jul;112(4):355–63.
- Chen JY, Kuo SJ, Liaw YP, Avital I, Stojadinovic A, Man YG, Mannion C, Wang J, Chou MC, Tsai HD, Chen ST, Hsiao YH. Endometrial cancer incidence in breast cancer patients correlating with age and duration of tamoxifen use: a population based study. *J Cancer.* 2014 Jan 23 ;5(2):151-5. doi: 10.7150/jca.8412. eCollection 2014.
- Chong JP, Mahbubani HM, Khoo CY, Blow JJ. Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature.* 1995 Jun 1 ;375(6530):418–21.

- Church DN, Briggs SE, Palles C, Domingo E, Kearsey SJ, Grimes JM, Gorman M, Martin L, Howarth KM, Hodgson SV; NSECG Collaborators, Kaur K, Taylor J, Tomlinson IP. DNA polymerase ϵ and δ exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum Mol Genet.* 2013 Jul 15 ;22(14):2820-8. doi: 10.1093/hmg/ddt131. Epub 2013 Mar 24.
- Ciano N, Galasso MG, Campisi R, Bivona L, Migliore M, Di Maria GU. Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer. *Multidiscip Respir Med.* 2012 ;7(1):29.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies. *PLoS Med.* 2012 ;9(4):e1001200. doi: 10.1371/journal.pmed.1001200. Epub 2012 Apr 3.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer. Endometrial cancer and oral contraceptives: an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2015 Sep;16(9):1061-1070. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00212-0. Epub 2015 Aug 4.
- Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, Marth C, Nout R, Querleu D, Mirza MR, Sessa C; ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Int J Gynecol Cancer.* 2016 Jan;26(1):2–30.
- Cook LS, Pestak CR, Leung AC, Steed H, Nation J, Swenerton K, Gallagher R, Magliocco A, Köbel M, Brooks-Wilson A, Le N. Combined oral contraceptive use before the first birth and epithelial ovarian cancer risk. *Br J Cancer.* 2017 Jan 17 ;116(2):265-269. doi: 10.1038/bjc.2016.400. Epub 2016 Dec 13.
- Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer.* 1997 Apr 15 ;79(8):1581-6.
- De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nenneke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EUROCARE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):23-34. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70546-1. Epub 2013 Dec 5.
- Degolier TF, Duke GE, Carraway RE. Neurotensin decreases pepsin output and gastrointestinal motility in chickens. *Poult Sci.* 1997 Oct;76(10):1435-9.
- DiSaia PJ, Tewari KS. Recent advancements in the treatment of epithelial ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 2001 Apr;27(2):61-75.
- Djordjevic B, Barkoh BA, Luthra R, Broaddus RR. Relationship between PTEN, DNA mismatch repair, and tumor histotype in endometrial carcinoma: retained positive expression of PTEN preferentially identifies sporadic non-endometrioid carcinomas. *Mod Pathol.* 2013 Oct;26 (10):1401-1412. doi: 10.1038/modpathol.2013.67. Epub 2013 Apr 19.
- Dobner PR, Barber DL, Villa-Komaroff L, McKiernan C. Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(10):3516-20.
- Dossus L, Allen N, Kaaks R, Bakken K, Lund E, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Fournier A, Chabbert-Buffet N, Boeing H, Schütze M, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Lagiou P, Palli D, Krogh V, Tumino R, Vineis P, Mattiello A, Bueno-de-Mesquita HB, Onland-Moret NC, Peeters PH, Dumeaux V, Redondo ML, Duell E, Sanchez-Cantalejo E, Arriola L, Chirlaque MD, Ardanaz E, Manjer J, Borgquist S, Lukanova A, Lundin E, Khaw KT, Wareham N, Key T, Chajes V, Rinaldi S, Slimani N, Mouw T, Gallo V, Riboli E. Reproductive risk factors and endometrial cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2010 Jul 15 ;127(2):442-51. doi: 10.1002/ijc.25050.

- Drewe J, Mihailovic S, D'Amato M, Beglinger C. Regulation of fat-stimulated neurotensin secretion in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1964-70. doi: 10.1210/jc.2007-2238. Epub 2008 Feb 26.
- du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W, Pfisterer J; Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Sep 3 ;95(17):1320-9.
- Du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry.* 1991 ;12(5):455-63.
- Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* 1996 Jan;29(1):1-12.
- Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O, Llorca FP, Cayre A, Kouchkar A, Gompel A, Forgez P. Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget.* 2014 Sep 30 ;5(18):8235-51.
- Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie.* 2011 Sep;93(9):1369-78. doi: 10.1016/j.biochi.2011.04.024. Epub 2011 May 17.
- Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souazé F, Plu-Bureau G, Chaouat M, Lavaur A, Hugol D, Gespach C, Gompel A, Forgez P. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One.* 2009 ;4(1):e4223. doi: 10.1371/journal.pone.0004223. Epub 2009 Jan 19.
- Ehrenfried JA, Zhou Z, Thompson JC, Evers BM. Expression of the neurotensin gene in fetal human liver and fibrolamellar carcinoma. *Ann Surg.* 1994 Oct;220(4):484-9 ; discussion 489-91.
- Elek J, Pinzon W, Park KH, Narayanan R. Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Res.* 2000 Jan-Feb;20(1A):53-8.
- Evers BM, Wang X, Zhou Z, Townsend CM Jr, McNeil GP, Dobner PR. Characterization of promoter elements required for cell-specific expression of the neurotensin/neuromedin N gene in a human endocrine cell line. *Mol Cell Biol.* 1995 Jul;15(7):3870-81.
- Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides.* 2006 Oct;27(10):2424-33. Epub 2006 Aug 9.
- Faber MT, Kjær SK, Dehlendorff C, Chang-Claude J, Andersen KK, Høgdall E, Webb PM, Jordan SJ; Australian Cancer Study (Ovarian Cancer). Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: a pooled analysis of 21 case-control studies. *Cancer Causes Control.* 2013 May;24(5):989-1004. doi: 10.1007/s10552-013-0174-4. Epub 2013 Mar 2.
- Féliciangéli S, Kitabgi P. Insertion of dibasic residues directs a constitutive protein to the regulated secretory pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 11 ;290(1):191-6.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1 ;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
- Ferris CF, George JK, Eastwood G, Potegal M, Carraway RE. Plasma levels of human neurotensin: methodological and physiological considerations. *Peptides.* 1991 Mar-Apr;12(2):215-20.

- Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, Kline R, Burger RA, Goodman A, Burks RT. Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 1 ;22(11):2159-66.
- Fleming ND, Soliman PT, Westin SN, dos Reis R, Munsell M, Klopp AH, Frumovitz M, Nick AM, Schmeler K, Ramirez PT. Impact of Lymph Node Ratio and Adjuvant Therapy in Node-Positive Endometrioid Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 Oct;25(8):1437–44. doi: 10.1097/IGC.0000000000000510.
- Fournier A, Dossus L, Mesrine S, Vilier A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Chabbert-Buffet N. Risks of endometrial cancer associated with different hormone replacement therapies in the E3N cohort, 1992-2008. *Am J Epidemiol*. 2014 Sep 1 ;180(5):508-17. doi: 10.1093/aje/kwu146. Epub 2014 Jul 9.
- Friry C, Feliciangeli S, Richard F, Kitabgi P, Rovere C. Production of recombinant large proneurotensin/neuromedin N-derived peptides and characterization of their binding and biological activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Feb 1 ;290(4):1161-8.
- Fung-Kee-Fung M, Dodge J, Elit L, Lukka H, Chambers A, Oliver T; Cancer Care Ontario Program in Evidence-based Care Gynecology Cancer Disease Site Group. Follow-up after primary therapy for endometrial cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2006 Jun;101(3):520-9. Epub 2006 Mar 23.
- Gailly P, Najimi M, Hermans E. Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett*. 2000 Oct 20 ;483(2-3):109-13.
- Galaal K, Al Moundhri M, Bryant A, Lopes AD, Lawrie TA. Adjuvant chemotherapy for advanced endometrial cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 May 15 ;(5):CD010681. doi: 10.1002/14651858.CD010681.pub2.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013 Apr 2 ;6(269):pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
- Garg K, Levine DA, Olvera N, Dao F, Bisogna M, Secord AA, Berchuck A, Cerami E, Schultz N, Soslow RA. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jan;37(1):138-46. doi: 10.1097/PAS.0b013e31826cabbd.
- Gassel AM, Backe J, Krebs S, Schön S, Caffier H, Müller-Hermelink HK. Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long-term outcome. *J Clin Pathol*. 1998 Jan;51(1):25-9.
- Gauchotte G, Hergalant S, Vigouroux C, Casse JM, Houlgatte R, Kaoma T, Helle D, Brochin L, Rech F, Peyre M, Labrousse F, Vallar L, Gueant JL, Vignaud JM, Battaglia-Hsu SF. Cytoplasmic overexpression of RNA-binding protein HuR is a marker of poor prognosis in meningioma, and HuR knockdown decreases meningioma cell growth and resistance to hypoxia. *J Pathol*. 2017 Aug;242(4):421-434. doi:10.1002/path.4916
- Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu S-F, Soudant M, Pinelli C, et al. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):283–91.
- Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, Venkatraman E, Boyd J. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2003 Aug;90(2):378-81.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15 ;31(1):13–20.

- Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Dassler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* Baltim Md. 1997 Sep;26(3):573–8.
- Giangaspero F, Burger PC, Budwit DA, Usellini L, Mancini AM. Regulatory peptides in neuronal neoplasms of the central nervous system. *Clin Neuropathol*. 1985 May-Jun;4(3):111-5.
- Gillatt DJ, Shulkes A, Read DM, Hardy KJ. Metabolism of neurotensin by isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol*. 1990 Jun;258(6 Pt 1):E930-6.
- Giorgi RR, Chile T, Bello AR, Reyes R, Fortes MA, Machado MC, Cescato VA, Musolino NR, Bronstein MD, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML.. Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol*. 2008 ;20:1052-7. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01761.x. Epub 2008 Jul 8.
- Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*. 1999 Jan;17(1):409-22.
- Gompel A. Progesterone and progestin and the endometrium in perimenopause and in menopausal hormone therapy. *Climacteric* 2018 (in press).
- Guha S, Lunn JA, Santiskulvong C, Rozengurt E. Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res*. 2003 May 15 ;63(10):2379-87.
- Guha S, Rey O, Rozengurt E. Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res*. 2002 Mar 15 ;62(6):1632-40.
- Gui X, Guzman G, Dobner PR, Kadkol SS. Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides*. 2008 Sep;29(9):1609-15. doi: 10.1016/j.peptides.2008.04.014. Epub 2008 May 2.
- Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, Oury-Donat F, Bachy A, Poncelet M, Steinberg R, Suaud-Chagny MF, Santucci V, Vita N, Pecceu F, Labbé-Jullié C, Kitabgi P, Soubrié P, Le Fur G, Maffrand JP. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Feb;280(2):802-12.
- Hammer RA, Leeman SE, Carraway R, Williams RH. Isolation of human intestinal neurotensin. *J Biol Chem*. 1980 Mar 25 ;255(6):2476-80.
- Harada E, Niiyama M, Syuto B. Hepatic bile and pancreatic exocrine secretions evoked by gastrointestinal peptides in sheep. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1986 ;85(4):729-34.
- Harvey CB, Wang Y, Darmoul D, Phillips A, Mantei N, Swallow DM. Characterisation of a human homologue of a yeast cell division cycle gene, MCM6, located adjacent to the 5' end of the lactase gene on chromosome 2q21. *FEBS Lett*. 1996 Dec 2 ;398(2-3):135–40.
- Hassan S, Dobner PR, Carraway RE. Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells. *Regul Pept*. 2004 Aug 15 ;120(1-3):155-66.
- Helder-Woolderink JM, Blok EA, Vasen HF, Hollema H, Mourits MJ, De Bock GH. Ovarian cancer in Lynch syndrome; a systematic review. *Eur J Cancer*. 2016 Mar;55:65-73. doi: 10.1016/j.ejca.2015.12.005. Epub 2016 Jan 13.
- Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K. Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biol Reprod*. 2014 Aug;91(2):53. doi: 10.1095/biolreprod.113.112789. Epub 2014 Jul 16.
- Hiraiwa A, Fujita M, Adachi A, Ono H, Nagasaka T, Matsumoto Y, Ohashi M, Tomita Y, Ishibashi M. Specific distribution patterns of hCDC47 expression in cutaneous diseases. *J Cutan Pathol*. 1998 Jul;25(6):285–90.

- Hiraiwa A, Fujita M, Nagasaka T, Adachi A, Ohashi M, Ishibashi M. Immunolocalization of hCDC47 protein in normal and neoplastic human tissues and its relation to growth. *Int J Cancer*. 1997 Apr 22 ;74(2):180–4.
- Hsu CY, Bristow R, Cha MS, Wang BG, Ho CL, Kurman RJ, Wang TL, Shih IeM. Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 1 ;10(19):6432-6.
- INCa. Cancer de l'endomètre ; rapport intégral. 2010.
- Ishihara M, Mukai H, Nagai S, Onozawa M, Nihei K, Shimada T, Wada N. Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast cancer: effects of biologic subtype and Ki67 overexpression on survival. *Oncology*. 2013 ;84(3):135–40.
- Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin*. 2011 May-Jun;61(3):183-203. doi: 10.3322/caac.20113. Epub 2011 Apr 26.
- Jones S, Wang TL, Shih IeM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Papadopoulos N. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science*. 2010 Oct 8 ;330(6001):228-31. doi: 10.1126/science.1196333. Epub 2010 Sep 8.
- Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget*. 2015 Oct 6 ;6(30):29975-90. doi: 10.18632/oncotarget.5034.
- Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 May 2 ;497(7447):67-73. doi: 10.1038/nature12113.
- Kato K, Toki T, Shimizu M, Shiozawa T, Fujii S, Nikaido T, Konishi I. Expression of replication-licensing factors MCM2 and MCM3 in normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium: correlation with expression of Ki-67 and estrogen and progesterone receptors. *Int J Gynecol Pathol*. 2003 Oct;22(4):334–40.
- Kim HS, Kim TH, Chung HH, Song YS. Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014 Apr 2 ;110(7):1878-90. doi: 10.1038/bjc.2014.29. Epub 2014 Feb 11.
- Kim JT, Li J, Song J, Lee EY, Weiss HL, Townsend CM Jr, Evers BM. Differential expression and tumorigenic function of neurotensin receptor 1 in neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget*. 2015 Sep 29 ;6(29):26960-70. doi: 10.18632/oncotarget.4745.
- Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C, Berkowitz RS, Muto MG, Crum CP. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*. 2007 Feb;31(2):161-9.
- Kislauskis E, Bullock B, McNeil S, Dobner PR. The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem*. 1988 Apr 5 ;263(10):4963-8.
- Kislauskis E, Dobner PR. Mutually dependent response elements in the cis-regulatory region of the neurotensin/neuromedin N gene integrate environmental stimuli in PC12 cells. *Neuron*. 1990 May;4(5):783-95.
- Kitabgi P, Carraway R, Leeman SE. Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem*. 1976 Nov 25 ;251(22):7053-8.
- Kitabgi P, Checler F, Mazella J, Vincent JP. Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Rev Clin Basic Pharm*. 1985 Jul-Dec;5(3-4):397-486.

- Kitabgi P, De Nadai F, Labbe-Jullie C, Dubuc I, Nouel D, Costentin J, Masuo Y, Rostene W, Woulfe J, Lafortune L, et al. Functional and pharmacological aspects of central neuropeptidergic transmission mediated by neurotensin and neuromedin n. *Clin Neuropharmacol.* 1992 ;15 Suppl 1 Pt A:313A-314A.
- Kitabgi P, Freychet P. Effects of neurotensin on isolated intestinal smooth muscles. *Eur J Pharmacol.* 1978 Aug 15 ;50(4):349-57.
- Kitabgi P. Inactivation of neurotensin and neuromedin N by Zn metallopeptidases. *Peptides.* 2006 Oct;27(10):2515-22. Epub 2006 Aug 9.
- Kitabgi P. Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2002 Sep;5(5):764-76.
- Kleczkowska P, Lipkowski AW. Neurotensin and neurotensin receptors: characteristic, structure-activity relationship and pain modulation--a review. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep 15 ;716(1-3):54-60. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.03.004. Epub 2013 Mar 14.
- Köbel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, Gilks CB; Cheryl Brown Ovarian Cancer Outcomes Unit of the British Columbia Cancer Agency, Vancouver BC. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2010 May;29(3):203-11. doi: 10.1097/PGP.0b013e3181c042b6.
- Koh WJ, Abu-Rustum NR, Bean S, Bradley K, Campos SM, Cho KR, Chon HS, Chu C, Cohn D, Crispens MA, Damast S, Dorigo O, Eifel PJ, Fisher CM, Frederick P, Gaffney DK, George S, Han E, Higgins S, Huh WK, Lurain JR 3rd, Mariani A, Mutch D, Nagel C, Nekhlyudov L, Fader AN, Remmenga SW, Reynolds RK, Tillmanns T, Ueda S, Wyse E, Yashar CM, McMillian NR, Scavone JL. Uterine Neoplasms, Version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018 Feb;16(2):170-199. doi: 10.6004/jnccn.2018.0006.
- Konstantinos K, Marios S, Anna M, Nikolaos K, Efstratios P, Paulina A. Expression of Ki-67 as proliferation biomarker in imprint smears of endometrial carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 2013 Mar;41(3):212–7.
- Koushik A, Grundy A, Abrahamowicz M, Arseneau J, Gilbert L, Gotlieb WH, Lacaille J, Mes-Masson AM, Parent MÉ, Provencher DM, Richardson L, Siemiatycki J. Hormonal and reproductive factors and the risk of ovarian cancer. *Cancer Causes Control.* 2017 May;28(5):393-403. doi: 10.1007/s10552-016-0848-9. Epub 2017 Jan 19.
- Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor. *Cell.* 1995 May 19 ;81(4):601–9.
- Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011 Jul;42(7):918-31. doi: 10.1016/j.humpath.2011.03.003.
- Labib K, Tercero JA, Diffley JF. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science.* 2000 Jun 2 ;288(5471):1643–7.
- LaValle CR, George KM, Sharlow ER, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Dec;1806(2):183-92. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.05.003. Epub 2010 May 24.
- Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, Dougherty B, Orr M, Hodgson D, Barrett JC, Matulonis U. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):852-61. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70228-1. Epub 2014 May 31.

- Lee JK, Hurwitz J. Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23 ;275(25):18871–8.
- Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer*. 2007 Jan 15 ;96(1):11-5.
- Leyton J, Garcia-Marin L, Jensen RT, Moody TW. Neurotensin causes tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2002 May 10 ;442(3):179-86.
- Li SS, Xue WC, Khoo US, Ngan HY, Chan KY, Tam IY, Chiu PM, Ip PP, Tam KF, Cheung AN. Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology*. 2005 Mar;46(3):307–13.
- Lim D, Oliva E. Precursors and pathogenesis of ovarian carcinoma. *Pathology*. 2013 Apr;45(3):229-42. doi: 10.1097/PAT.0b013e32835f2264.
- Luttinger D, King RA, Sheppard D, Strupp J, Nemeroff CB, Prange AJ Jr. The effect of neurotensin on food consumption in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1982 Jul 16 ;81(3):499-503.
- Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol*. 2009 Apr;3(2):97-137. doi: 10.1016/j.molonc.2009.02.004. Epub 2009 Feb 21.
- MacCallum DE, Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*. 2000 Apr;190(5):537-44.
- Mailleux P, Przedborski S, Beaumont A, Verslijpe M, Depierreux M, Levivier M, Kitabgi P, Roques BP, Vanderhaeghen JJ. Neurotensin high affinity binding sites and endopeptidase 24.11 are present respectively in the meningotheial and in the fibroblastic components of human meningiomas. *Peptides*. 1990 Nov-Dec;11(6):1245-53.
- Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, Gully D, Laburthe M. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer*. 1999 Jan 29 ;80(3):448-54.
- Mazella J, Vincent JP. Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides*. 2006 Oct;27(10):2469-75. Epub 2006 Jul 26.
- Mazella J, Zsürger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, Ferrara P, Vita N, Gully D, Maffrand JP, Vincent JP. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 1998 Oct 9 ;273(41):26273-6.
- Melander O, Maisel AS, Almgren P, Manjer J, Belting M, Hedblad B, Engström G, Kilger U, Nilsson P, Bergmann A, Orho-Melander M. Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA*. 2012 Oct 10 ;308(14):1469-75. doi: 10.1001/jama.2012.12998.
- Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rüdiger T, Müller-Hermelink HK, Kreipe H. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol*. 2002 Nov;198(3):292-9.
- Mijatovic T, Gailly P, Mathieu V, De Nève N, Yeaton P, Kiss R, Decaestecker C. Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Cell Oncol*. 2007 ;29(4):315-26.
- Mistry A, Vijayan E. Neurotensin enhances estradiol induced DNA synthesis in immature rat uterus. *Life Sci*. 1985 May 27 ;36(21):2063-7.

- Mittica G, Ghisoni E, Giannone G, Aglietta M, Genta S, Valabrega G. Checkpoint inhibitors in endometrial cancer: preclinical rationale and clinical activity. *Oncotarget*. 2017 Aug 8 ;8(52):90532-90544. doi: 10.18632/oncotarget.20042. eCollection 2017 Oct 27.
- Moody TW, Carney DN, Korman LY, Gazdar AF, Minna JD. Neurotensin is produced by and secreted from classic small cell lung cancer cells. *Life Sci*. 1985 May 6 ;36(18):1727-32.
- Moody TW, Chiles J, Casibang M, Moody E, Chan D, Davis TP. SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides*. 2001 Jan;22(1):109-15.
- Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, Hindié E. Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: perspectives with bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y receptors. *J Nucl Med*. 2014 Oct;55(10):1650-7. doi: 10.2967/jnumed.114.142000. Epub 2014 Sep 4.
- Mulè F, Serio R, Postorino A. Motility pattern of isolated rat proximal colon and excitatory action of neurotensin. *Eur J Pharmacol*. 1995 Mar 6 ;275(2):131-7.
- Najimi M, Robert JJ, Mallet J, Rostène W, Forgez P. Neurotensin induces tyrosine hydroxylase gene activation through nitric oxide and protein kinase C signaling pathways. *Mol Pharmacol*. 2002 Sep;62(3):647-53.
- Najimi M, Souazé F, Méndez M, Hermans E, Berbar T, Rostène W, Forgez P. Activation of receptor gene transcription is required to maintain cell sensitization after agonist exposure. Study on neurotensin receptor. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21 ;273(34):21634-41.
- NCI, NHGRI. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Data Portal Use Case Workshop. 2008.
- Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, Sorensen PG, Hansen M, Sessa C, de Swart CA, Hirsch FR, Lund B, van Houwelingen HC. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Sep;18(17):3084-92.
- Nemeroff CB, Bissette G, Manberg PJ, Osbahr AJ 3rd, Breese GR, Prange AJ Jr. Neurotensin-induced hypothermia: evidence for an interaction with dopaminergic systems and the hypothalamic--pituitary--thyroid axis. *Brain Res*. 1980 Aug 11 ;195(1):69-84.
- Nemeroff CB, Bissette G, Prange AJ Jr, Loosen PT, Barlow TS, Lipton MA. Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res*. 1977 Jun 17 ;128(3):485-96.
- Nemeroff CB, Osbahr AJ 3rd, Manberg PJ, Ervin GN, Prange AJ Jr. Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Oct;76(10):5368-71.
- Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, Kjaer SK, Mallin K, Mosgaard BJ, Purdie DM, Risch HA, Vergona R, Wu AH. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2002 Feb 1 ;155(3):217-24.
- Ngô C, Brugier C, Plancher C, de la Rochefordière A, Alran S, Féron JG, Malhaire C, Scholl S, Sastre X, Rouzier R, Fourchotte V; Gynecological Cancer Study Group of Institut Curie. Clinico-pathology and prognosis of endometrial cancer in patients previously treated for breast cancer, with or without tamoxifen: a comparative study in 363 patients. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Oct;40(10):1237-44. doi: 10.1016/j.ejso.2014.05.007. Epub 2014 Jun 3.
- Nouel D, Sarret P, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A. Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience*. 1999 ;94(4):1189-97.
- Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci*. 2012 Apr;35(4):261-70. doi: 10.1016/j.tins.2012.01.003. Epub 2012 Feb 16.

- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem*. 2001 Jun 1 ;276(22):19452-60. Epub 2001 Mar 9.
- Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res*. 1998 May 15 ;58(10):2095-7.
- Olsen CM, Nagle CM, Whiteman DC, Ness R, Pearce CL, Pike MC, Rossing MA, Terry KL, Wu AH; Australian Cancer Study (Ovarian Cancer). Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Mar 22 ;20(2):251-62. doi: 10.1530/ERC-12-0395. Print 2013 Apr.
- Orbo A, Nilsen MN, Arnes MS, Pettersen I, Larsen K. Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2003 Apr;22(2):141-8.
- Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, Barisic D, Beketic-Oreskovic L. A significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004 Apr;93(1):34-40.
- Osadchii OE. Emerging role of neurotensin in regulation of the cardiovascular system. *Eur J Pharmacol*. 2015 Sep 5 ;762:184-92. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.025. Epub 2015 May 21.
- Ouyang Q, Gong X, Xiao H, Zhou J, Xu M, Dai Y, Xu L, Feng H, Cui H, Yi L. Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. *Mol Cancer*. 2015 Feb 3 ;14:21. doi: 10.1186/s12943-015-0290-8.
- Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Park-Simon TW, Rustin G, Joly F, Mirza MR, Plante M, Quinn M, Poveda A, Jayson GC, Stark D, Swart AM, Farrelly L, Kaplan R, Parmar MK, Perren TJ; ICON7 trial investigators. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2015 Aug;16(8):928-36. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00086-8. Epub 2015 Jun 23.
- Palacios J, Gamallo C. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 1998 Apr 1 ;58(7):1344-7.
- Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, Kemp Z, Spain SL, Guarino E, Salguero I, Sherborne A, Chubb D, Carvajal-Carmona LG, Ma Y, Kaur K, Dobbins S, Barclay E, Gorman M, Martin L, Kovac MB, Humphray S; CORGI Consortium; WGS500 Consortium, Lucassen A, Holmes CC, Bentley D, Donnelly P, Taylor J, Petridis C, Roylance R, Sawyer EJ, Kerr DJ, Clark S, Grimes J, Kearsey SE, Thomas HJ, McVean G, Houlston RS, Tomlinson I. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*. 2013 Feb;45(2):136-44. doi: 10.1038/ng.2503. Epub 2012 Dec 23.
- Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Riboldi GL, Surace M, Benzi G, et al. Diabetes and endometrial cancer: an Italian case-control study. *Int J Cancer*. 1999 May 17 ;81(4):539-42.
- Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, Floriani I, Jayson G, Lamont A, Tropé C; ICON and AGO Collaborators. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*. 2003 Jun 21 ;361(9375):2099-106.
- Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, Nagle CM, Doherty JA, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Chang-Claude J, Hein R, Lurie G, Wilkens LR, Carney ME, Goodman MT, Moysich K, Kjaer SK,

- Hogdall E, Jensen A, Goode EL, Fridley BL, Larson MC, Schildkraut JM, Palmieri RT, Cramer DW, Terry KL, Vitonis AF, Titus LJ, Ziogas A, Brewster W, Anton-Culver H, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Anderson AR, Brueggmann D, Fasching PA, Gayther SA, Huntsman DG, Menon U, Ness RB, Pike MC, Risch H, Wu AH, Berchuck A; Ovarian Cancer Association Consortium. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol.* 2012 Apr;13(4):385-94. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70404-1. Epub 2012 Feb 22.
- Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stähle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MK, Oza AM; ICON7 Investigators. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29 ;365(26):2484-96. doi: 10.1056/NEJMoa1103799.
 - Petru E, Lück H-J, Stuart G, Gaffney D, Millan D, Vergote I ; Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG). Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG) proposals for changes of the current FIGO staging system. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Apr;143(2):69–74. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.12.015. Epub 2009 Feb 4.
 - Pettibone DJ, Totaro JA. High affinity binding of [3H]neurotensin of rat uterus. *Peptides.* 1987 Nov-Dec;8(6):1169-72.
 - Pfisterer J, Plante M, Vergote I, du Bois A, Hirte H, Lacave AJ, Wagner U, Stähle A, Stuart G, Kimmig R, Olbricht S, Le T, Emerich J, Kuhn W, Bentley J, Jackisch C, Lück HJ, Rochon J, Zimmermann AH, Eisenhauer E; AGO-OVAR; NCIC CTG; EORTC GCG. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 10 ;24(29):4699-707. Epub 2006 Sep 11.
 - Pohlert T. The Pariwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R package. 2014.
 - Prat J; FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol.* 2015 Apr;26(2):87-9. doi: 10.3802/jgo.2015.26.2.87.
 - Prat J; FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet.* 2014 Jan;124(1):1-5. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.10.001. Epub 2013 Oct 22.
 - Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, Sorio R, Vergote I, Witteveen P, Bamias A, Pereira D, Wimberger P, Oaknin A, Mirza MR, Follana P, Bollag D, Ray-Coquard I. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2014 May 1 ;32(13):1302-8. doi: 10.1200/JCO.2013.51.4489. Epub 2014 Mar 17.
 - Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E, GebSKI V, Heywood M, Vasey PA, Volgger B, Vergote I, Pignata S, Ferrero A, Sehouli J, Lortholary A, Kristensen G, Jackisch C, Joly F, Brown C, Le Fur N, du Bois A. Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10 ;28(20):3323-9. doi: 10.1200/JCO.2009.25.7519. Epub 2010 May 24.
 - Purdie DM, Bain CJ, Webb PM, Whiteman DC, Pirozzo S, Green AC. Body size and ovarian cancer: case-control study and systematic review (Australia). *Cancer Causes Control.* 2001 Nov;12(9):855-63.
 - R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015.
 - Reinecke M. Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem.* 1985 ;16(1):1-172.

- Rice MS, Murphy MA, Tworoger SS. Tubal ligation, hysterectomy and ovarian cancer: A meta-analysis. *J Ovarian Res.* 2012 May 15 ;5(1):13. doi: 10.1186/1757-2215-5-13.
- Risch HA, Marrett LD, Howe GR. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 1994 Oct 1 ;140(7):585-97.
- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kuperstein G, Abrahamson JL, Fan I, Wong B, Narod SA. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar;68(3):700-10. Epub 2001 Feb 15.
- Rizzuto I, Behrens RF, Smith LA. Risk of ovarian cancer in women treated with ovarian stimulating drugs for infertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Aug 13 ;(8):CD008215. doi: 10.1002/14651858.CD008215.pub2.
- Rodriguez Y, Almeida TA, Valladares F, Baez D, Montes de Oca F, Garcia C, Dorta I, Hernandez M, Reyes R, Bello AR. Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biol Reprod.* 2010 Oct;83(4):641-7. doi: 10.1095/biolreprod.110.084962. Epub 2010 Jun 30.
- Rodriguez Y, Baez D, de Oca FM, Garcia C, Dorta I, Reyes R, Valladares F, Almeida TA, Bello AR. Comparative analysis of the ERalpha/ERbeta ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 Jul;30(4):354-63. doi: 10.1097/PGP.0b013e31820918cb.
- Rostène WH, Alexander MJ. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1997 Apr;18(2):115-73.
- Rouibi K, Rompré PP. Role of context in neurotensin-induced sensitization to the locomotor stimulant effect of amphetamine. *Peptides.* 2014 Aug;58:103-7. doi: 10.1016/j.peptides.2014.06.010. Epub 2014 Jun 23.
- Ryan NA, Evans DG, Green K, Crosbie EJ. Pathological features and clinical behavior of Lynch syndrome-associated ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2017 Mar;144(3):491-495. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.01.005. Epub 2017 Jan 6.
- Saada S, Marget P, Fauchais AL, Lise MC, Chemin G, Sindou P, Martel C, Delpy L, Vidal E, Jaccard A, Troutaud D, Lalloué F, Jauberteau MO. Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol.* 2012 Dec 1 ;189(11):5293-303. doi: 10.4049/jimmunol.1102937. Epub 2012 Oct 29.
- Sakumoto R, Hayashi KG, Saito S, Kanahara H, Kizaki K, Iga K. Comparison of the global gene expression profiles in the bovine endometrium between summer and autumn. *J Reprod Dev.* 2015 ;61 (4):297-303. doi:10.1262/jrd.2015-024
- Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1998 Nov;4(11):2779–85.
- Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1999 May;17(5):1382–90.
- Samartzis EP, Noske A, Dedes KJ, Fink D, Imesch P. ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 12 ;14(9):18824-49. doi: 10.3390/ijms140918824.
- Seethalakshmi L, Mitra SP, Dobner PR, Menon M, Carraway RE. Neurotensin receptor expression in prostate cancer cell line and growth effect of NT at physiological concentrations. *Prostate.* 1997 May 15 ;31(3):183-92.

- Sénéchal C, Cottereau E, de Pauw A, Elan C, Dagousset I, Fourchotte V, Gauthier-Villars M, Lae M, Stoppa-Lyonnet D, Buecher B. [Environmental and genetic risk factors for endometrial carcinoma]. *Bull Cancer*. 2015 Mar;102(3):256-69. doi: 10.1016/j.bulcan.2015.01.006. Epub 2015 Feb 26.
- Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, Wolk A, Wentzensen N, Weiss NS, Webb PM, van den Brandt PA, van de Vijver K, Thompson PJ; Australian National Endometrial Cancer Study Group, Strom BL, Spurdle AB, Soslow RA, Shu XO, Schairer C, Sacerdote C, Rohan TE, Robien K, Risch HA, Ricceri F, Rebbeck TR, Rastogi R, Prescott J, Polidoro S, Park Y, Olson SH, Moysich KB, Miller AB, McCullough ML, Matsuno RK, Magliocco AM, Lurie G, Lu L, Lissowska J, Liang X, Lacey JV Jr, Kolonel LN, Henderson BE, Hankinson SE, H  kansson N, Goodman MT, Gaudet MM, Garcia-Closas M, Friedenreich CM, Freudenheim JL, Doherty J, De Vivo I, Courneya KS, Cook LS, Chen C, Cerhan JR, Cai H, Brinton LA, Bernstein L, Anderson KE, Anton-Culver H, Schouten LJ, Horn-Ross PL. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol*. 2013 Jul 10 ;31(20):2607-18. doi: 10.1200/JCO.2012.48.2596. Epub 2013 Jun 3.
- Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenshein NB, Lewis JL, Jr., Knapp RC, Stolley PD, Schottenfeld D. Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. *N Engl J Med*. 1985 Oct 17 ;313(16):969-72. doi:10.1056/NEJM198510173131601
- Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenshein NB, Lewis JL Jr, Knapp RC, Stolley PD, Schottenfeld D. Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. *N Engl J Med*. 1985 Oct 17 ;313(16):969-72.
- Shi LF, Wu Y, Li CY. Hormone therapy and risk of ovarian cancer in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Menopause*. 2016 Apr;23(4):417-24. doi: 10.1097/GME.0000000000000550.
- Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, Kikkawa N, Sasaki K, Chazono H, Hanazawa T, Okamoto Y, Seki N. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int J Cancer*. 2008 Oct 15 ;123(8):1816-23. doi: 10.1002/ijc.23710.
- Simpkins F, Drake R, Escobar PF, Nutter B, Rasool N, Rose PG. A phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced and recurrent endometrial carcinoma (EMCA). *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):240-5. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.12.004. Epub 2014 Dec 6.
- Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih IeM. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Mar 19 ;95(6):484-6.
- Soler M, Chatenoud L, Negri E, Parazzini F, Franceschi S, la Vecchia C. Hypertension and hormone-related neoplasms in women. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1999 Aug;34(2):320-5.
- Som  i S, Gompel A, Rostène W, Forgez P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jul 12 ;295(2):482-8.
- Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PloS One*. 2012 ;7(10):e47068. doi: 10.1371/journal.pone.0047068. Epub 2012 Oct 5.
- Souazé F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res*. 2006 Jun 15 ;66(12):6243-9.
- Souazé F, Forgez P. Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation. *Peptides*. 2006 Oct;27(10):2493-501. Epub 2006 Aug 4.

- Souazé F, Rostène W, Forgez P. Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*. 1997 Apr 11 ;272(15):10087-94.
- Souza F, Viardot-Foucault V, Roulet N, Toy-Miou-Leong M, Gompel A, Bruyneel E, Comperat E, Faux MC, Mareel M, Rostene W, Flejou JF, Gespach C, Forgez P. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis*. 2006 Apr ;27 (4):708-716. doi:10.1093/carcin/bgi269
- Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res*. 2006 Mar 15 ;66(6):3303-9.
- Strosberg JR, Nasir A, Hodul P, Kvols L. Biology and treatment of metastatic gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Gastrointest Cancer Res GCR*. 2008 May;2(3):113–25.
- Swift SL, Burns JE, Maitland NJ. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res*. 2010 Jan 1 ;70(1):347-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1252.
- Tanaka K, Masu M, Nakanishi S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron*. 1990 Jun;4(6):847-54.
- Tanaka T, Knapp D, Nasmyth K. Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell*. 1997 Aug 22 ;90(4):649–60.
- Tang KH, Ma S, Lee TK, Chan YP, Kwan PS, Tong CM, Ng IO, Man K, To KF, Lai PB, Lo CM, Guan XY, Chan KW. CD133(+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling. *Hepatology*. 2012 Mar;55(3):807-20. doi: 10.1002/hep.24739. Epub 2012 Jan 13.
- Taylor RM, Severns V, Brown DC, Bisoffi M, Sillerud LO. Prostate cancer targeting motifs: expression of alphanu beta3, neurotensin receptor 1, prostate specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in human prostate cancer cell lines and xenografts. *Prostate*. 2012 ;72:523-32.
- Theodorsson-Norheim E, Rosell S. Characterization of human plasma neurotensin-like immunoreactivity after fat ingestion. *Regul Pept*. 1983 Jul;6(3):207-18.
- Therneau T. A Package for Survival Analysis in S_. version 2.38. 2015.
- Thigpen JT, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, DuBeshter B, Burger RA, Liao S. Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*. 2004 Oct 1 ;22(19):3902-8.
- Thigpen T, duBois A, McAlpine J, DiSaia P, Fujiwara K, Hoskins W, Kristensen G, Mannel R, Markman M, Pfisterer J, Quinn M, Reed N, Swart AM, Berek J, Colombo N, Freyer G, Gallardo D, Plante M, Poveda A, Rubinstein L, Bacon M, Kitchener H, Stuart GC; Gynecologic Cancer InterGroup. First-line therapy in ovarian cancer trials. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 May;21(4):756-62. doi: 10.1097/IGC.0b013e31821ce75d.
- Tomao F, Lo Russo G, Spinelli GP, Stati V, Prete AA, Prinzi N, Sinjari M, Vici P, Papa A, Chiotti MS, Benedetti Panici P, Tomao S. Fertility drugs, reproductive strategies and ovarian cancer risk. *J Ovarian Res*. 2014 May 8 ;7:51. doi: 10.1186/1757-2215-7-51. eCollection 2014.
- Törnberg SA, Carstensen JM. Relationship between Quetelet's index and cancer of breast and female genital tract in 47,000 women followed for 25 years. *Br J Cancer*. 1994 Feb;69(2):358–61.
- Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, Contu G, Grandi G, Cagnacci A, Schilder RJ, Cortesi L. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int*. 2015 ;2015:341723. doi: 10.1155/2015/341723. Epub 2015 May 17.

- Toy-Miou-Leong M, Cortes CL, Beaudet A, Rostène W, Forgez P. Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26 ;279(13):12636-46. Epub 2003 Dec 29.
- Trétarre B, Molinié F, Woronoff AS, Bossard N, Bessaoud F, Marrer E, Grosclaude P, Guizard AV, Delafosse P, Bara S, Velten M, Lapôtre-Ledoux B, Ligier K, Léone N, Arveux P, Uhry Z. Ovarian cancer in France: trends in incidence, mortality and survival, 1980-2012. *Gynecol Oncol*. 2015 Nov;139(2):324-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.09.013. Epub 2015 Sep 14.
- Turner JT, James-Kracke MR, Camden JM. Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Jun;253(3):1049-56.
- Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1999 ;68:649–86.
- Ulich TR, Cheng L, Glover H, Yang K, Lewin KJ. A colonic adenocarcinoma with argentaffin cells. An immunoperoxidase study demonstrating the presence of numerous neuroendocrine products. *Cancer*. 1983 Apr 15 ;51(8):1483-9.
- Umezu K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, Tanemura K. Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev*. 2016 Aug 25 ;62(4):409-14. doi:10.1262/jrd.2016-055. Epub 2016 May 20.
- Ushiro S, Mizoguchi K, Yoshida S, Jimi S, Fujiwara T, Yoshida M, Wei ET, Kitabgi P, Amagaya S, Ono M, Kuwano M. Stimulation of cell-surface urokinase-type plasminogen activator activity and cell migration in vascular endothelial cells by a novel hexapeptide analogue of neurotensin. *FEBS Lett*. 1997 Dec 1 ;418(3):341-5.
- Valerie NC, Casarez EV, Dasilva JO, Dunlap-Brown ME, Parsons SJ, Amorino GP, Dziegielewski J. Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2011 Nov 1 ;71(21):6817-26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1646. Epub 2011 Sep 8.
- van Wijk FH, Aapro MS, Bolis G, Chevallier B, van der Burg ME, Poveda A, de Oliveira CF, Tumolo S, Scotto di Palumbo V, Piccart M, Franchi M, Zanaboni F, Lacave AJ, Fontanelli R, Favalli G, Zola P, Guastalla JP, Rosso R, Marth C, Nooij M, Presti M, Scarabelli C, Splinter TA, Ploch E, Beex LV, ten Bokkel Huinink W, Forni M, Melpignano M, Blake P, Kerbrat P, Mendiola C, Cervantes A, Goupil A, Harper PG, Madronal C, Namer M, Scarfone G, Stoot JE, Teodorovic I, Coens C, Vergote I, Vermorken JB ; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Group. Doxorubicin versus doxorubicin and cisplatin in endometrial carcinoma: definitive results of a randomised study (55872) by the EORTC Gynaecological Cancer Group. *Ann Oncol*. 2003 Mar;14(3):441-8.
- Vandenbulcke F, Nouel D, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A. Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci*. 2000 Sep;113 (Pt 17):2963-75.
- Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 2009 Sep;16(5):267-82. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa.
- Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47 Suppl 3:S88-92. doi: 10.1016/S0959-8049(11)70152-6.

- Vigouroux C, Casse J-M, Battaglia-Hsu S-F, Brochin L, Luc A, Paris C, et al. Methyl(R217)HuR and MCM6 are inversely correlated and are prognostic markers in non small cell lung carcinoma. *Lung Cancer Amst Neth*. 2015 Aug;89(2):189–96.
- Vijayan E, Mistry A. Anti-implantation role for substance P and neurotensin in rat. *Indian J Exp Biol*. 1992 Feb;30(2):80-2.
- Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Jul;20(7):302-9.
- Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Dumont X, Kaghad M, Gully D, Le Fur G, Ferrara P, Caput D. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett*. 1993 Feb 8 ;317(1-2):139-42.
- Wang HL, Wu T. G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Feb;36(1):29-36.
- Wang JG, Li NN, Li HN, Cui L, Wang P. Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides*. 2011 Apr;45(2):151-6. doi: 10.1016/j.npep.2011.01.002. Epub 2011 Jan 26.
- Wang X, Wang Q, Ives KL, Evers BM. Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15 ;12(18):5346-55.
- Watters JJ, Dorsa DM. Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms. *J Neurosci*. 1998 Sep 1 ;18(17):6672-80.
- Win AK, Reece JC, Ryan S. Family history and risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2015 Jan;125(1):89-98. doi: 10.1097/AOG.0000000000000563.
- WHO. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 2014.
- Wu Z, Martinez-Fong D, Tredaniel J, Forgez P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Jan 17 ;3:184. doi: 10.3389/fendo.2012.00184. eCollection 2012.
- Yamashita Y, Akatsuka S, Shinjo K, Yatabe Y, Kobayashi H, Seko H, Kajiyama H, Kikkawa F, Takahashi T, Toyokuni S. Met is the most frequently amplified gene in endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with worsened prognosis. *PLoS One*. 2013 ;8(3):e57724. doi: 10.1371/journal.pone.0057724. Epub 2013 Mar 4.
- Ye Y, Long X, Zhang L, Chen J, Liu P, Li H, Wei F, Yu W, Ren X, Yu J. NTS/NTR1 co-expression enhances epithelial-to-mesenchymal transition and promotes tumor metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 25 ;7(43):70303-70322. doi: 10.18632/oncotarget.11854.
- You Z, Komamura Y, Ishimi Y. Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec;19(12):8003–15.
- Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, Fléjou JF, Trédaniel J, Régnard JF, Damotte D, Alifano M, Forgez P. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget*. 2014 Sep 30 ;5(18):8252-69.

- Zhao D, Kuhnt-Moore S, Zeng H, Wu JS, Moyer MP, Pothoulakis C. Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Jun;284(6):C1397-404. Epub 2003 Feb 12.
- Zhao D, Zhan Y, Koon HW, Zeng H, Keates S, Moyer MP, Pothoulakis C. Metalloproteinase-dependent transforming growth factor-alpha release mediates neurotensin-stimulated MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15 ;279(42):43547-54. Epub 2004 Jul 6.

Annexe 1 : Publications

A. Manuscrit 1

"Expression of neurotensin receptor 1 in endometrial adenocarcinoma is correlated with histological grade and clinical outcome."

Agopiantz M, Forgez P, Casse JM, Lacomme S, Charra-Brunaud C, Clerc-Urmès I, Morel O, Bonnet C, Guéant JL, Vignaud JM, Gompel A, Gauchotte G.

Expression of neurotensin receptor 1 in endometrial adenocarcinoma is correlated with histological grade and clinical outcome

Mikaël Agopian^{1,2} • Patricia Forgez³ • Jean-Matthieu Casse^{2,4} • Stéphanie Lacomme⁵ • Claire Charra-Brunaud⁶ • Isabelle Clerc-Urmès⁷ • Olivier Morel⁸ • Céline Bonnet⁹ • Jean-Louis Guéant² • Jean-Michel Vignaud^{2,4,5} • Anne Gompel^{3,10} • Guillaume Gauchotte^{2,4} 

Received: 8 March 2017 / Revised: 8 July 2017 / Accepted: 6 August 2017
© Springer-Verlag GmbH Deutschland 2017

Abstract The promalignant effects of neurotensin (NTS) are sustained in many solid tumors, including hormone-dependent cancers. As the endometrium is also subjected to hormonal regulation, we evaluated the contribution of NTS to endometrial carcinogenesis. Neurotensin receptor 1 (NTSR1) expression and *NTSR1* promoter methylation (HM450) were analyzed in 385 cases of endometrial carcinoma from The Cancer Genome Atlas (TCGA). Additionally, from a series of 100 endometrial carcinomas, and 66 benign endometrium samples, NTS and NTSR1 labeling was evaluated by immunohistochemistry. Using TCGA series, NTSR1 messenger RNA (mRNA) level was negatively correlated with overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) ($p = 0.0012$ and $p = 0.0116$, respectively), and positively

correlated with the grade ($p = 0.0008$). When including only endometrioid carcinomas, NTSR1 mRNA level continued to be negatively correlated with OS (log-rank: $p < 0.0001$) and PFS (log-rank: $p = 0.002$). A higher NTSR1 mRNA level was significantly associated with a loss of NTSR1 promoter methylation. Immunohistochemical expression of NTS and NTSR1 was significantly increased in adenocarcinoma ($n = 100$), as compared to benign endometrium ($p < 0.001$). NTSR1 expression was positively correlated with grade ($p = 0.004$). High immunohistochemical expression of cytoplasmic NTSR1 was significantly correlated with a shorter OS and PFS ($p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively). This correlation remained significant when excluding non-endometrioid subtypes ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). In multivariate

Anne Gompel and Guillaume Gauchotte equally contributed to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00428-017-2215-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Patricia Forgez
patricia.forgez@inserm.fr

✉ Guillaume Gauchotte
g.gauchotte@chru-nancy.fr

¹ Department of Medical Gynecology, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² INSERM U954, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ INSERM U1007, Université Paris Descartes, 45, Rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

⁴ Department of Pathology, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

⁵ Centre de Ressources Biologiques, BB-0033-00035, CHRU de Nancy, Nancy, France

⁶ Department of Radiotherapy, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁷ ESPRI-BioBase, Plateforme d'Aide à la Recherche Clinique, CHRU de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁸ Department of Gynecology and Obstetrics, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

⁹ Department of Genetics, CHRU de Nancy, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

¹⁰ Université Paris Descartes, Department of Medical Gynecology, Hôpital Cochin Port-Royal, AP-HP, Paris, France

analysis, the expression of NTSR1 was an independent prognostic factor ($p = 0.004$). NTSR1 overexpression is a poor prognostic factor in endometrial cancer, highlighting the contribution of NTS in endometrial cancer progression and its uses as a prognostic marker, and as a potential therapeutic target.

Keywords Endometrial adenocarcinoma · Cancer · Endometrium · Neurotensin · NTSR1

Introduction

Endometrial cancer is the most frequent gynecologic cancer in high- and intermediate-income countries and the fourth cancer in women after breast, colon, and lung cancers [1]. About 75% of endometrial cancers are diagnosed at an early stage, but more than two thirds of patients with advanced stages will die from cancer, despite improvements in diagnosis, surgery, and radiotherapy [2–4]. The discovery and characterization of new markers remain necessary in order to evaluate more accurately the prognosis and to develop specific treatments targeted to metastasis initiation and progression processes.

Neurotensin (NTS) and its high-affinity NTS receptor 1 (NTSR1) have been reported to be implicated in carcinogenesis and tumoral progression in several cancers, such as breast cancer [5, 6]. NTS is a 13-amino acid peptide commonly known for its distribution along the gastrointestinal tract [7]. Typical physiological functions for NTS include stimulation of pancreatic and biliary secretions, inhibition of small bowel and gastric motility, and facilitation of fatty acid translocation [8–10]. The central and peripheral functions of NTS are mediated through its interactions with three receptors: NTSR1, NTSR2, and NTSR3 [11]. NTSR1 is poorly or not expressed in most tissues, but we previously demonstrated that its overexpression is an unfavorable prognostic factor, notably in breast and lung cancers [6, 12]. The intracellular localization of the receptor allows activation by autocrine and paracrine mechanisms [13]. Its ligand, NTS, is variably expressed in normal tissues. Its presence has been demonstrated in the cow endometrium, and is also expressed in human normal myometrium as well as in leiomyomas [14–16]. Consequently, NTS was reported in functions linked to neoplastic progression, including cellular function related to tumor growth, as well as function enhancing the metastatic process [12, 17–19].

In this study, we hypothesized that the abnormal expression of NTS and NTSR1 in endometrial cancer would enhance the neoplastic progression. At first, we searched for a link between NTSR1 expression and low survival in The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort. A strong correlation was observed between NTSR1 messenger RNA (mRNA) high expression and a poor survival. We then confirmed these results

in a series of 100 cases of endometrial adenocarcinoma, by studying NTSR1 protein level and cellular localization by immunohistochemistry. Finally, we sought to determine the mechanisms inherent in the overexpression of NTSR1, focusing on gene amplification and DNA methylation.

Methods

Analyses of TCGA data

Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort of uterine corpus endometrial carcinoma, initially published in Nature [20], were retrieved using cBioPortal [21, 22], including clinical data, main molecular features, NTSR1 mRNA z scores (RNASeqV2) and NTSR1 copy number alterations, available in 333 cases. The methylation status of the *NTSR1* gene was analyzed in 221 cases, using the Illumina Human Methylation 450 (HM450) assay. A methylated status was defined by a beta-value greater than 0.20.

Population, clinical data, and tissues

One hundred consecutive cases of endometrial adenocarcinoma were retrospectively retrieved from the files of the Department of Pathology (CHRU de Nancy, France), from 1 January 2000 to 30 June 2008 (Table 1). Sixty-six nonmalignant endometrial samples were also retrieved.

In cancers, the histological subtype and grades, according to the criteria of the WHO classification [23], were reviewed by two experienced pathologists.

Main clinical data were retrospectively collected from the Department of Gynecological Surgery (CHRU de Nancy, France) and the Department of Radiotherapy (Institut de Cancérologie de Lorraine, France).

Immunohistochemistry

Five-micrometer paraffin sections were immersed in a 10 mM sodium citrate buffer (pH 6) for 20 min at 97 °C for dewaxing and antigen retrieval. Staining for NTSR1 was evaluated with a primary anti-NTSR1 antibody (1/50; goat polyclonal sc-7596, Santa Cruz, USA). Validation of the antibody was performed on positive control the smooth muscle cells of normal human colon. The labeling was neutralized with a pre-incubation with the antigen, and by omitting the primary antibody [24]. Moreover, the NTSR1 labeling was absent in the lung experimental tumors generated from cells not expressing NTSR1 [12, 17–19]. Both positive internal controls (endothelial cells) and negative controls (without primary antibody) were used throughout the experiment.

Staining for p53, MSH6, and PMS2 was evaluated with the following primary antibodies: p53 (1/60; mouse monoclonal,

Table 1 Clinical and histological characteristics of the patients (*SD* standard deviation)

Clinical data (<i>n</i> = 100)	Mean $\pm$ SD or percent of patients
Age in years	67.58 $\pm$ 11.26
Reproductive period in years	38.07 $\pm$ 4.94
Body mass index (kg/m ²)	29.32 $\pm$ 7.48
Parity	2.00 $\pm$ 1.68
Hypertension	53%
Diabetes mellitus	20%
Breast carcinoma	12%
Menopause hormone therapy	20%
FIGO stage	
Ia	56%
Ib	23%
II	2%
IIIA	4%
IIIB	0%
IIIC	4%
IVa	0%
IVb	11%
Histological type	
Endometrioid adenocarcinoma	89%
Serous adenocarcinoma	6%
Clear cell adenocarcinoma	3%
Mucinous adenocarcinoma	2%
Histological grade	
1	40%
2	40%
3	20%
Histological characteristics	
Myometrial invasion $\geq$ 50%	41%
Neoplastic vascular emboli	19%
Adjuvant therapy	
Brachytherapy	75%
Radiotherapy	23%
Chemotherapy	6%

DO7, Novocastra, Newcastle, UK), MSH6 (ready-to-use; rabbit monoclonal, EP49, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), and PMS2 (ready-to-use; rabbit monoclonal, EP51, Dako Cytomation). A tumor was scored positive for p53 when the nuclear labeling was moderate to strong in more than 80% of tumor cells [25, 26]. MSH6 and PMS2 expression were considered lost when there was a complete absence of nuclear staining of tumor cells in the presence of internal positive controls in normal endometrium, stromal cells, or lymphocytes [27, 28]. Additionally, staining for NTS was evaluated in 18 samples of cancer, 20 samples of hyperplasia, and 10 samples of normal endometrium, using an antibody targeted against the NTS peptide (1/500 overnight; mouse

monoclonal, homemade antibody; controls previously reported [24]). Immunohistochemistry was performed with Dako Autostainer Plus (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) and Flex + Envision revelation system (Dako). Positive and negative controls were used throughout the experiment.

Cytoplasmic staining for NTSR1 was evaluated using a semi-quantitative score. The staining intensity was graded as follows: 1, weak; 2, medium; and 3, strong. A score was obtained by multiplying the percentage of positive cells by the intensity level (range: 0–300). Scoring was performed independently by two observers (G.G. and M.A.), blinded to the conditions and clinical data. A mean value was then calculated.

Additionally, a global staining standardized value for NTSR1 and NTS was obtained using a semi-automatic image analysis method with Adobe Photoshop CS2 9.0 (Adobe Systems Incorporated, USA) and Image J 1.42u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). For each case, acquisition was performed with DP72 Olympus camera at $\times 100$ magnification. Then, labeled areas were selected and copied in new JPEG files, using the Adobe Photoshop Color Range selection tool. After conversion into grayscale pictures and color inversion, integrated density was measured with ImageJ [29].

Statistical analysis

Pearson's chi-square test to compare categorical variables and the Mann-Whitney *U* test (two groups) or the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-analysis (more than two groups) for quantitative variables were used. The Spearman correlation coefficients were calculated to evaluate the correlation with other mRNA *z* scores. A *p* value of 0.05 was accepted as significant. In order to test the reliability of semi-quantitative scoring between the two raters, the intraclass correlation coefficient (ICC) was calculated. Survival functions were performed with univariate and multivariate proportion hazard test Cox model (stepwise), and with the Kaplan-Meier method and Log-rank test. These statistical analyses were conducted using the SAS 9.3 software.

Results

Prognostic value of NTSR1 mRNA in the TCGA database

In the TCGA multicenter UCEC cohort [20, 30], among 333 endometrial adenocarcinoma cases, 271 (81.4%) were endometrioid-type, 52 (15.6%) serous-type, and 10 (3%) mixed-type. Histological grades were as follows: 78 (23.4%) cases of grade 1, 91 (27.3%) grade 2, and 164 (49.3%) grade 3.

NTSR1 mRNA expression was significantly increased in higher grade tumors ($p = 0.0008$). Using the log-rank test (Fig. 1), NTSR1 mRNA level above the 90th percentile was associated with a significantly worse OS (log-rank: $p = 0.0012$) and worse PFS (log-rank: $p = 0.0116$). When including only endometrioid carcinomas, NTSR1 mRNA level continued to be negatively correlated with OS (log-rank: $p < 0.0001$) and PFS (log-rank: $p = 0.002$).

Using the Cox model, a high NTSR1 mRNA z score was significantly associated with a shorter OS and PFS, both in univariate (OS: $p = 0.0005$ and PFS: $p = 0.0382$) and multivariate Cox analyses (OS: $p = 0.0154$; PFS: $p = 0.0048$), and independently from the histological grade. After exclusion of the serous and mixed subgroups, NTSR1 mRNA levels remained negatively correlated with OS (univariate: $p = 0.0001$; multivariate: $p = 0.0019$) and PFS (univariate: $p = 0.0005$; multivariate: $p = 0.37$).

NTSR1 protein expression and localization

The main clinical and the histological characteristics of cases included in our cohort are shown in Table 1. Seventy-two percent of the cases were positively labeled with the NTSR1 antibody in nonmalignant samples (48/66), showing a weak staining in most of positive samples (Fig. 2 a). In simple hyperplasia, NTSR1 was mildly positive with a membranous and cytoplasmic localization (Fig. 2 b).

Ninety percent of the tumor samples were positively labeled with the NTSR1 antibody. In grade 1 and 2 tumors, NTSR1 staining was frequently membranous, in association with a mild-to-moderate cytoplasm staining (Fig. 2c–e). NTSR1 cytoplasmic localization was predominant in higher grade tumors (Fig. 2f). The distribution was heterogeneous, with focal or multifocal overexpression. No significant differences were detected between surface and myometrial invasive components, and were not associated with any pathological features. Myometrial invasive components were positive for NTSR1 in 73% of cases.

For each specimen, cytoplasmic NTSR1 was semi-quantitatively scored, showing a very good inter-observer reproducibility (ICC: 0.8909 [CI95%: 0.8553; 0.9181]).

Immunohistochemistry showed a significant overexpression of NTSR1 in cancer samples, compared to benign tissues (Supplementary Fig. S1), with a global staining (image analysis-based standardized value) nearly 14-fold higher in endometrial adenocarcinoma ($p < 0.001$) (Supplementary Table S1). Cytoplasmic NTSR1 score was significantly increased in endometrial adenocarcinoma vs. benign endometrium ($p < 0.001$), without significant difference between the different benign samples. The global staining standardized value (image analysis) for NTSR1 showed a 6-fold significant increase in grade 3 as compared to grade 1 ($p = 0.01$), associated with a significant increase of cytoplasmic score in grade 3

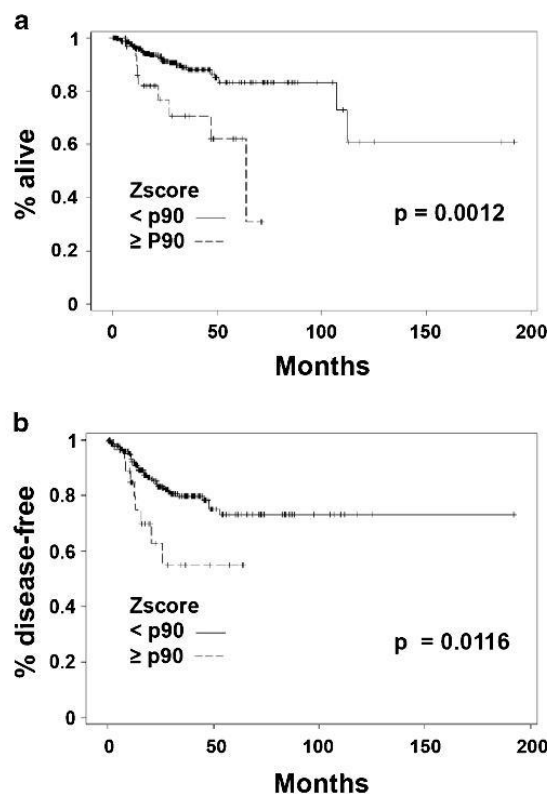


Fig. 1 Survival analyses with NTSR1 mRNA z score. Kaplan-Meier curves with log-rank test. **a** Overall survival (OS). **b** Progression-free survival (PFS) (threshold: 90th percentile)

vs. grade 1 ($p = 0.004$) (Supplementary Fig. S1). When regarding the membranous score, no significant differences between the different tumor grades was found ($p = 0.43$).

We compared the staining of primary tumors with the staining of the metastatic site from the same tumor, in six available cases, from three cases of lymph node metastasis, and three cases of digestive metastasis. Staining in five out of six cases was comparable between primary tumor and the corresponding metastasis (similar score $\pm 10\%$). In one case, NTSR1 expression in the metastatic site was stronger than in the primary tumor (Supplementary Fig. S2).

We also performed immunochemistry for p53, MSH6, and PMS2 (Supplementary Fig. S3). P53 was positive in 12% of cases. A loss of MSH6 and PMS2 expression was found in 7 and 15% of cases, respectively. No correlation was found between p53 status and NTSR1 expression ($p = 0.63$ for cytoplasmic staining; $p = 0.98$ for global staining), or loss of MSH6/PMS2 and NTSR1 expression ($p = 0.45$ and $p = 0.29$ for cytoplasmic staining, respectively; $p = 0.46$ and $p = 0.35$ for global staining, respectively).

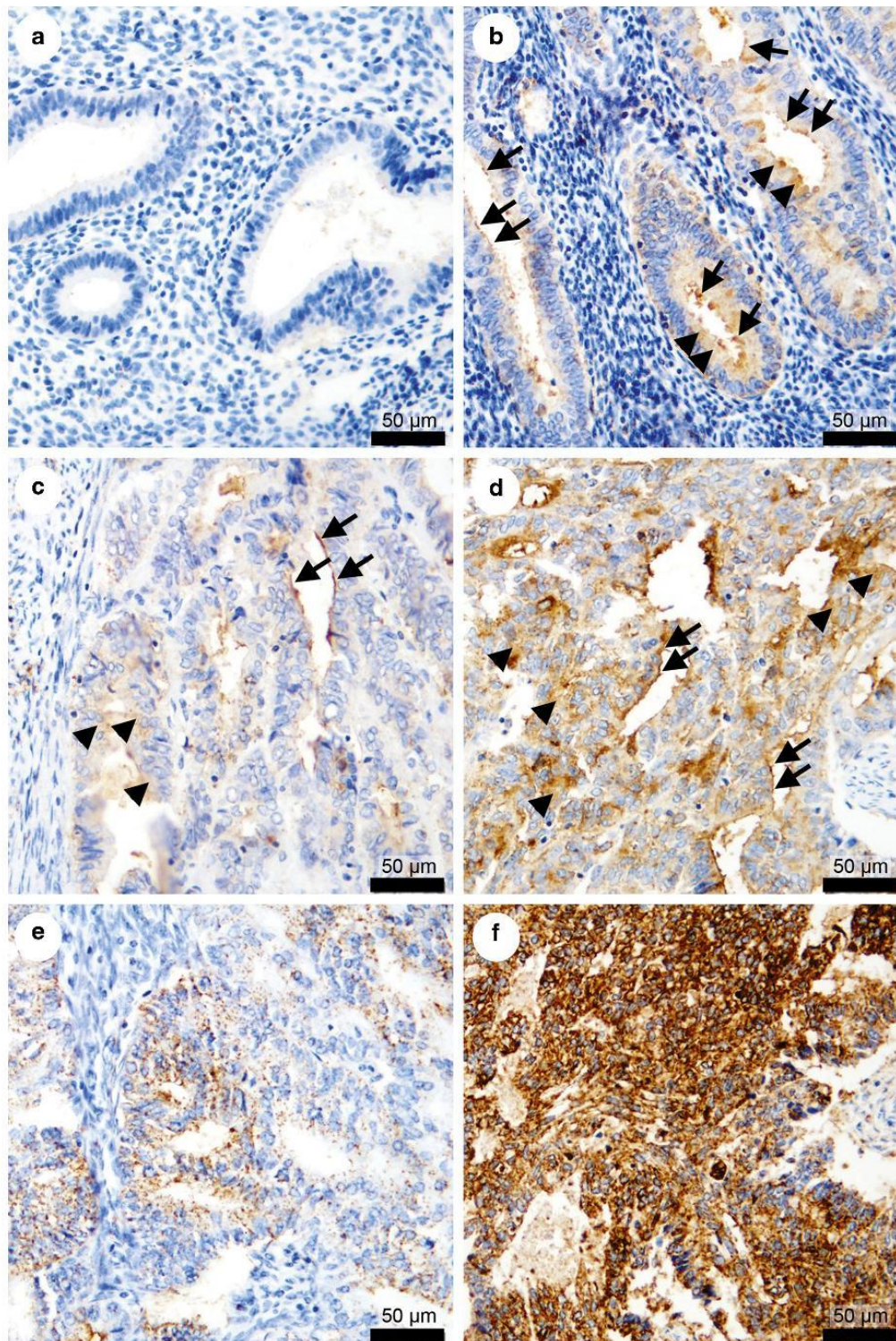


Fig. 2 NTSR1 immunohistochemical staining. **a** Negative staining in normal endometrium during the proliferative phase. **b** Weak positive membranous (arrows) and weak cytoplasm (arrowheads) staining in simple hyperplasia. **c** Weak membranous staining and weak cytoplasm staining in a case of grade 1 endometrioid adenocarcinoma. **d** Moderate membranous and mild-to-moderate cytoplasm staining in a grade 2 adenocarcinoma. **e** Moderate cytoplasmic positive staining in a grade 2 adenocarcinoma. **f** Strong cytoplasmic staining in a grade 3 endometrioid adenocarcinoma (magnification $\times 200$)

Survival analyses

Follow-up and overall 5-year survival data were available for 97 and 77% of the patients, respectively. A higher histological grade was correlated with a worse OS ($p = 0.015$), but not progression-free survival (PFS) ($p = 0.08$) (log-rank test) (Fig. 3).

Using the univariate Cox model, NTSR1 cytoplasmic staining and global staining standardized value were negatively correlated with OS ($p = 0.02$ and $p = 0.009$, respectively). This correlation remained significant when excluding non-endometrioid subtypes ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). In multivariate analysis with stepwise selection, a high NTSR1 expression remained an independent prognostic marker, negatively correlated with OS (cytoplasmic score: $p = 0.004$; global staining standardized value: $p = 0.0035$), and with PFS ($p = 0.03$).

Using the log-rank test (Fig. 3), a cytoplasmic NTSR1 expression score was associated with a significantly worse OS (log-rank: $p < 0.001$; 5-year OS = 40% for a cytoplasmic score ≥ 130 vs. OS = 83% if a score < 130). With the same threshold, NTSR1 overexpression was also correlated with PFS (cytoplasmic score: $p = 0.001$; global staining standardized value: $p = 0.02$).

NTS expression

In all malignant cases, a large amount of cells was positively labeled with the anti-NTS antibody (Supplementary Fig. S4). NTS labeling was cytoplasmic and homogenous. Expression was significantly higher in endometrial adenocarcinoma than in normal endometrium ($p < 0.0001$) and endometrial hyperplasia ($p < 0.0001$).

Mechanisms involved in NTSR1 overexpression

NTSR1 expression was first analyzed in the TCGA database according to the four molecular subgroups as defined by Kandoth et al. [20] ($n = 198$). NTSR1 mRNA level was significantly higher in the subgroup exhibiting general high copy number alterations ($p < 0.0001$). This correlation remained significant when the serous and mixed histological subtypes were excluded ($p = 0.01$). No correlation with MSI

(microsatellite instability), POLE, or low copy number altered molecular subgroups was found (Supplementary Fig. S5).

NTSR1 mRNA upregulation was significantly correlated with a high NTSR1 gene copy number alteration ($p = 0.0005$), showing a higher NTSR1 mRNA z score in cases characterized by a low-level gain (45/324) or a high-level amplification (9/324) as compared in diploid cases (266/324).

Lastly, we analyzed the correlation between NTSR1 promoter DNA methylation and expression level of mRNA NTSR1 (Fig. 4). Data from 15 out of 17 probes covering NTSR1 CpG islands were available in 220 cases (Fig. 4a). Globally, Fig. 4 shows that most unmethylated sites were associated with a higher NTSR1 mRNA z score. In three out of these 15 CpG (CpG 1, CpG 5 and CpG 11), loss of methylation was significantly associated with a higher NTSR1 mRNA level (Supplementary Table S2). Additionally, when focusing on these three CpG islands, we found these CpG islands were significantly unmethylated in high-grade carcinomas, as compared to grade I and II tumors (Fig. 4b).

Discussion

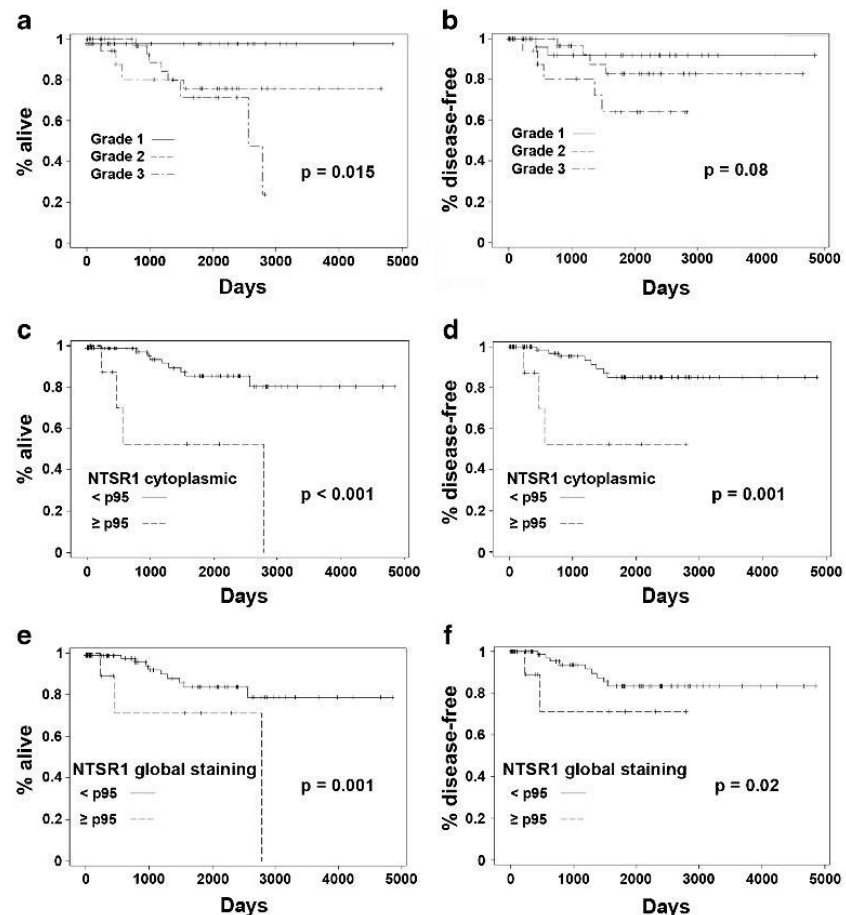
NTS/NTSR1 in endometrium

Pejorative implications of the NTS/NTSR1 complex in tumor progression is supported by the inverse correlation between NTSR1 overexpression and the OS in several clinical series, such as in lung adenocarcinomas and invasive breast carcinomas [12, 31, 32]. We demonstrate, here, that NTSR1 is a marker of poor prognosis in human endometrial carcinoma, and is an independent prognostic factor in multivariate analysis, which supports its role as a contributor in endometrial cancer progression.

NTS and NTSR1 are implicated in several functions linked to the neoplastic progression, including proliferation of pancreas, prostate, colon, lung and breast cancer cells [33], the protection of breast cancer cells against apoptosis [18], and the induction of the pro-invasive potential of colon, breast and lung cancer cells [24, 31, 32]. NTS is upregulated by estradiol and may be a mediator of hormone-dependent tumorigenesis, since NTS and NTSR1 were reported to be upregulated in 20% of estrogen receptor-positive breast cancers [5, 6]. As it is also estrogen dependent, similar mechanisms could occur in endometrial tumorigenesis [34].

Little is known regarding the function of NTS in the genital tract. Early studies had reported the presence of NTS in rat uterus [35, 36]. More recently, the NTSR1 expression in epididymal spermatozoa was demonstrated to be sensitive to NTS in sperm capacitation [37, 38]. NTSR1 and NTS expression has been reported in normal myometrium, and in cases of estrogen-dependent tumors, leiomyoma and leiomyosarcoma [14, 15].

Fig. 3 Survival analyses. Kaplan-Meier curves with log-rank test for overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). **a, b** WHO histological grade. **c, d** NTSR1 immunohistochemical semi-quantitative cytoplasmic score (threshold: 95th percentile; score: 130). **e, f** NTSR1 immunohistochemical global staining (image analysis) (threshold: 95th percentile)



Mechanisms sustaining NTSR1 overexpression

We hypothesize that the contribution of NTSR1 in tumorigenesis occurred from local and sustained activation of the receptor rather than from circulating NTS, because NTS is a highly degradable peptide and its blood concentration rapidly drops after its release. In addition, it was shown that the high concentration of NTS was correlated with a higher risk of breast cancer [39]. Using cytoplasmic NTSR1 scoring, we found that the cytoplasmic accumulation was correlated with tumor progression and worse survival. Similar results were observed in lung cancer [32]. Previous studies in our laboratory also revealed, that under prolonged NTS exposure with saturating concentrations, NTSR1 did not remain at the cell membrane, but, after endocytosis, accumulated in the perinuclear recycling compartment from which it was recycled to the cell surface. This permanent NTSR1 binding recovery

allowed for constant cell sensitization and led to a chronic activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 [40].

We gathered evidence suggesting that NTSR1 overexpression can be consecutive to the loss of *NTSR1* promoter DNA methylation. Similarly, in colorectal tumors, low levels of methylation may contribute to the malignant potential through activation of NTSR1 [41] while NTSR1 methylation is known to be associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. Moreover, in neuroendocrine tumors, DNA methylation contributes to NTSR1/2 expression patterns [42].

Diagnostic and therapeutic perspectives

We propose that NTSR1 IHC could be used as a tool to select patients with the worst prognosis in order to adapt the therapy.

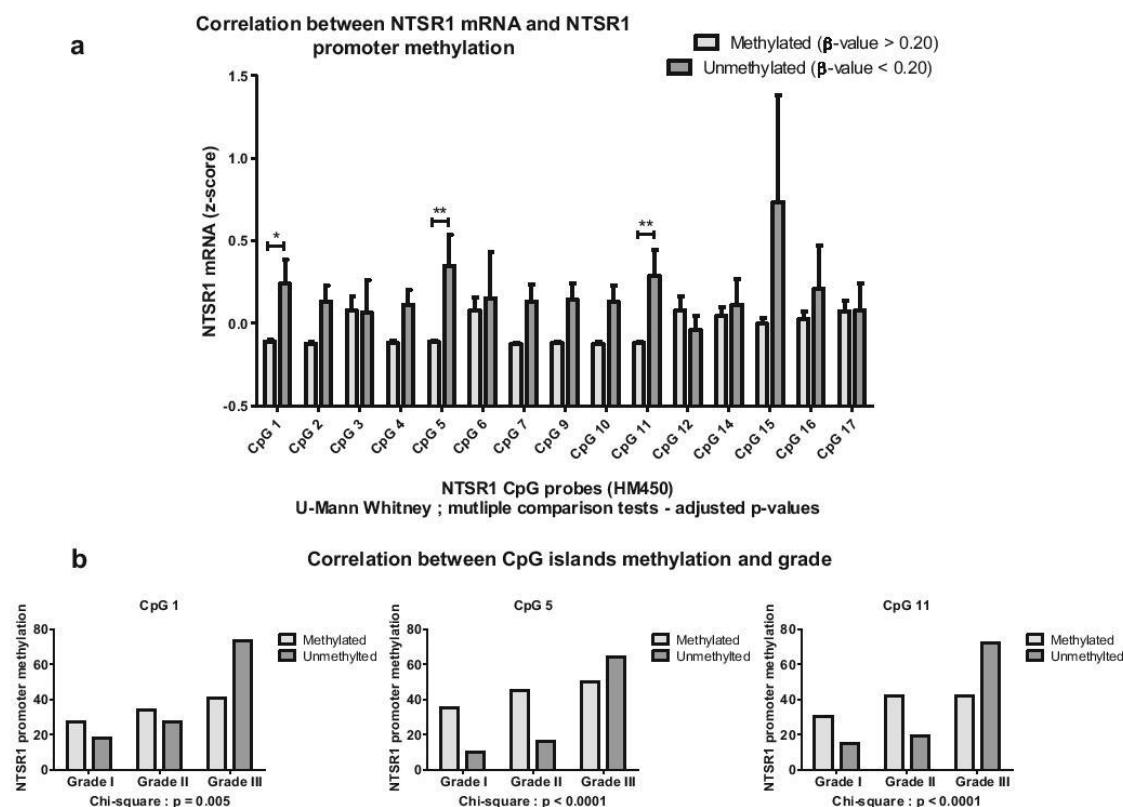


Fig. 4 Analysis of NTSR1 promoter methylation, from the uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC) cohort of TCGA (HM450). **a** Correlation between NTSR1 mRNA z score (RNASeq V2) and NTSR1 promoter methylation (β -value > 0.20); Mann-Whitney *U* test,

Bonferroni correction for multiple comparisons ($*p < 0.05$; $**p < 0.005$). **b** Correlation between NTSR1 CpG 1, 5, and 11 and histological FIGO/WHO grade (chi-square test)

This is a low-cost, easy technique which could be used routinely.

Moreover, NTSR1 targeting has been proposed as a therapeutic tool. For example, DOTA-NT-20.3 is a promising candidate for ^{68}Ga -PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors, and for therapy, with the yttrium-labeled peptide [43]. Recently, we proposed the use of labeled NTS/NTSR1 complexes to enlarge the population eligible for therapy targeting HERs tyrosine kinase inhibitor or HER2 overexpression in breast cancers [31]. The selective NTSR1 antagonist, SR48692, radio-sensitized prostate cancer cells in a dose- and time-dependent manner by increasing apoptotic cell death and decreasing clonogenic survival [44].

Due to the contribution of the neurotensinergic system in cancer progression, we are able to highlight its potential as a therapeutic target [13, 45, 46]. Based on our results, therapeutic strategies targeting the abolition of NSTR1 activation could be eligible as a new alternative in the treatment of endometrial cancer, especially in advanced stage after specific

study of the expression of NTSR1. Further studies are needed to support these proposals.

Conclusions

We provided evidence for NTS/NTSR1 as a potential contributor to endometrial cancer oncogenesis and progression, through an upregulation of cytoplasmic NTSR1. We pointed out the prognostic value of NTSR1, this marker being an independent marker of poor survival. NTSR1 cytoplasmic semi-quantitative score could be easily used to evaluate the prognosis. These findings support the therapeutic potential of NTS/NTSR1 inhibition or drug cellular targeting through NTSR1 in advanced stages of human endometrial cancers.

Acknowledgements The authors thank all the team of the Department of Pathology (CHU de Nancy) for technical support; Dr. Cédric Bauman (ESPRI-BioBase, CHRU de Nancy) for methodological support; and Pr.

Georges Weryha, Dr. Judicaël Hotton, and Dr. Zerui Wu for their advice. The authors wish to express many thanks to Dr. Neil Insdorf for English editing.

Some results are generated by the data extracted from the database of TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>.

Compliance with ethical standards The experiments reported here were carried out according to the Declaration of Helsinki principles and in agreement with the French laws on biomedical research (institutional review board no. DC2008-459; CNIL declaration no. 1209171).

Funding ANR-10-INTB-1503 (Agence Nationale de la Recherche).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest. Patricia FORGEZ declares that she has a patent no. EP15306170.0 pending.

References

- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014) Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64(1):9–29. doi:10.3322/caac.21208
- Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, Kline R, Burger RA, Goodman A, Burks RT (2004) Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 22(11):2159–2166. doi:10.1200/JCO.2004.07.184
- Thigpen JT, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, DuBoshter B, Burger RA, Liao S (2004) Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 22(19):3902–3908. doi:10.1200/JCO.2004.02.088
- van Wijk FH, Aapro MS, Bolis G, Chevallier B, van der Burg ME, Poveda A, de Oliveira CF, Tumolo S, Scotto di Palumbo V, Piccart M, Franchi M, Zanaboni F, Lacave AJ, Fontanelli R, Favalli G, Zola P, Guastalla JP, Rosso R, Marth C, Nooij M, Presti M, Scarabelli C, Splinter TA, Ploch E, Beex LV, ten Bokkel HW, Forni M, Melpignano M, Blake P, Kerbrat P, Mendiola C, Cervantes A, Goupil A, Harper PG, Madronal C, Namer M, Scarfone G, Stoot JE, Teodorovic I, Coens C, Vergote I, Vermorken JB (2003) Doxorubicin versus doxorubicin and cisplatin in endometrial carcinoma: definitive results of a randomised study (55872) by the EORTC Gynaecological Cancer Group. *Ann Oncol* 14(3):441–448
- Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souza F, Plu-Bureau G, Chaouat M, Lavour A, Hugot D, Gespach C, Gompel A, Forgez P (2009) The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One* 4(1):e4223. doi:10.1371/journal.pone.0004223
- Souza F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P (2006) Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 66(12):6243–6249. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0450
- Reinecke M (1985) Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem* 16(1):1–172
- Andersson S, Rosell S, Hjelmquist U, Chang D, Folkers K (1977) Inhibition of gastric and intestinal motor activity in dogs by (Gln4) neurotensin. *Acta Physiol Scand* 100(2):231–235. doi:10.1111/j.1748-1716.1977.tb05941.x
- Armstrong MJ, Parker MC, Ferris CF, Leeman SE (1986) Neurotensin stimulates [3H]oleic acid translocation across rat small intestine. *Am J Phys* 251(6 Pt 1):G823–G829
- Baca I, Feurle GE, Schwab A, Mittmann U, Knauf W, Lehnert T (1982) Effect of neurotensin on exocrine pancreatic secretion in dogs. *Digestion* 23(3):174–183
- Mazella J (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13(1):1–6
- Alifano M, Souza F, Dupouy S, Camilleri-Broet S, Younes M, Ahmed-Zaid SM, Takahashi T, Cancellieri A, Damiani S, Boaron M, Broet P, Miller LD, Gespach C, Regnard JF, Forgez P (2010) Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16(17):4401–4410. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0659
- Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P (2011) The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 93(9):1369–1378. doi:10.1016/j.biochi.2011.04.024
- Rodriguez Y, Almeida TA, Valladares F, Baez D, Montes de Oca F, Garcia C, Dorta I, Hernandez M, Reyes R, Bello AR (2010) Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biol Reprod* 83(4):641–647. doi:10.1095/biolreprod.110.084962
- Rodriguez Y, Baez D, de Oca FM, Garcia C, Dorta I, Reyes R, Valladares F, Almeida TA, Bello AR (2011) Comparative analysis of the ERalpha/ERbeta ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. *Int J Gynecol Pathol* 30(4):354–363. doi:10.1097/PGP.0b013e31820918cb
- Sakamoto R, Hayashi KG, Saito S, Kanahara H, Kizaki K, Iga K (2015) Comparison of the global gene expression profiles in the bovine endometrium between summer and autumn. *J Reprod Dev* 61(4):297–303. doi:10.1262/jrd.2015-024
- Elek J, Pinzon W, Park KH, Narayanan R (2000) Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Res* 20(1A):53–58
- Somai S, Gompel A, Rostene W, Forgez P (2002) Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295(2):482–488
- Wang L, Friess H, Zhu Z, Graber H, Zimmermann A, Korc M, Reubi JC, Buchler MW (2000) Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease. *Clin Cancer Res* 6(2):566–571
- Kandath C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497(7447):67–73. doi:10.1038/nature12113
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6(269):pl1. doi:10.1126/scisignal.2004088
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2(5):401–404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH (2014) World Health Organisation Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, WHO Classification of tumours, vol 6. IARC Press, Lyon

24. Souza F, Viardot-Foucault V, Rouillet N, Toy-Miou-Leong M, Gompel A, Bruyneel E, Comperat E, Faux MC, Mareel M, Rostene W, Flejou JF, Gespach C, Forgez P (2006) Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 27(4): 708–716. doi:10.1093/carcin/bgi269
25. Alvarez T, Miller E, Duska L, Oliva E (2012) Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma? *Am J Surg Pathol* 36(5):753–761. doi:10.1097/PAS.0b013e318247b7bb
26. Alkushi A, Lim P, Coldman A, Huntsman D, Miller D, Gilks CB (2004) Interpretation of p53 immunoreactivity in endometrial carcinoma: establishing a clinically relevant cut-off level. *Int J Gynecol Pathol* 23(2):129–137
27. Orbo A, Nilsen MN, Arnes MS, Pettersen I, Larsen K (2003) Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol* 22(2):141–148
28. Djordjevic B, Barkoh BA, Luthra R, Broaddus RR (2013) Relationship between PTEN, DNA mismatch repair, and tumor histotype in endometrial carcinoma: retained positive expression of PTEN preferentially identifies sporadic non-endometrioid carcinomas. *Mod Pathol* 26(10):1401–1412. doi:10.1038/modpathol.2013.67
29. Gauchotte G, Hergalant S, Vigouroux C, Casse JM, Houlgatte R, Kaoma T, Helle D, Brochin L, Rech F, Peyre M, Labrousse F, Vallar L, Gueant JL, Vignaud JM, Battaglia-Hsu SF (2017) Cytoplasmic overexpression of RNA-binding protein HuR is a marker of poor prognosis in meningioma, and HuR knockdown decreases meningioma cell growth and resistance to hypoxia. *J Pathol*. doi:10.1002/path.4916
30. Sun H, Yan L, Tu R, Zhang Y, Ma L, Tang W, Li L, Chen W, Zhan C, Zang R (2016) Expression profiles of endometrial carcinoma by integrative analysis of TCGA data. *Gynecol Obstet Investig*. doi:10.1159/000445073
31. Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O, Llorca FP, Cayre A, Kouchkar A, Gompel A, Forgez P (2014) Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* 5(18):8235–8251
32. Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, Flejou JF, Tredaniel J, Regnard JF, Damotte D, Alifano M, Forgez P (2014) Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 5(18):8252–8269
33. Evers BM (2006) Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides* 27(10):2424–2433. doi:10.1016/j.peptides.2006.01.028
34. Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenshein NB, Lewis JL Jr, Knapp RC, Stolley PD, Schottenfeld D (1985) Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. *N Engl J Med* 313(16):969–972. doi:10.1056/NEJM198510173131601
35. Mistry A, Vijayan E (1985) Neurotensin enhances estradiol induced DNA synthesis in immature rat uterus. *Life Sci* 36(21):2063–2067
36. Pettibone DJ, Totaro JA (1987) High affinity binding of [3H]neurotensin of rat uterus. *Peptides* 8(6):1169–1172
37. Umezaki K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, Tanemura K (2016) Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev*. doi:10.1262/jrd.2016-055
38. Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K (2014) Neurotensin enhances sperm capacitation and acrosome reaction in mice. *Biol Reprod* 91(2):53. doi:10.1095/biolreprod.113.112789
39. Melander O, Maisel AS, Almgren P, Manjer J, Belting M, Hedblad B, Engstrom G, Kilger U, Nilsson P, Bergmann A, Orho-Melander M (2012) Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA* 308(14): 1469–1475. doi:10.1001/jama.2012.12998
40. Toy-Miou-Leong M, Cortes CL, Beaudet A, Rostene W, Forgez P (2004) Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 279(13):12636–12646. doi:10.1074/jbc.M303384200
41. Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H (2015) Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget* 6(30):29975–29990. doi:10.18632/oncotarget.5034
42. Kim JT, Li J, Song J, Lee EY, Weiss HL, Townsend CM Jr, Evers BM (2015) Differential expression and tumorigenic function of neurotensin receptor 1 in neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget* 6(29):26960–26970. doi:10.18632/oncotarget.4745
43. Alshoukr F, Prignon A, Brans L, Jallane A, Mendes S, Talbot JN, Tourwe D, Barbet J, Gruaz-Guyon A (2011) Novel DOTA-neurotensin analogues for 111In scintigraphy and 68Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjug Chem* 22(7):1374–1385. doi:10.1021/bc200078p
44. Valerie NC, Casarez EV, Dasilva JO, Dunlap-Brown ME, Parsons SJ, Amorino GP, Dziegielewska J (2011) Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. *Cancer Res* 71(21):6817–6826. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1646
45. Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, Hindie E (2014) Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: perspectives with bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y receptors. *J Nucl Med* 55(10):1650–1657. doi:10.2967/jnumed.114.142000
46. Wu Z, Martinez-Fong D, Tredaniel J, Forgez P (2012) Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:184. doi:10.3389/fendo.2012.00184

B. Manuscrit 2

"Neurotensin receptor 1 antagonist SR48692 improves response to carboplatin by enhancing apoptosis and inhibiting drug efflux in ovarian cancer."

Liu J, **Agopiantz M**, Poupon J, Wu Z, Just PA, Borghese B, Ségal-Bendirdjian E, Gauchotte G, Gompel A, Forgez P.



Neurotensin Receptor 1 Antagonist SR48692 Improves Response to Carboplatin by Enhancing Apoptosis and Inhibiting Drug Efflux in Ovarian Cancer

Jin Liu¹, Mikaël Agopiantz^{2,3}, Joël Poupon⁴, Zherui Wu¹, Pierre-Alexandre Just⁵, Bruno Borghese⁶, Evelyne Ségal-Bendirdjian¹, Guillaume Gauchotte^{3,7}, Anne Gompel^{1,8}, and Patricia Forgez¹

Abstract

Purpose: The high affinity receptor 1 (NTSR1) and its agonist, neurotensin (NTS), are correlated with tumor cell aggressiveness in most solid tumors. As chemoresistance and tumor aggressiveness are often related, we decided to study the role of the NTSR1 complex within platinum-based chemotherapy responses. In an ovarian model, we studied carboplatin because it is the main standard of care for ovarian cancer.

Experimental Design: Experimental tumors and *in vitro* studies were performed using SKOV3 and A2780 cells treated with carboplatin, with or without a very specific NTSR1 antagonist, SR48692. We measured the effects of these treatments on cell apoptosis and apoptosis-related proteins, platinum accumulation in the cell and nucleus, and the expression and localization of platinum transporters. NTS and NTSR1 labeling was measured in patients with ovarian cancer.

Results: SR48692 enhanced the response to carboplatin in ovarian cancer cells and experimental tumors. When SR48692 is combined with carboplatin, we noted a major improvement of platinum-induced DNA damage and cell death, as well as a decrease in tumor growth. The relationship of these results to clinical studies was made by the detection of NTS and NTSR1 in 72% and 74% of ovarian cancer, respectively. Furthermore, in a large series of high-grade ovarian cancer, NTSR1 mRNA was shown to correlate with higher stages and platinum resistance.

Conclusions: This study strongly suggests that the addition of NTSR1 inhibitor in combination with platinum salt-based therapy will improve the response to the drug. *Clin Cancer Res*; 23(21); 1–13. ©2017 AACR.

Introduction

Ovarian cancer is the seventh most common cancer in the world and the eighth most frequent cause of cancer-related death among women (1). In the United States, 22,280 new cases and 14,270 deaths were estimated for 2016. This represents about 2.4% of all cancer-related deaths. Because this disease has no

obvious specific symptoms, the majority of females with ovarian cancer are diagnosed at advanced stages, and the 5-year survival rate is 46.2% (2). Consequently, ovarian cancer is one of the most lethal gynecologic malignancies in women.

The standard treatment for advanced ovarian cancer patients is primarily debulking surgery and platinum-based chemotherapy combined with taxane (3, 4). The combination of carboplatin plus paclitaxel results in a complete response rate in 40% to 60% of the cases. However, more than 90% of these patients relapse after 2 years, and patients with recurrence become incurable due to the development of chemoresistance (5). Ovarian cancer remains a real clinical challenge, and despite the development of new therapeutic strategies, there is an urgent need to optimize the current treatment. To this regard, we suggest the use of neurotensin blockade to improve the sensitivity to platinum-based chemotherapy.

Neurotensin (NTS) is a 13-amino acid peptide acting as a neurotransmitter in the central nervous system and local hormone in gastrointestinal tract (6). NTS activates three subtypes of receptors. NTSR1 and NTSR2 belong to G-protein-coupled receptor family (7). NTSR3 (gp95/sortilin) is a sorting protein member of the family of Vps10p-domain receptor family (8). The complex of Neurotensin (NTS) and its high affinity receptor 1 (NTSR1) was shown to contribute to cancer progression (9). NTSR1 was found overexpressed in several types of solid cancers (10), in association

¹INSERM UMRS 1007, Paris Descartes University, Paris, France. ²Department of Medical Gynecology, CHRU Nancy, University of Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France. ³INSERM U 954, Faculty of Medicine, University of Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France. ⁴Toxicology Laboratory, Lariboisière Hospital, AP-HP, Paris, France. ⁵Department of Pathology, Paris Descartes University, AP-HP, HUPC, Paris, France. ⁶Department of Gynecology Obstetrics II and Reproductive Medicine, Paris Descartes University, AP-HP, Paris, France. ⁷Department of Pathology, CHRU Nancy, University of Lorraine, France. ⁸Department of Gynecological Endocrinology, Paris Descartes University, APHP, HUPC, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Patricia Forgez, INSERM UMR-S 1007, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, Paris 75270, France. Phone: 331-428-622; 33 142 862 227; E-mail: patricia.forgez@inserm.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0861

©2017 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Platinum salt-based therapy is used to treat almost 50% of cancer patients. It is proposed as an adjuvant, first-line, or in palliative therapy. Unfortunately, many patients relapse because of intrinsic, acquired resistance, or a weak sensitivity to the treatment. New therapeutic strategies to optimize the current treatment will add a real benefit to patient therapy. Neurotensin receptor 1 (NTSR1) is overexpressed in a large number of solid cancers, and contributes to tumor aggressiveness. We report that blocking NTS/NTSR1 complex improves the effect of carboplatin in ovarian cancer by enhancing the drug-to-target ratio (platinum binding to DNA), and consequently the toxic effect of the drug. A combined platinum salt-based therapy with NTS/NTSR1 inhibitor would be a suitable alternative to the current standard of care without adding toxicity to the treatment.

with the dysregulation of the β -catenin pathway or epigenetic regulation (11–13). Moreover, the presence of NTS/NTSR1 complex enhanced the tumor growth and metastasis process in many solid cancers (7, 14–19). Our group demonstrated that this cell aggressiveness was due to the establishment of the EGFR autocrine activation, occurring under the sustained stimulation of NTSR1 (7, 12, 14).

Independently of the contribution of NTS/NTSR1 complex to cancer progression, it was recently shown that NTS plasma concentration is increased in rats treated with cisplatin and oxaliplatin for several weeks, causing specific damage of the sciatic nerve, and producing variable effects in motor and behavioral tests (20). We hypothesized that NTS/NTSR1 complex may contribute to chemotherapy resistance and that the blockage of NTS/NTSR1 may improve the response to platinum salt-based chemotherapy.

Until now, the most studied approach to antagonize NTSR1 activation is the use of the nonpeptidic component medinertant (SR48692; ref. 21). This drug was developed to counteract the action of NTS on neurotransmitters in the brain (22). Medinertant exhibits a nanomolar affinity for different tissues and cells from various species (21). This compound crosses the blood-brain barrier. It was reported to reverse most intracellular mediator signals linked to NTSR1 activation, such as intracellular Ca^{2+} mobilization, inositol monophosphate, cyclic GMP, and cyclic AMP activation (23). This component showed agonist effects on NTSR2, which may explain its partial or nonresponse on particular central nervous system effect induced by NTS as hypothermia or analgesia (24, 25). Medinertant was also tested on nonselected patients with lung cancer, after a first line of chemotherapy using cisplatin combined with etoposide, but failed to demonstrate an increase in overall survival (NCT00290953). Globally, medinertant is very efficient and specifically counteracts the physiologic action of NTS mediated by NTSR1, but lacks performance in pathologic situations as cancer where the NTS autocrine loop is very strong.

In this article, we showed that SR48692 enhanced the response to carboplatin in ovarian cancer cells expressing both NTS and NTSR1. SR48692 improved the effect of carboplatin by increasing the drug efficiency and reducing the survival action of NTS. We also showed the absence of NTS and NTSR1 expression in tissues

from normal ovary samples, whereas these makers are present in approximately 70% of ovarian cancer.

Materials and Methods

Cell culture

Ovarian adenocarcinoma cells SKOV3 was purchased from ATCC and A2780 was purchased from European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (Gibco) and 2 mmol/L glutamine. SKOV3 was used at passages between 38 and 48 and A2780 was used at passages between 25 and 35. The corresponding NTSR1-overexpressing clone A2780-R1 was cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mmol/L glutamine, and 0.5 mg/mL G418. All cells used in our research were mycoplasma-free as confirmed by the EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries).

Transfection procedure

A2780 cells were transfected with NTSR1 expressing pcDNA3 vectors using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Selection was performed with 1 mg/mL of G418 (Invitrogen). Stable transfectants were screened for NTS and NTSR1 expression by RT-PCR and immunofluorescence.

Cell viability assay

Tumor cell growth was evaluated by PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen). Cell suspension (100 μL) containing 8,000 cells were seeded in 96-well plates, and the cells were treated accordingly. After 72 hours, 10- μL Presto blue was added to each well and the cells were incubated for 2 hours at 37°C. The fluorescence was measured by a multimode plate reader (EnSpire, PerkinElmer).

Tumor xenografts

A2780 cells (2.5×10^6) were suspended in PBS and Matrigel (50%) (BD Biosciences) then inoculated in the right flank of nude mice (NMRI-Nude Foxn1). All the procedures were in accordance with the Guide of the Care and Use of laboratory Animals. Institutional Review Board approval was obtained by Le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Charles Darwin # B751201. Fourteen days after injection, four groups of six to seven mice were randomized as follows: $116 \pm 10 \text{ mm}^3$ for control group, $120 \pm 11 \text{ mm}^3$ for SR48692 group, $113 \pm 10 \text{ mm}^3$ for carboplatin group, and $110 \pm 7 \text{ mm}^3$ for carboplatin and SR48692 group. SR48692 was first dissolved in DMSO at the concentration of 10^{-2} mol/L . To avoid DMSO toxicity, SR48692 was further diluted in water (around 20 $\times$), strongly vortexed to form an emulsion. Mice were force-fed every day with this emulsion at the final dose of 1 mg/kg SR48692. In addition, at day 1, 3, 5, and 7, mice in the group carboplatin and carboplatin plus SR48692 were treated with carboplatin (4 mg/kg, i.p.), and the others were injected with PBS. Mice were also treated with a monoclonal NTS antibody at the dose of 10 mg/kg every 2 days. For details, see patent application to EPO under EP14305825.3.

RNA extraction, RT-PCR, and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform acid method modified by Souza and colleagues (26). For details, see primer sequence and quantitative RT-PCR in Supplementary Data.

Annexin V-FITC/PI dual staining analysis

SKOV3 and A2780-R1 cells were plated in 100-mm dishes in complete medium. After 24 hours, cells were treated with 5 μ M SR48692, 150 μ M carboplatin, or both for 72 hours for SKOV3 or 48 hours for A2780-R1. Cells were dissociated using Accutase solution (Sigma), washed with ice-cold PBS, resuspended in 100- μ L incubation reagent (20 μ L Annexin V-FITC and 20 μ L PI diluted in 1-mL incubation buffer, Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche), and then incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. Samples were then analyzed by BD FACSCanto II (Becton Dickinson).

Hoechst 33258 staining assay

Cells were seeded on glass slides (12-mm diameter) in 24-well plate at the density of 3×10^4 cells/well in 500- μ L medium and incubated 37°C with 5% CO₂ overnight. Cells were treated for 48 hours then washed with PBS for three times and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. Cells were stained with Hoechst 33258 solution in the dark for 10 minutes at room temperature and imaged by a fluorescence microscope.

Caspase activity protease assay

Caspase activity was detected using ApoTarget Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit (KHZ1001, Invitrogen) and was performed according to the manufacturer's procedure (for details, see Supplementary Data).

Measurement of platinum uptake in whole cell and accumulation in DNA

Platinum accumulation in whole cell and DNA was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis. At each data point, cells were trypsinized, lysed in 1% Triton X-100, 0.1% SDS (w/v) buffer for 15 minutes on ice, and then incubated in 52.5% (v/v) nitric acid at 65°C for 2 hours. Finally, the acid concentration was reduced to 5% for storage. For DNA platinum accumulation, cells were digested overnight at room temperature in lysing buffer [50 mmol/L Tris-HCl pH = 8, 10 mmol/L EDTA, SDS 0.6% (w/v), 50 μ g/mL RNase A, 400 mmol/L NaCl, 166 μ g/mL proteinase K]. After digestion, the samples were homogenized in 1 mol/L NaCl by shaking. Samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes at 4°C, and volumes of ethanol were added to the supernatants. The DNA was retrieved by winding the DNA around a glass pipette and then washed in 70% ethanol, air dried, and then resuspended in water. The results were normalized by the protein levels or DNA amounts.

Immunofluorescence

Immunocytochemistry was performed according to the procedure previously described (7) and detailed in Supplementary Data.

SDS-PAGE and Western blotting analysis

Western blots were processed as described previously (7). Western blots were revealed with antibodies directed against anti-ATP7A (1:500), anti-ATP7B (1:500), anti-MRP2 (1:500), anti-BCL-2 (1:500), anti-BCL-xL (1:500), anti-BAK (1:1,000), and HRP-conjugated anti-actin purchased from Santa Cruz Biotech-

nology, and anti-active caspase-3 (1:1,000) from BD Pharmingen. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C according to the manufacturer's instructions. Secondary anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology), anti-goat (Santa Cruz Biotechnology), or anti-mouse (Sigma) antibodies conjugated to HRP were used at 1:2,000 dilutions for 1 hour at room temperature and visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate, Thermo Scientific).

Analysis of patient data

The mRNA expression was analyzed by (Agilent, Affymetrix HuEx, Affymetrix U133A. Ovarian serous cystadenocarcinoma TCGA dataset (<http://cancergenome.nih.gov/>) was obtained via cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>; refs. 27, 28). Clinical data, main molecular features, NTSR1 and NTS mRNA z-scores (RNASeqV2), were available for 491 cases (29).

Population, clinical data, and tissues

Forty-six consecutive cases of ovarian tumor tissues with the main clinical data were retrospectively retrieved from the files of the Department of Pathology (CHU Cochin Port-Royal, AP-HP, Paris, France). Clinical and histologic characteristics of the patients are detailed in Supplementary Table S1. Ten nonmalignant ovarian samples were also retrieved (CHRU of Nancy, Nancy, France). The histologic subtype, the grade according to the criteria of the WHO classification, neoplastic emboli, local, and nodal invasion, were reviewed by two experienced pathologists (G. Gauchotte and P.-A. Just).

IHC

For all cases, histologic slides of primary tumors were obtained by paraffin wax-embedded tissues. Deparaffinized tissue sections (5 μ m) were subjected to heat-induced epitope retrieval in citrate buffer (pH 6.0). The sections were labeled for the target proteins using the avidin-biotin-peroxidase complex method as described in ref. 30 (for details, see Supplementary Data). Cytoplasmic staining for NTSR1 and NTS were evaluated using a semiquantitative score. The staining intensity was graded as following: 1, weak; 2, medium; and 3, strong. A score was obtained by multiplying the percentage of positive cells by the intensity level (range, 0–300). Samples with score <50 were considered as negative or weak, and samples $\geq$ 50 moderate or strong.

Ethics

Informed consent was obtained from all patients before surgery. The database including pathologic variables was established in accordance with the French data protection authority.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Statistical analysis was carried out using *t* test or Bonferroni multiple comparisons test (****, *P* < 0.0001; ***, *P* < 0.001; **, *P* < 0.01; and *, *P* < 0.05). A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

The comparison of NTS and NTSR1 mRNA z-scores or IHC semiquantitative score between clinicopathologic groups were performed using the Mann-Whitney *U* test (two groups) or Kruskal-Wallis test with Dunn postanalysis (more than two groups). A *P* value of 0.05 was accepted as significant.

Results

NTSR1 antagonist enhances response to carboplatin treatment of the ovarian cancer experimental tumors

Expression of NTS and NTSR1 was evaluated by RT-PCR in two ovarian adenocarcinoma cell lines, SKOV3 and A2780. A strong expression of NTS was observed in A2780 cells, whereas a more moderate expression was detected for SKOV3 cells. A very weak expression of NTSR2 was detected in both SKOV3 and A2780 cell lines. In contrast, NTSR1 mRNA was only detected in SKOV3 cells (Fig. 1A). Tumors initiated with SKOV3 cells grow very slowly (31). For this reason, we chose to generate experimental tumors from A2780 cells, which exhibit palpable tumors within 10–14 days after cell injection.

As shown in Fig. 1B, the tumor growth rate of the control group was very high, and therefore the experiment was terminated after 15 days. In the carboplatin-treated group, the tumors were slightly responsive at the beginning of the treatment, but reached the same tumor volume as the control group at the end of the experiment. SR48692 treatment did not significantly affect the tumor growth, but when carboplatin was used in combination with SR48692, the tumor growth rate was significantly decreased. We confirmed that a decrease of NTSR1 activation improved the response to platinum salt therapy by using a mAb directed against NTS. Using the combination of cisplatin with NTS antibody, the tumor size is smaller than in the treatment cisplatin or NTS mAb alone (Fig. 1C).

Surprisingly, using the combination of carboplatin and SR48692, we observed a strong diminution in the size of the tumors generating the xenograft of A2780 cells, which do not express NTSR1 when cultured on plastic (Fig. 1A). However, when we analyzed the NTS and NTSR1 mRNA expression levels in the tumors, we observed an unexpected significant sixfold increase of NTSR1 mRNA levels as compared with those in cultured cells (Fig. 1D). In contrast, the levels of NTS mRNA remained similar between the tumor and cell cultured conditions (Fig. 1E). A more thorough analysis of mRNA levels from tumors in treated animals revealed that the NTS mRNA levels from tumors with carboplatin treatment were almost 10-fold higher than those from control mice (Fig. 1F). This result was confirmed at the protein level, as the labeling intensity for long fragment NTS was much stronger in tumors from mice treated with carboplatin (Fig. 1H). The labeling of NTS mature peptide is more diffuse but also more intense than in the control conditions. The combined treatment with carboplatin and SR48692 abolished this increase both at the RNA and protein levels (Fig. 1F and H). Finally, Ki67 labeling was less frequent and weaker in tumors treated with the combination as compared with control or carboplatin treatment alone.

NTSR1 antagonist improves the carboplatin response by inhibiting cell growth and survival

To elucidate the mechanisms of the enhanced effect of SR48692/carboplatin combination, *in vitro* studies were performed on either SKOV3 or A2780 cells ectopically expressing NTSR1. Indeed, as cultured A2780 cells do not express NTSR1, we established stable cell lines expressing NTSR1 and chose a clone with NTSR1 expression levels similar to SKOV3 cells, the A2780-R1 cells. The NTSR1 expression in A2780-R1 was confirmed by RT-PCR (Fig. 1A) and immunofluorescence (Supplementary Fig. S1A).

In SKOV3 cells, carboplatin inhibited cell growth in a dose-dependent manner, as measured with the Presto blue assay (Fig. 2A). The addition of SR48692 to carboplatin enhanced this effect, as the IC_{50} for carboplatin alone was $127.50 \pm 13.75 \mu\text{mol/L}$ while the IC_{50} for the combination of carboplatin and SR48692 was $70.19 \pm 6.12 \mu\text{mol/L}$ (Fig. 2B). We also performed cell viability assay on the A2780 wild-type cells and its corresponding NTSR1-overexpressing cells, A2780-R1. The wild-type cells showed a higher sensitivity to carboplatin than A2780-R1 cells, IC_{50} were $122.20 \pm 13.23 \mu\text{mol/L}$ and $338.20 \pm 61.61 \mu\text{mol/L}$, respectively. SR48692 enhanced the response to carboplatin only in A2780-R1 cells to reach the IC_{50} value of $136.00 \pm 30.60 \mu\text{mol/L}$. In contrast, the sensitivity of A2780 wild-type cells to carboplatin was not increased significantly in the presence of SR48692 (Supplementary Fig. S1B).

Apoptotic cells were detected by Annexin V/PI dual labeling assay in the flow cytometry performed on SKOV3 and A2780-R1 cells. A higher number of cells were detected in Annexin V-positive quadrants (right up and bottom) when cells were treated with $5 \mu\text{mol/L}$ SR48692 and $150 \mu\text{mol/L}$ carboplatin (dose corresponding approximately to the IC_{50} as determined above), as compared with the carboplatin treatment alone (Fig. 2C). The number of apoptotic cells was increased by twofold for the SKOV3 cells, and fourfold for the A2780-R1 cells when the combined treatment of carboplatin plus SR48692 treatment was compared with carboplatin alone treatment (Fig. 2D and E).

This finding was confirmed by examining nuclear morphologic changes in SKOV3 cells using Hoechst 33258 staining. Cells were scored as apoptotic if their nuclei presented chromatin condensation and nuclear beading or fragmentation. In cells treated with carboplatin for 48 hours, only several cells showed apoptosis-like changes. While cells treated with the combination of carboplatin and SR48692, more cells displayed morphologic changes as indicated by arrows (Fig. 2F). The apoptotic cells were counted and the apoptotic ratio was calculated in comparison with the total number of cells in each field. The percentage of apoptotic cells increased from $1.56\% \pm 0.10\%$ for carboplatin-treated cells to $4.15\% \pm 0.25\%$ for the combination treatment (Fig. 2G).

NTSR1 antagonist enhances carboplatin-induced cell death through caspase activation and modulation of Bcl-2 protein family expression

Carboplatin exerts its cytotoxicity via the formation of DNA lesions, which ultimately results in cell-cycle arrest and the induction of cell death through the apoptotic pathway. To elucidate the role of caspases in carboplatin-induced apoptosis in SKOV3 cells, we first examined the activation of executioner caspase-3 by Western blot analysis. As shown in Fig. 3A, when cells were treated with carboplatin, both the proenzyme of caspase-3 (32 kDa) and two active caspase-3 subunits (20 and 17 kDa) were detected after 48 hours (lane 3) of treatment. Furthermore, caspase-3 activation was more pronounced at 48-hour treatment (lane 4) when cells were treated with the combined treatment. Stimulation of the other members of the caspase family was measured by a caspase colorimetric protease assay kit. As shown in the Fig. 3B, all five caspases (2, 3, 6, 8, and 9) were activated by carboplatin, and in the presence of SR48692, the activation of these caspases was even significantly enhanced. We note that both initiator and effector caspases are overstimulated in the combined treatment. This

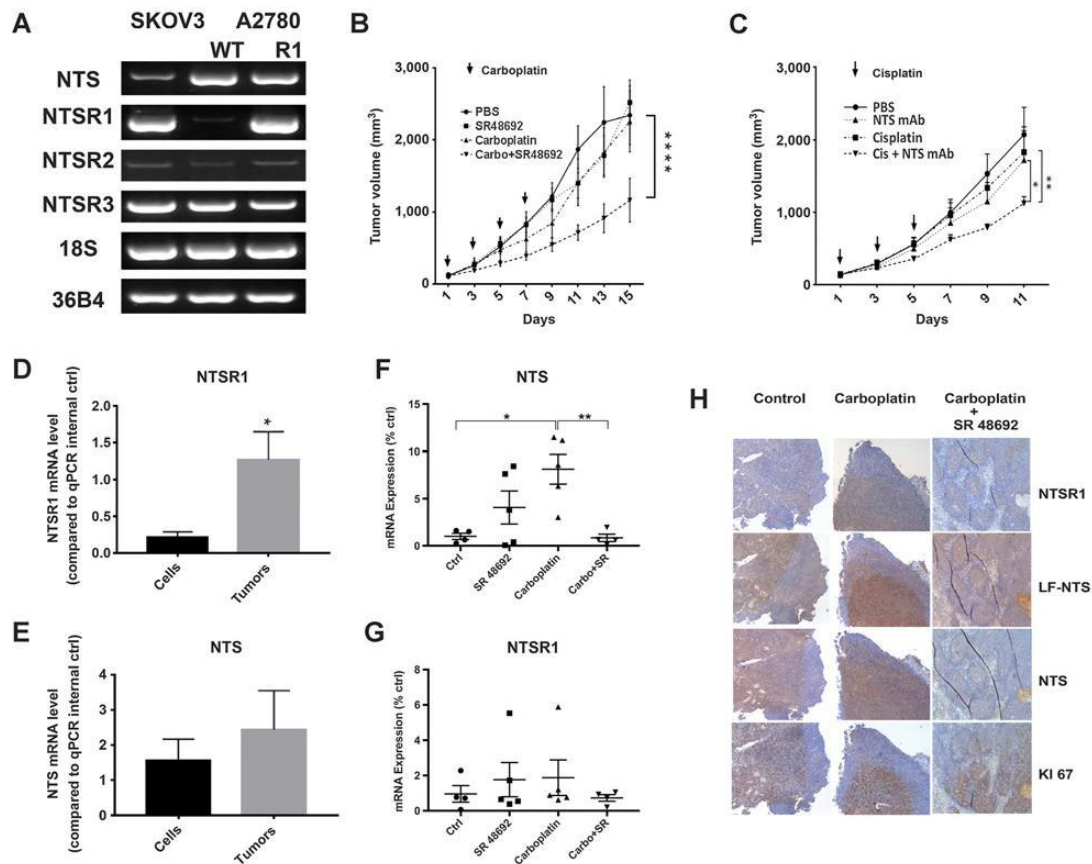


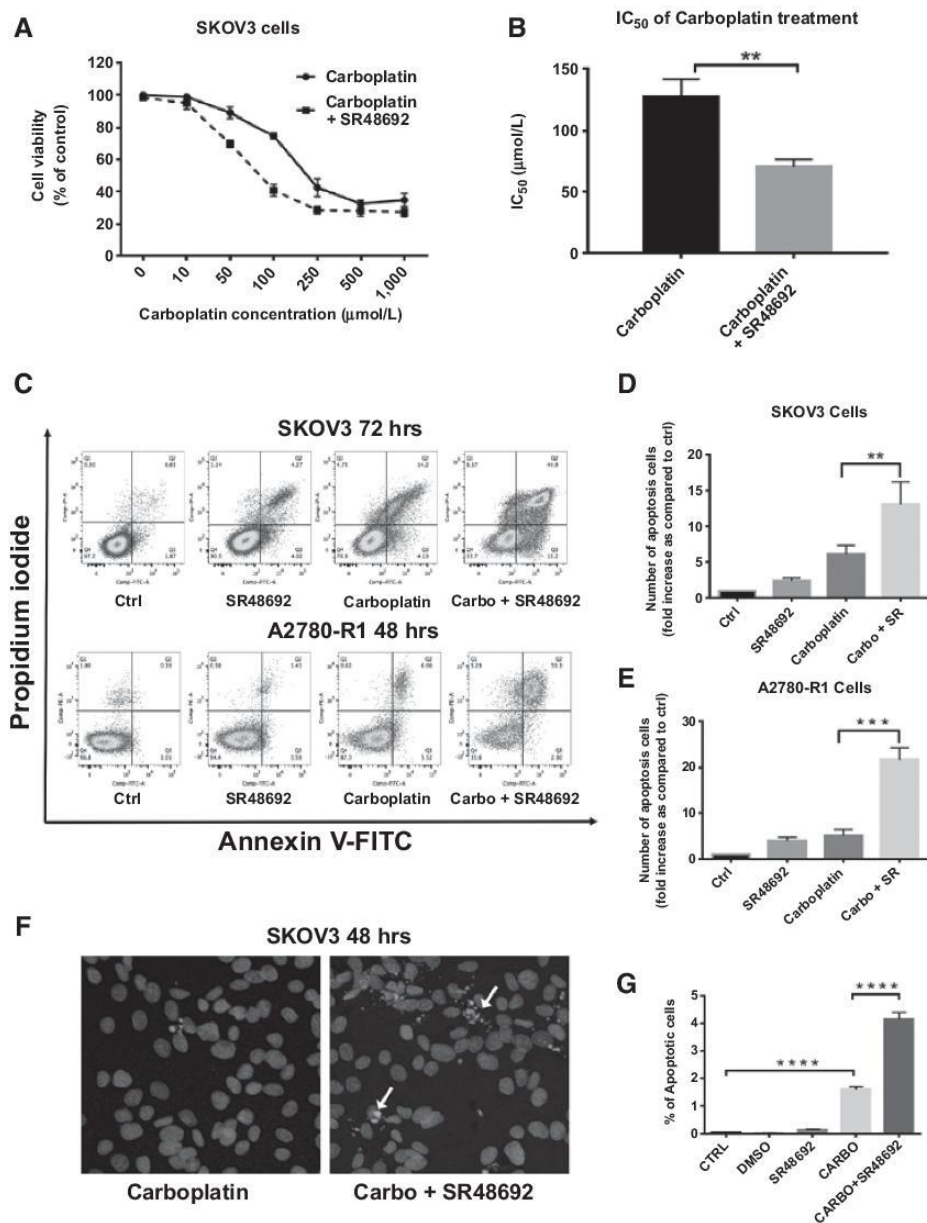
Figure 1. Contribution of NTSR1/NTS complex to the growth of ovarian experimental tumor. **A**, mRNA expression of NTS and neurotensin receptors in ovarian cancer cell lines SKOV3 and A2780, and A2780 overexpressing NTSR1, A2780-R1 (right). **B**, A2780 cells (3×10^5) were injected subcutaneously into female NMRI-Nude Foxn1 mice ($n = 7$). When tumors reached 100 mm^3 , mice were treated everyday (orally) with PBS or SR 48692 (1 mg/kg; see Methods). At day 1, 3, 5, and 7 (see arrow), mice in the groups carboplatin and carboplatin plus SR48692 were treated (i.p.) with carboplatin (4 mg/kg), and the other groups were injected with PBS. Tumor volume was calculated using the ellipsoid formula, every 2 days. In two-way ANOVA statistical analysis, ****, $P < 0.0001$. **C**, A2780 cells (3×10^5) were injected subcutaneously into female NMRI-Nude Foxn1 mice ($n = 7$). When tumors reached 130 mm^3 , mice were treated with PBS (i.p.), NTS mAb (10 mg/kg/every 2 days, i.p.), cisplatin (1 mg/kg, i.p.; see arrow), or with the combination of cisplatin and NTS mAb. Tumor volume was calculated using the ellipsoid formula, every 2 days. In two-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. **D**, NTSR1 mRNA quantification, and **E**, NTS mRNA quantification in A2780 cells and experimental tumors by qRT-PCR. Results represent the mean $\pm$ SEM of 8 independent cell and tumor extractions. **F**, NTS mRNA quantification, and **G**, NTSR1 mRNA quantification by qRT-PCR in tumors treated with carboplatin, SR48692, and the combination from four to five mice for each group. **H**, Example of NTSR1, LF-NTS, NTS, and Ki67 immunohistologic labeling of experimental tumors from animals treated with PBS, carboplatin, and the combined treatment at day 15.

regulation may contribute to the improvement of carboplatin response when combined with SR48692.

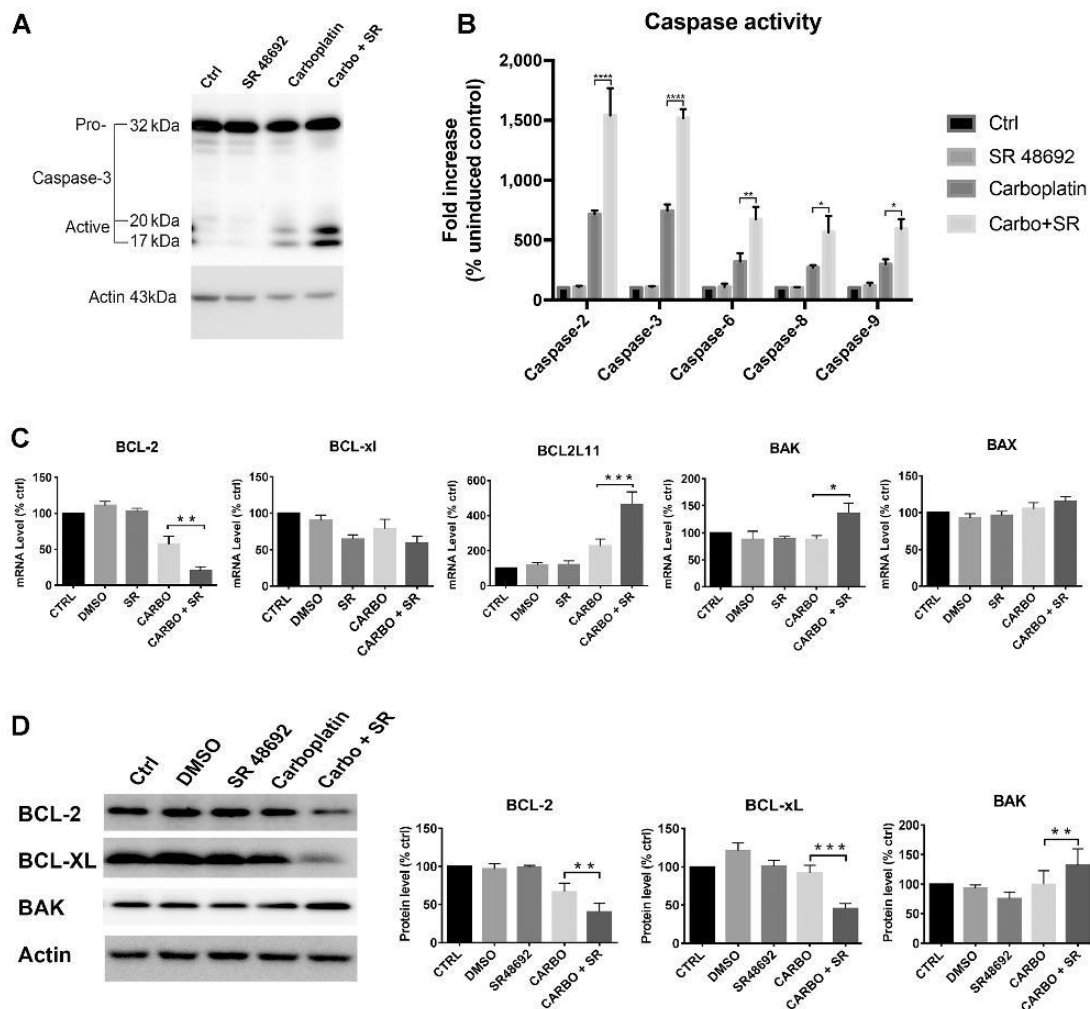
The fate of cells is determined by the balance between anti- and proapoptotic members of the Bcl-2 protein family. As expected, Bcl-2 and Bcl-xL were downregulated, while the mRNA of Bak and BCL2L11 (encoding Bim, a BH3-only Bcl-2) were increased with the combined treatment as compared with carboplatin single treatment (Fig. 3C). The Bcl-2 family protein profile, Bcl-2 and Bcl-xL, followed a similar regulation as their respective transcript. An increase in Bak protein expression with the combined treatment was also observed (Fig. 3D).

NTSR1 antagonist facilitates nuclear platinum accumulation and increases the DNA double strand breaks

Platinum accumulation in whole-cell extracts and nuclei was compared in the presence of carboplatin or carboplatin plus SR48692 treatments. In SKOV3 and in A2780-R1 cells, the platinum content of the whole cell was increased by twofold after 6-hour exposure to the combined treatment as compared with carboplatin alone (Fig. 4A). No increase was observed in A2780 wild-type cells. To evaluate whether SR48692 facilitates drug access to the targeted DNA, platinum-DNA binding was assayed. After a 6-hour treatment, an

**Figure 2.**

NTSR1 antagonist enhances cell death induced by carboplatin. **A**, Effect of SR 48692 on SKOV3 cells viability inhibition induced by increasing concentration of carboplatin at 72 hours of treatment. **B**, IC_{50} calculation of SKOV3 cells viability inhibition by carboplatin in the presence or absence of 5 $\mu\text{mol/L}$ SR48692. Results represent the mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments, **, $P < 0.01$. **C**, Flow cytometry analysis of apoptotic cells determined by Annexin V/propidium iodide dual staining. Cells were incubated with 150 $\mu\text{mol/L}$ carboplatin corresponding cells viability at the IC_{50} concentration, with or without 5 $\mu\text{mol/L}$ SR48692. Treatment was 72 and 48 hours for SKOV3 cells and A2780-R1 cells, respectively. **D** and **E**, Calculation of fold increase of cellular apoptosis from flow cytometry experiments in SKOV3 cells and A2780-R1 cells, respectively. The results represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments; in one-way ANOVA statistical analysis, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **F**, Example of Hoechst 33258 staining of SKOV3 cells treated with 150 $\mu\text{mol/L}$ carboplatin for 48 hours in the presence or absence of 5 $\mu\text{mol/L}$ SR48692. **G**, Graph represents the proportion of apoptotic cells under each condition as compared with control. Five-thousand cells were counted by condition. In a one-way ANOVA statistical analysis, ****, $P < 0.0001$.

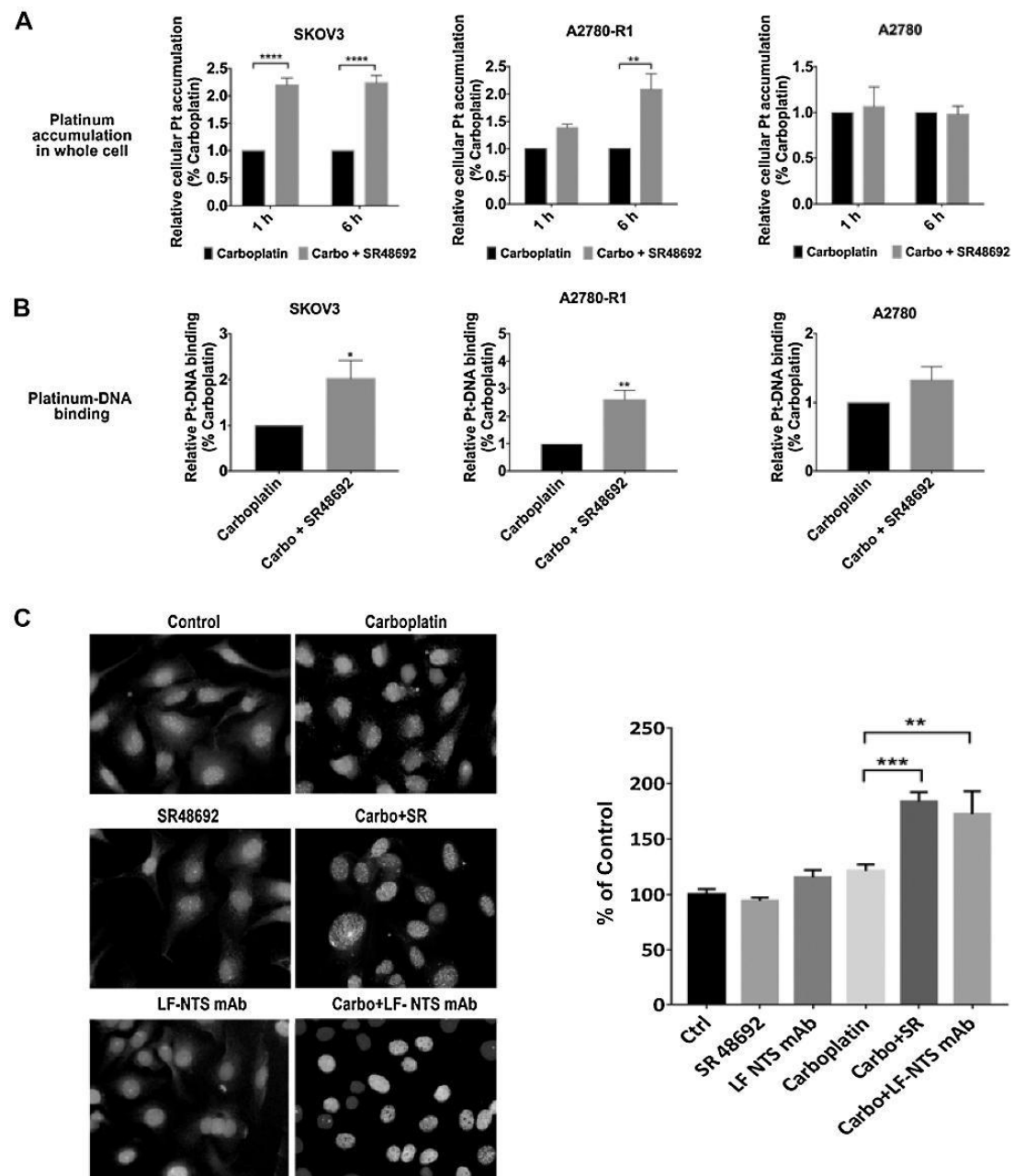
**Figure 3.**

NTSRI antagonist stimulates caspase activation and facilitates the apoptosis via the regulation of Bcl-2 family protein in cells exposed to carboplatin. **A**, Effects of carboplatin and SR 48692 on the expression of active caspase-3 analyzed by Western blot analysis. **B**, Caspase activation by carboplatin and SR48692 determined by colorimetric protease assay kit. Fifty micrograms of SKOV3 whole-cell lysates were derived from SKOV3 cells treated with carboplatin (150 μ mol/L), SR48692 (2 μ mol/L), or both for 48 hours. The result is expressed as fold-increase from noninduced control cells, and represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments; in a two-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$. **C**, The gene expression of five major Bcl-2 family transcripts was measured by qRT-PCR. SKOV3 cells were treated with 150 μ mol/L carboplatin, 2 μ mol/L SR48692, or both for 24 hours. 18S and 36B4 were used for the normalization. The result represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments; in a one-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **D**, The regulation of carboplatin and SR48692 on the expression of BCL-2, BCL-xL, and BAK protein analyzed by Western blot (50 μ g whole-cell lysate per lane). Graph, semiquantitative analysis of the band intensity analyzed with ImageJ software. The result is expressed as fold induction from control from three independent experiments. The result represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments; in a one-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

increase of 2.02 ± 0.23 and 2.61 ± 0.33 fold of platinum-DNA binding was observed in SKOV3 and A2780-R1 cells, respectively (Fig. 4B). In A2780 wild-type cells, a slight but no significant increase of platinum content in the nucleus was seen when cells were treated with carboplatin in the presence of SR48692 (Fig. 4B).

It is documented that the phospho-SER-139 H2AX protein (γ -H2AX) is recruited at the site of DNA double strand breaks and thereby involved in DNA repair. Therefore, we analyzed its recruitment in SKOV3 cells after treatment with carboplatin alone or in combination with SR48692. The number, the size (as seen in Fig. 4C, left), and the intensity of dots increased in the nucleus

Liu et al.

**Figure 4.**

NTSR1 antagonist increases platinum accumulation and the DNA damage in the SKOV3 cells. Accumulation of platinum in whole-cell extracts for 1 or 6 hours (A), and in purified DNA of SKOV3, A2780, and A2780-R1 cells (B). The cells were treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ carboplatin without or with 5 $\mu\text{mol/L}$ SR48692. The platinum content was determined by ICP-MS. The results were normalized by the protein (whole cell accumulation) or DNA concentration (DNA accumulation), respectively. The result represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments; in a two-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. C, γH2AX labeling in nucleus of SKOV3 cells treated by 150 $\mu\text{mol/L}$ carboplatin in the presence or absence of 5 $\mu\text{mol/L}$ SR48692, or 50 mg/mL LF-NTS mAb for 6 hours. Graph, quantitative analysis of γH2AX staining in nucleus of SKOV3 cells. The result represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments in which 50 cells were counted; in a two-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

of cells treated with carboplatin and SR48692, or LF-NTS mAb as compared with carboplatin single treatment. Barely any labeling was detected in control SKOV3 cells, and cells treated with SR48692 or LF-NTS mAb alone. The intensity of γ H2AX labeling was increased from $121.30\% \pm 5.83\%$ for carboplatin-treated cells to $184.10\% \pm 8.41\%$ for the SR48692 and carboplatin combined treatment and to $172.6\% \pm 20.65\%$ for the LF-NTS mAb and carboplatin combined treatment as compared with the control cells (Fig. 4C, right).

NTSR1 antagonist reduces carboplatin efflux from the cells

The P-type transport ATPase family (ATP7A, ATP7B) and the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) have been reported to be associated with the platinum efflux and consequently to platinum salt drug resistance (32). In SKOV3 cells, we found that the mRNA expression levels of ATP7A, ATP7B, and MRP2 were decreased when cells were treated with the combination of SR48692 and carboplatin (Fig. 5A). The decrease was even more pronounced at the protein level suggesting a decrease of the cellular efflux (Fig. 5B). ATP7A shuttles from the Golgi apparatus to the cell membrane when the copper concentration is increased in cells and contributes to the copper efflux (33). We investigated whether the localization of ATP7A was altered when SKOV3 cells were exposed to $500 \mu\text{mol/L}$ carboplatin for 1 hour. In the control cells and the cells treated with SR48692, ATP7A accumulated in the trans-Golgi network while the labeling was dispersed in the cytoplasm when cells were exposed to carboplatin (Fig. 5C). However, in the cells treated with both carboplatin and SR48692, the labeling of ATP7A was less dispersed in the cytoplasm as compared with cells treated with carboplatin alone (Fig. 5C). The quantification of the ATP7A immunolabeled particles was made according to their size (pixels) and showed that the number of particles was two- to threefold higher in cells treated with only carboplatin as compared with the cells treated with the combination of carboplatin and SR48692. This suggests that the mobilization of ATP7A in the cytoplasm, for the efflux of carboplatin, is antagonized by the NTSR1 antagonist.

NTS and NTSR1 are expressed in ovarian cancer

Labeling of NTS and NTSR1 was performed by IHC on 46 ovarian cancer specimens. Figure 6A shows a typical positive and negative labeling for both markers in low-grade serous carcinomas. The clinical and the histologic characteristics of patient are given in the Supplementary Table S1. The patients presented the conventional risk factors for ovarian adenocarcinoma: BRCA mutations, nulliparity, endometriosis history, menopause hormone therapy. The predominant pathologic subtype detected among the ovarian adenocarcinomas was serous differentiation (66.7%). The majority of the tumors were FIGO stage 3 (48.5%) or 4 (30.3%). This series is representative of patients with ovarian cancer.

In malignant tumors (borderline tumor and adenocarcinoma), the NTSR1 distribution was in most cases homogeneous (Fig. 6B). A Hirsch score superior to 50 was considered as moderately positively or strongly labeled. With this scoring, 72% and 74% of the cases were positively labeled with the NTSR1 and long-fragment NTS antibody, respectively. NTSR1 and NTS cytoplasmic localization was predominant and 67% of the samples were positive for both NTSR1 and NTS (Fig. 6B). The highest score for NTSR1 was found in the clear cell carcinomas. NTSR1 and NTS

scores were also analyzed in nonmalignant tissues with a staining negative or very weak in nine of 10 samples (Fig. 6B).

NTSR1 expression was significantly higher in adenocarcinomas (102.1 ± 54.4) than in borderline tumors (67.7 ± 33.8) and normal ovaries (16 ± 23.5 ; $P < 0.001$). NTS expression was also significantly higher in adenocarcinomas (97.3 ± 48.2) than in borderline tumors (81.2 ± 55.6) and normal ovaries (28.5 ± 32.5 ; $P < 0.001$; Fig. 6C).

NTS and NTSR1 mRNA expression were analyzed in a cohort of 491 high-grade ovarian serous cystadenocarcinoma from the TCGA database. Figure 6D shows the distribution of the NTSR1 and NTS Z-score within the cohort. For both markers, this distribution was homogeneously dispersed among the specimens. Kaplan–Meier analysis of the progression-free survival (PFS) for this dataset showed that a high NTSR1 mRNA expression (the z-score above the 90th percentile), was associated with a significantly worse prognosis ($P = 0.019$) with a median survival of 13.31 and 17.51 months, respectively. FIGO stages were available in 484 patients. Twenty-four (4.9%) tumors were FIGO stage II (3 stage IIa, 4 stage IIb, 17 stage IIc), 381 (78.8%) tumors were FIGO stage III (7 stage IIIa, 21 stage IIIb, 353 stage IIIc), and 79 (16.3%) were stage IV. NTSR1 mRNA expression was significantly increased in higher stages ($P = 0.01$ for IV and IIIc stages vs. others; Fig. 2B; Supplementary Data). In the same vein, NTSR1 expression was higher within grade 3 as compared with grade 2 (Fig. 2C; Supplementary Data). Platinum status was available in 287 patients; 90 (26.1%) patients were resistant and 197 (57.1%) were sensitive. NTSR1 mRNA higher expression was significantly associated with platinum-resistant status ($P = 0.0076$), whereas NTS mRNA expression was not different for the resistant or the sensitive groups (Fig. 6E).

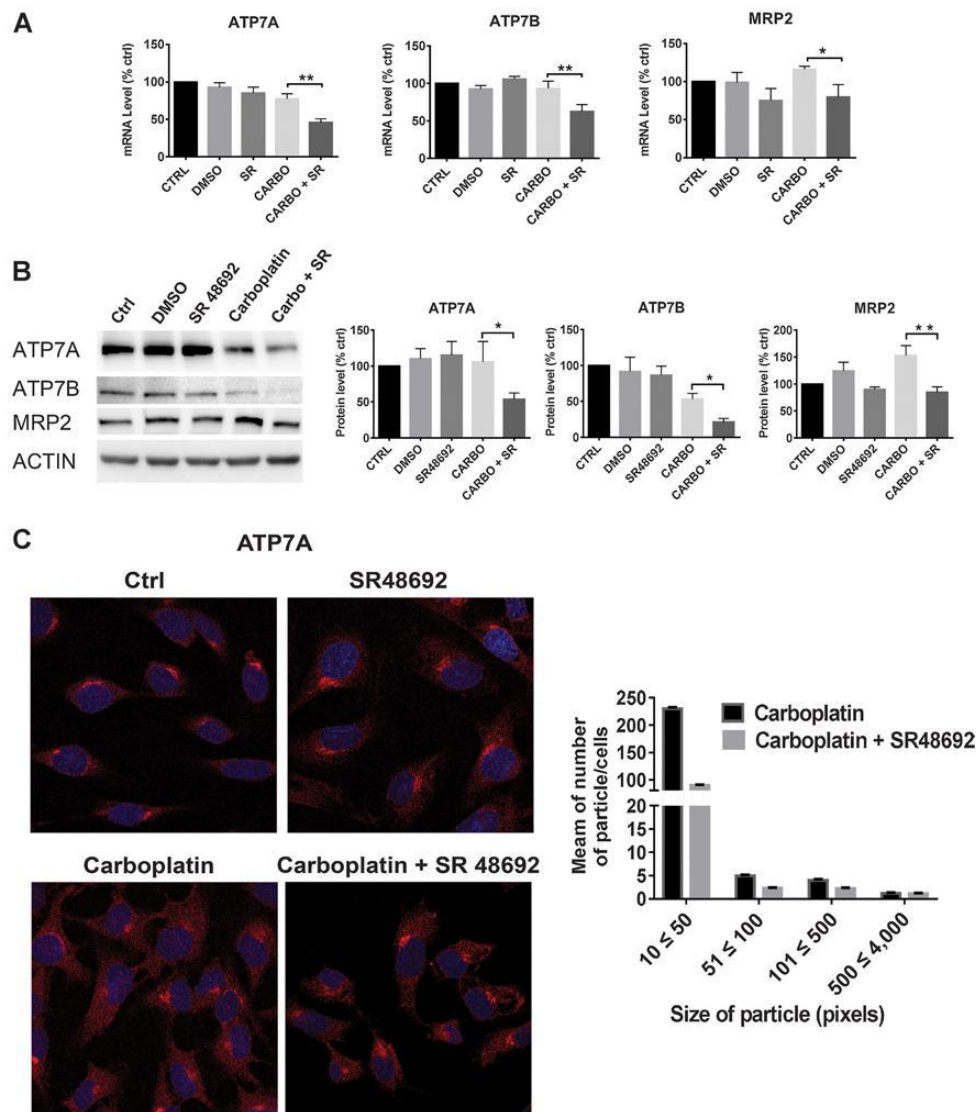
Interestingly, in this dataset, the expression of NTSR1 was inversely correlated with NTSR3 ($P = 0.006$; Fig. 2D; Supplementary Data). As a consequence, the expression of NTSR3, with a z-score above the 25th percentile was significantly correlated with a good prognosis of the progression-free survival ($P = 0.0013$) with a median survival of 14.72 and 11.24 months, respectively.

Discussion

Surgery is the initial treatment for stage I–IVA ovarian cancer. It is usually followed by several cycles of chemotherapy using platinum-based drugs (mainly carboplatin) combined or not with other anticancer agents (paclitaxel or docetaxel). Nevertheless, most patients relapse because of a resistance or weak sensitivity to the platinum-based treatment. Therefore, improving the response to existing treatment by introducing a nontoxic sensitizing agent might optimize the current chemotherapy.

As the consequence of specific NTSR1 overexpression and activation in tumor cells, the NTS/NTSR1 complex enhances tumor progression by promoting proliferation (7, 14, 34, 35), metastasis (7, 14, 36, 37), as well as survival (38, 39). These observations translate in clinic to a worst prognosis in patients overexpressing NTSR1 (17, 36, 40). In this context, NTSR1-inhibiting agents are predisposed to improve the cancer outcome. Multiple studies showed that neurotensin receptor 1 antagonist, SR48692, inhibited proliferation of tumor cells *in vitro* as well as *in vivo* in small-cell lung cancer (19), pancreatic ductal carcinoma (41), breast cancer (42), colon cancer (18), and malignant melanoma (39).

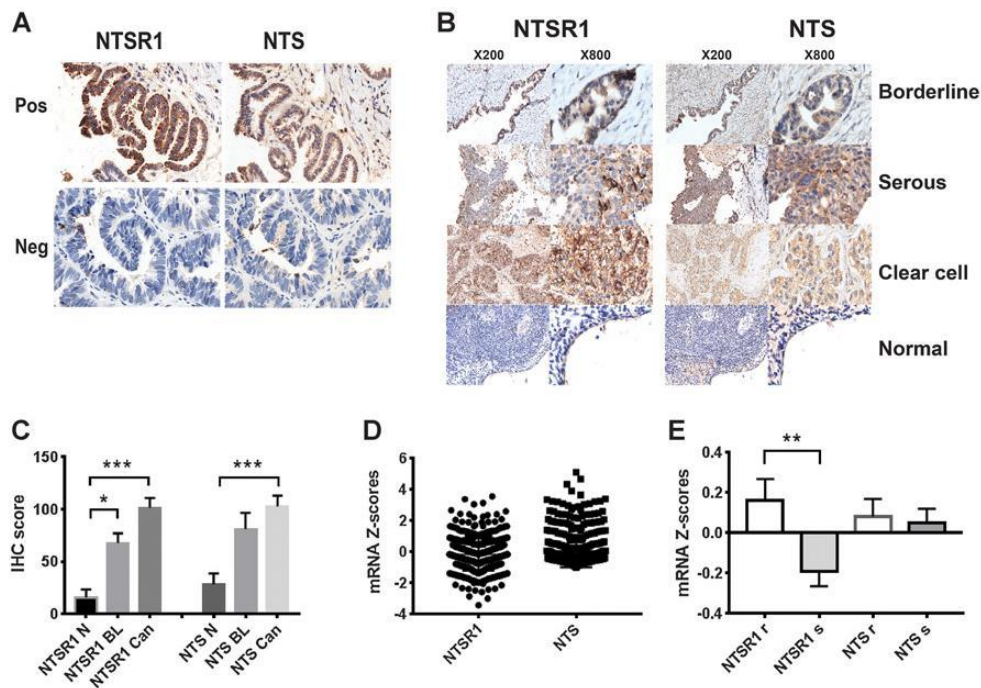
Liu et al.

**Figure 5.**

NTSR1 antagonist reduces the efflux of platinum in SKOV3 cells. **A**, The mRNA quantification by qRT-PCR of three major transporters involved in the efflux of carboplatin: ATP7A, ATP7B, and MRP2. The RNA was extracted from SKOV3 cells treated with 150 μ M/L carboplatin, 2 μ M/L SR48692, or both for 24 hours. 18S and 36B4 were used for the normalization. In a two-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$. **B**, The protein expression of ATP7A, ATP7B, and MRP2 was analyzed by Western blot from SKOV3 cells treated as described above. Graph, semiquantitation of the band intensity, performed by ImageJ software, from three independent experiments. In a two-way ANOVA statistical analysis, *, $P < 0.05$. **C**, Cellular localization of ATP7A, in SKOV3 cells after exposure to 500 μ M/L carboplatin with or without 5 μ M/L SR48692 for 1 hour. Cells were fixed and then stained with ATP7A antibody (red) and nuclei were counterstained with DAPI in blue. Graph, distribution of the red particles (ATP7A) according to their size in pixels; counting was performed in 50 cells treated with carboplatin or carboplatin and SR48692 with Fiji software.

In this study, we investigated the synergistic effect of a NTSR1 antagonist and platinum salt-based treatment in ovarian cancer cells and xenografted tumors in nude mice. We designed experimental tumors to mimic the clinical context

and therefore waited until each tumor measurement reached 7 to 8 mm before starting treatment. Under these conditions, the tumor growth rates were three times less in the group treated with the combination carboplatin and SR48692 in comparison

**Figure 6.**

NTSR1 and NTS are expressed in ovarian cancer. NTSR1 expression is correlated with carboplatin-resistant patient. **A**, Example of positive and negative staining for NTSR1 and NTS shown in low-grade serous carcinomas. **B**, Positive staining for NTSR1 and NTS in borderline, serous, clear cell carcinomas, and normal tissue. Slide were scanned with 3DHISTECH scanner and analyzed with Panoramic viewer at the 20 $\times$ and 80 $\times$ magnification. **C**, IHC score distribution for NTSR1 and NTS in normal tissue, borderline (BL), or cancerous tissues (Can). **D**, Distribution of NTSR1 and NTS Z-scores, in a cohort of 491 high-grade ovarian serous cystadenocarcinoma from the TCGA database. **E**, Within the same database, distribution of NTSR1 and NTS Z-scores within the patient resistant or sensitive to platinum salt-based therapy (287 patients).

with the other groups. Clearly, blocking NTSR1 activation changed the cellular homeostasis of cancer cells to become more responsive to the chemotoxic drug.

Several possible mechanisms to boost the sensitization to chemotherapy were investigated. Carboplatin acts through the formation of DNA adduct, followed by apoptosis induction as a cellular response to DNA damage. Before reaching the DNA, carboplatin enters the cell via passive infusion or is facilitated by active uptake with a number of transport proteins. Platinum can be extruded from the cells by the GS-X pumps (MRP 1-5) after chelation with glutathione or via the copper efflux system (ATP7A/B; ref. 43). The decrease of cellular platinum accumulation is known to contribute to resistance to platinum-based drugs (44). In this view, overexpressing MRP2, ATP7A, and ATP7B were proposed to participate in the resistance mechanism (45–47). In particular, MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) showed a major role in chemoprotection by elimination of drug conjugates with glutathione (45, 48, 49). In our cellular model, SR48692 or carboplatin did not influence the expression of MRP2, ATP7A, or ATP7B, but the combination of NTSR1 antagonist with carboplatin strongly downregulates these three key players of drug efflux, and would explain the enhancement of carboplatin efficiency.

A major characteristic of NTS is to be a survival factor. This was demonstrated in several cancerous cellular models from diverse origins (9). In breast cancer cells, NTS agonist inhibited apoptosis induced by serum deprivation, and was accompanied by the enhancement of Bcl-2 gene transcription and protein cellular content (38). Platinum salt-based drug efficacy is obtained by the induction of apoptosis, often mediated concomitantly by the activation of several signal transduction pathways, including calcium signaling, death receptor signaling, and the activation of mitochondrial pathways. Cells escaping drug-induced apoptosis are closely associated with the development of platinum-based therapy resistance (50). The Bcl-2 family plays a crucial role in the regulation of apoptosis. It contains three subfamilies, the BH3 only family (Bid, Bim, Bad), the antiapoptotic family (Bcl-2, Bcl-xL), and the proapoptotic family (Bax, Bak). In our model, effector proteins in control of apoptosis are essentially unstimulated by carboplatin treatment alone, but in contrast, these effectors are strongly stimulated or downregulated accordingly in the combined treatment (in Fig. 3, see BCL-2, BCL-xL, BCL2L11, BAK, and BAX). As a consequence, the initiator (caspases 2, 8, 9) and executioner (caspases 3 and 6) caspases of the apoptotic pathway are also over stimulated when NTSR1 antagonist is combined with carboplatin. The significant caspase-2 activation

suggests that it plays a critical role in the apoptosis in response to DNA damage caused by carboplatin and this response is enhanced by the addition of SR48692. We also noted the activation of caspase-8 pathway by the combined treatment, as compared with the carboplatin treatment alone, suggesting that the extrinsic apoptotic pathway was also implicated in better drug efficiency when associated with NTSR1 antagonist. This cascade merits a further exploration.

In summary, we have shown that a NTSR1 antagonist enhanced the response to platinum salt-based chemotherapy by improving the drug-target interaction and thereby enhancing the chemotherapy-induced apoptosis. These results suggest that patients with ovarian cancer expressing both NTS and NTSR1 could benefit from a combined treatment based on platinum salt drug associated with a blocking agent of the NTS/NTSR1 complex. Our initial studies suggest that this could concern the majority of the patients with ovarian cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors.

Authors' Contributions

Conception and design: A. Gompel, P. Forgez

Development of methodology: J. Liu, Z. Wu, G. Gauchotte

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): J. Liu, M. Agopiantz, J. Poupon, Z. Wu, P.-A. Just, G. Gauchotte

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): J. Liu, M. Agopiantz, G. Gauchotte, P. Forgez

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Agopiantz, E. Segal-Bendirdjian, G. Gauchotte, A. Gompel, P. Forgez

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. Liu, G. Gauchotte

Study supervision: A. Gompel, P. Forgez

Acknowledgments

We thank Dr. Neil Insdorf for his kind help in editing the manuscript. Many thanks go to Mr. J. Hottot for statistical analysis. We thank Sylvie Dumont and Fatiha Merabtene (UPMC Univ Paris 06, UMS_30 LUMIC, St Antoine Histomorphology Platform, F-75012) for their excellent assistance with the IHC. We thank Tatiana Ledet and other staff in the animal facility of St. Antoine hospital. We sincerely acknowledge the microscopy platform SCM (Service Commun de Microscopie - Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales - Paris).

Grant Support

This work was supported by INSERM TRANSFERTPI-07563-A-09 (principal investigator: Forgez), SATT idf INNOV Paris France (principal investigator: P. Forgez), Fondation de France 2013 00038286 (principal investigator: E. Segal-Bendirdjian). China Scholarship council supported Dr. J. Liu's PhD study. SATT idf INNOV Paris France supported Z. Wu.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 29, 2017; revised July 3, 2017; accepted August 2, 2017; published OnlineFirst August 2, 2017.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-86.
2. Surveillance Epidemiology and End Results Program. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
3. Thigpen T, duBois A, McAlpine J, DiSaia P, Fujiwara K, Hoskins W, et al. First-line therapy in ovarian cancer trials. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:756-62.
4. Raja FA, Chopra N, Ledermann JA. Optimal first-line treatment in ovarian cancer. *Ann Oncol* 2012;23:118-27.
5. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:502-16.
6. Kitabgi P, Checler F, Mazella J, Vincent JP. Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Rev Clin Basic Pharm* 1985;5:397-486.
7. Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, et al. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 2014;5:8252-69.
8. Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloué F, et al. The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014;13:1354-65.
9. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 2011;93:1369-78.
10. Wu Z, Martinez-Fong D, Tredaniel J, Forgez P. Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front Endocrinol* 2012;3:184.
11. Souaze F, Viardot-Foucault V, Roulet N, Toy-Miou-Leong M, Gompel A, Bruyneel E, et al. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2006;27:708-16.
12. Wu Z, Galmiche A, Liu J, Stadler N, Wendum D, Segal-Bendirdjian E, et al. Neurotensin regulation induces overexpression and activation of EGFR in HCC and restores response to erlotinib and sorafenib. *Cancer Lett* 2017; 388:73-84.
13. Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, et al. Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget* 2015;6:29975-90.
14. Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O, et al. Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* 2014;5:8235-51.
15. Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, Kikkawa N, Sasaki K, Chazono H, et al. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int J Cancer* 2008;123:1816-23.
16. Korner M, Waser B, Strobel O, Buchler M, Reubi JC. Neurotensin receptors in pancreatic ductal carcinomas. *EJNMMI Res* 2015;5:17.
17. Ouyang Q, Gong XY, Xiao HL, Zhou J, Xu MH, Dai Y, et al. Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. *Mol Cancer* 2015;14:21.
18. Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, Gully D, Laburthe M. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1999;80:448-54.
19. Moody TW, Chiles J, Casibang M, Moody E, Chan D, Davis TP. SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides* 2001;22:109-15.
20. Al Moundhri MS, Al-Salam S, Al Mahrouqee A, Beegam S, Ali BH. The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies. *J Med Toxicol* 2013;9:25-33.
21. Gully D, Canton M, Boigegrain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:65-9.
22. Rostene W, Azzi M, Boudin H, Lepeu I, Souaze F, Mendez-Ubach M, et al. Use of nonpeptide antagonists to explore the physiological roles of neurotensin. Focus on brain neurotensin/dopamine interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1997;814:125-41.

23. Oury-Donat F, Thurneyssen O, Gonalons N, Forgez P, Gully D, Le Fur G, et al. Characterization of the effect of SR48692 on inositol monophosphate, cyclic GMP and cyclic AMP responses linked to neurotensin receptor activation in neuronal and non-neuronal cells. *Br J Pharmacol* 1995;116:1899–905.
24. Yamada M, Yamada M, Lombet A, Forgez P, Rostene W. Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 1998;62:PI 375–80.
25. Dubuc I, Costentin J, Terranova JP, Barnouin MC, Soubrie P, Le Fur G, et al. The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1994;112:352–4.
26. Souza F, Rostene W, Forgez P. Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272:10087–94.
27. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2:401–4.
28. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Sig* 2013;6:pl1.
29. Simpkins F, Hevia-Paez P, Sun J, Ullmer W, Gilbert CA, da Silva T, et al. Src inhibition with saracatinib reverses fulvestrant resistance in er-positive ovarian cancer models *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2012;18:5911–23.
30. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577–80.
31. Bauerschlag DO, Schem C, Tiwari S, Egberts JH, Weigel MT, Kalthoff H, et al. Sunitinib (SU11248) inhibits growth of human ovarian cancer in xenografted mice. *Anticancer Res* 2010;30:3355–60.
32. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:307–20.
33. Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2008;88:826S–9S.
34. Toy-Miou-Leong M, Cortes CL, Beaudet A, Rostene W, Forgez P. Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2004;279:12636–46.
35. Sehgal I, Powers S, Huntley B, Powis G, Pittelkow M, Mailhe NJ. Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4673–7.
36. Alifano M, Souza F, Dupouy S, Camilleri-Broet S, Younes M, Ahmed-Zaid SM, et al. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:4401–10.
37. Ye Y, Long X, Zhang L, Chen J, Liu P, Li H, et al. NTS/NTR1 co-expression enhances epithelial-to-mesenchymal transition and promotes tumor metastasis by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:70303–22.
38. Somai S, Gompel A, Rostene W, Forgez P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:482–8.
39. Zhang Y, Zhu S, Yi L, Liu Y, Cui H. Neurotensin receptor1 antagonist SR48692 reduces proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest in melanoma cells. *Mol Cell Biochem* 2014;389:1–8.
40. Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souza F, Plu-Bureau G, Chaouat M, et al. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS One* 2009;4:e4223.
41. Wang JG, Li NN, Li HN, Cui L, Wang P. Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides* 2011;45:151–6.
42. Souza F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, et al. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 2006;66:6243–9.
43. Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:495–535.
44. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993;67:1171–6.
45. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996;56:4124–9.
46. Kalayda GV, Wagner CH, Buss I, Reedijk J, Jaehde U. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* 2008;8:175.
47. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:4661–9.
48. Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 1993;268:20116–25.
49. Ishikawa T, Wright CD, Ishizuka H. Gs-X pump is functionally overexpressed in Cis-Diamminedichloroplatinum(II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell-differentiation. *J Biol Chem* 1994;269:29085–93.
50. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* 2014;6:1769–92.

" Minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) expression correlates with histological grade and survival in endometrioid endometrial adenocarcinoma. "

Hotton J*, **Agopiantz M***, Leroux A, Charra-Brunaud C, Marie B, Busby-Venner H, Morel O, Guéant JL, Vignaud JM, Battaglia-Hsu SF, Gauchotte G.



Minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) expression correlates with histological grade and survival in endometrioid endometrial adenocarcinoma

Judicaël Hotton^{1,2} · Mikaël Agopianz^{2,3} · Agnès Leroux⁴ · Claire Charra-Brunaud⁵ · Béatrice Marie⁶ · Hélène Busby-Venner^{2,6} · Olivier Morel¹ · Jean-Louis Guéant^{2,7} · Jean-Michel Vignaud^{2,6} · Shyue-Fang Battaglia-Hsu² · Guillaume Gauchotte^{2,6,8} 

Received: 5 September 2017 / Revised: 30 November 2017 / Accepted: 4 December 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

Abstract

Minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) is involved in initiating DNA replication and is upregulated during licensed G0 phase of the cell cycle. This early expression permits its labeling of more proliferating cells than those by Ki-67. Here using a cohort of 89 endometrioid adenocarcinoma, we report findings made on the prognostic value of MCM6 based on immunohistochemical labeling index (LI) of the protein in comparison with that of Ki67 as no such information is currently available. Additionally, we examined the prognostic values of these markers based on their mRNA expression using a cohort of uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC, $n = 307$) taken from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. Our evidence indicated the presence of a positive correlation between the LI of MCM6 and the histological grade of endometrioid endometrial adenocarcinoma (grade I, 66.7%; grade II, 75.3%; grade III, 81.4%; $p < 0.001$) and an inverse correlation between the LI of MCM6 and the overall and progression-free survival ($p = 0.02$ for both). The LI of Ki-67 correlated with grade ($p < 0.001$), but not survival. The MCM6 and Ki-67 inter-observer intra-class correlation coefficients were excellent: 0.84 (95% confidence interval, 0.83–0.91) and 0.84 (0.77–0.90), respectively. For in silico analyses of the TCGA cohort, both univariate and multivariate Cox analyses ($p = 0.003$ and $p = 0.03$, respectively) revealed high MCM6 mRNA Z-scores associated with reduced overall survival. This association was absent for Ki-67. MCM6 is thus a highly reproducible marker of poor prognosis in endometrial cancer. Evaluation of MCM6 should thus be considered in daily practice for risk stratification.

Keywords Endometrioid adenocarcinoma · Endometrial carcinoma · Immunohistochemistry · Prolifération · MCM6 · Ki-67

Judicaël Hotton and Mikaël Agopianz contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00428-017-2278-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Guillaume Gauchotte
g.gauchotte@chru-nancy.fr

¹ Department of Gynecology and Obstetrics, CHRU de Nancy, Nancy, France

² INSERM U954, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Department of Medical Gynecology, CHRU de Nancy, Nancy, France

⁴ Department of Pathology, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁵ Department of Radiotherapy, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁶ Department of Pathology, CHRU de Nancy, Nancy, France

⁷ Department of Molecular Medicine and Personalized Therapeutics, Department of Biochemistry, Molecular Biology, Nutrition, and Metabolism, CHRU de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁸ Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Central, CHRU de Nancy, 29, avenue du Maréchal De Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France

Introduction

Endometrial cancer is the one of the most common gynecological cancers. It ranks fourth among the most frequent cancers in women, after breast, colorectal, and lung cancers.¹ In France, in 2012, the recorded number of new cases was 6852, and that of death was 2148. Its incidence has been increasing during the last 15 years.² Most of these cancers are diagnosed after menopause at a mean age of 62.7 years. The 5-year overall survival rate is around 80%; however, studies predict that two thirds of the advanced stage patients will die.^{3, 4} New markers are thus required to improve the risk assessment for these patients. Currently, histological grade and degree of myometrial invasion (included also in the FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) staging⁵) are the only pathological criteria used to predict the prognosis and to determine the therapeutic strategy. Tumor proliferation markers, including Ki-67, are not routinely used in endometrial cancer as previous studies failed to demonstrate their reliabilities as prognostic markers associated with either tumor progression or survival.^{6–9} The most frequent mutations associated with these cancers include TP53. Interestingly, loss of expression of certain genes like MSH6 and PMS2 appears to increase the lifetime risk to endometrial cancers. Recent genomic features of endometrial carcinomas permit a classification into four categories: *POLE* ultramutated, microsatellite instability hypermutated, copy number low, and copy number high alterations that may impact adjuvant treatment.

MCM (minichromosome maintenance) family proteins are highly conserved hexameric complex of DNA-binding proteins.¹⁰ MCMs initiate DNA replication once during the cell cycle and represent a convergence between the multiple signaling pathways involved in cell growth.^{10–12} Unlike Ki-67, they are expressed prior to G1 phase of the cell cycle; consequently, anti-MCM antibodies label more cells than anti-Ki-67 antibodies.¹² In lung carcinoma and meningioma, the immunohistochemical labeling index (LI) of minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) correlates positively with histological grade/subtype and inversely with survival.^{13, 14} In endometrial cancer, the prognostic value of MCM6 has not yet been evaluated; however, two studies reported the prognostic value of other MCM complexes.^{15, 16} In the study by Li et al., MCM7 expression correlated positively with histological grade and was inversely related to survival. In Kato et al., the expressions of MCM2 and MCM3 correlated highly with cell proliferation in normal and hyperplastic tissues; however, in cancer tissues, the expression was weaker and less strongly linked to proliferation.¹⁷ The reproducibility of these markers, notably MCM6, was not evaluated in either study.

The purpose of this study was to compare the prognostic value and the reproducibility of MCM6 vs. Ki-67 in

endometrial carcinoma. To do so, we correlated their expressions with the corresponding clinicopathological and survival data using a series of endometrioid endometrial adenocarcinoma from our local biobank (see “Materials and methods”). In parallel, we performed *in silico* analyses in a series of uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC) taken from TCGA (The Cancer Genome Atlas) to determine possible correlation between the mRNA levels of these two markers and the clinical parameters. Finally, we investigated in the TCGA cohort the functional pathways associated with MCM6 upregulation.

Materials and methods

Population, clinical data, and tissues

Ninety patients were needed—ten in cases group (deaths) and 80 in control group (alive)—to reach 80% statistical power, with an alpha risk of 5%. These 90 patients were included between the 6th of January 2000 and the 12th of June 2008 in the local clinico-biological tissue bank and retrieved from the files of the Department of Pathology (CHRU, Nancy, France); one case was reclassified into mucinous adenocarcinoma and was thus excluded, resulting in the inclusion of 89 consecutive cases (Table 1).¹⁸

Thirty-eight non-malignant endometrial samples were also retrieved, including normal endometrial tissues in proliferation phase ($n=5$) and in secretory phase ($n=7$), and cases of non-atypical ($n=13$) and atypical ($n=13$) hyperplasia.

The histological diagnosis was checked by a microscope. For the cancer samples under consideration, their histological subtypes and grades based on the criteria of WHO (World Health Organization) classification, myometrial invasion, lymphovascular space, and local and nodal invasions were reviewed by two experienced pathologists. A representative formalin-fixed paraffin-embedded tissue block was selected for each case.

The main clinical data were collected retrospectively from the Department of Gynecological Surgery (CHRU de Nancy, France) and the Department of Radiotherapy (Institut de Cancérologie de Lorraine, France). Tumor, node, metastases (TNM), and FIGO stages were determined. ESMO (European Society for Medical Oncology) risk groups in early-stage endometrial cancer were defined as low-risk group (type 1 histology stage IA grades 1–2 without lymphovascular space invasion), intermediate-risk group (type 1 histology stage IB grade 1–2 without lymphovascular space invasion), and high-risk group (type 1 histology stage IA–IB grade 3 and/or presence of lymphovascular space invasion).^{19, 20}

Table 1 Clinical and histological characteristics

Clinical data (<i>n</i> = 89)	Mean ± SD (standard deviation) or percentage of patients (<i>n</i>)
Age (years)	66.8 ± 11.0
Reproductive period (years)	38.3 ± 4.6
Body mass index (kg/m ²)	29.7 ± 7.7
Hypertension	54.5% (48)
Diabetes	18.2% (16)
Breast carcinoma	11.4% (10)
Mean menopausal age	51.9 ± 3.6
Menopause hormone therapy	20.4% (18)
FIGO stage	
I	79.8% (71)
II	2.2% (2)
III	9% (8)
IV	9% (8)
Histological Grade	
1	43.8% (39)
2	43.8% (39)
3	12.4% (11)
Histological characteristics	
Myometrial invasion ≥ 50%	40.4% (36)
Lymphovascular space invasion	20.2% (18)
Lymph nodes invasion	7.4% (4)
Adjuvant therapy	
Brachytherapy	80.7% (67)
Radiotherapy	21.9% (18)
Chemotherapy	7.1% (5)
Evolution	
Mean period of follow-up (months)	47.5 ± 34.6
Progression	9% (8)
Death	11.2% (10)

FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics

Ethics

The experiments reported here were carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki and in agreement with the French laws on biomedical research (institutional review board number DC2008-459; CNIL declaration number 1209171).

Immunohistochemistry

Paraffin sections (5 µm) were immersed in a 10-mM sodium citrate buffer (pH 6) for 20 min at 97 °C for dewaxing and antigen retrieval. Staining for MCM6 and Ki-67 was achieved using primary anti-MCM6 (1/400; goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and anti-Ki-67 (1/200; mouse monoclonal, MIB-1, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) antibodies. Immunohistochemistry was

performed with Dako Autostainer Plus (Dako) and a Flex + Envision revelation system (Dako). Negative and positive controls were used throughout the experiment.

The LIs of MCM6 and Ki-67 were defined by the percentage of cells showing nuclear expression, counting 500 cells in hot spots.¹³ Clear nuclear marking independent of its intensity was considered sufficient and positive. Scorings were performed independently by two observers (J.H. and M.A.) blinded to the condition and clinical data. Mean values were then calculated. The two observers re-evaluated samples with large discrepancies in ratings (≥ 20%); mean values were taken after re-ratings. Reproducibility calculations were performed based on the initial ratings of all samples. Staining for p53, MSH6, and PMS2 was evaluated with the following primary antibodies: p53 (1/60; mouse monoclonal, DO7, Novocastra, Newcastle, UK), MSH6 (ready-to-use; rabbit monoclonal, EP49, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), and PMS2 (ready-to-use; rabbit monoclonal, EP51, Dako Cytomation). A tumor was scored positive for p53, when the nuclear labeling was moderate to strong in more than 80% of tumor cells^{21–22}; total loss of p53 staining was also rated as present or absent. The expression of MSH6 and PMS2 was considered lost if their nuclear staining in tumor cells was completely absent under the presence of internal positive controls in normal endometrium, stromal cells, or lymphocytes.^{23–24}

Analyses of TCGA data

Data from TCGA UCEC cohort, initially published in Nature, were retrieved using cBioPortal.²⁵ These included clinical information, main molecular features, mRNA Z-scores (RNASeqV2) of both MCM6 and MKI67 (Ki-67), and molecular subgroups (*n* = 373).²⁵ The correlations of Z-score with clinicopathological data were analyzed in 307 cases of endometrioid adenocarcinomas for both MCM6 and Ki67 after excluding serous and clear cell subtypes. In cases with MCM6 mRNA Z-scores greater than 1 (cBioPortal), the significantly enriched mRNAs in these cases were selected (cBioPortal enrichment tool²⁵) for further analyses of their relevant functional pathways using Gene Ontology (GO) database.²⁶

Statistical analysis

Wilcoxon (two modalities) and Kruskal-Wallis tests (more than two modalities) with Dunn's post-test analysis were used for quantitative variables. A *p* value of 0.05 was accepted as significant. Correlation between markers was evaluated by Spearman score. To test the reliability of nuclear scoring between the two examiners, the intra-class correlation coefficient (ICC) was

calculated, with the 95% confidence interval (CI95%). Survival functions were performed with univariate and multivariate proportion hazard test Cox models, the Kaplan-Meier method, and the log-rank test (threshold for quantitative variables: median and 75th percentile). All statistical analyses were performed using the free R software (version 3.2.4) and its additional packages: PMCMR (pairwise multiple comparisons of mean rank sums), survival, and ICC.27–30

Results

Population characteristics

The clinical and histological characteristics of the cases of endometrial adenocarcinoma studied are shown in Table 1. The mean age of the patients at diagnosis is 66.8 years old. The patients presented classical risk factors for endometrial carcinomas, including obesity (43.8%), overweight (18%), hypertension (54.5%), and diabetes (18.2%). The large majority of patients were post-menopausal (80.9%). The distribution of histological grade was 43.8, 43.8, and 12.4% for grade 1, grade 2, and grade 3, respectively. Most tumors were of FIGO stage I (79.8%), and 9% of the patients had metastasis. Myometrial invasion of greater than 50% was found in 40.4% of the cases. Forty-three patients (51.2%) were in low-risk ESMO group, and 19 (22.6%) intermediate-risk group and 22 (26.2%) high-risk group. Lymph node dissection was performed in 54 cases and was positive in four cases (7.4%). Ten (11.2%) women died as a result of endometrial carcinoma.

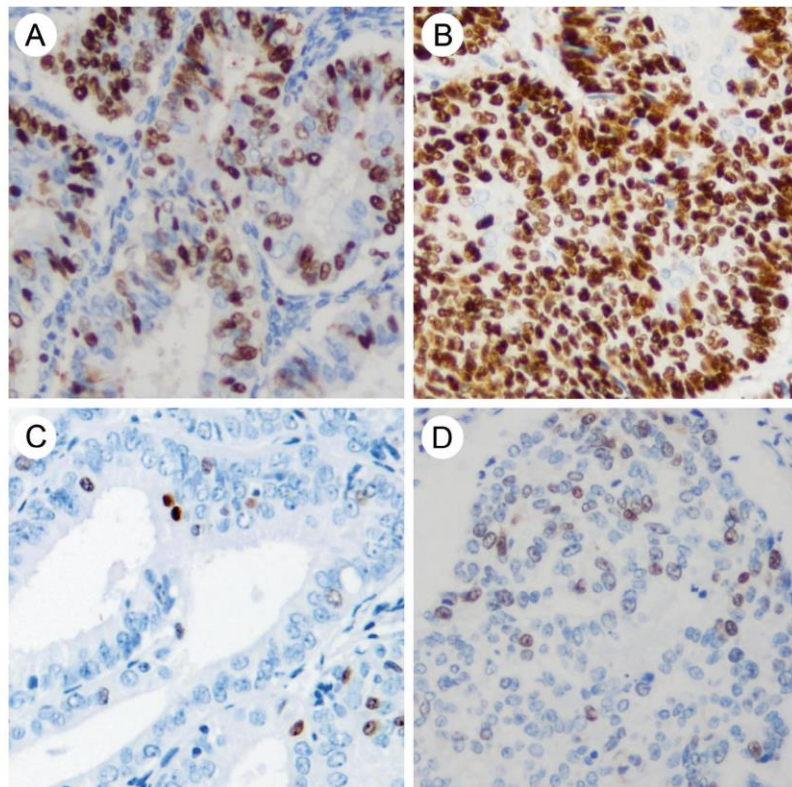
MCM6 and Ki-67 protein expressions in endometrial adenocarcinoma

The LI of MCM6 and Ki-67 in the endometrial endometrioid tumors retrieved were analyzed as described in “Materials and methods.” The distribution of MCM6- and Ki-67-positive cells was relatively heterogeneous, but no relation with any microscopic feature was found, and no significant difference was noticed between the surface and myometrial invasive components. As mentioned in “Materials and methods,” cell counting was performed in the region of the tissue identified to have the greatest nuclear-labeled cell density. The results are detailed in Table 2. The LIs were globally much greater for MCM6 (mean, 72.9%) than for Ki-67 (18.3%). In addition, Ki-67-labeled cells increased moderately with grades (12.3% in grade 1, 19.6% in grade 2, and 23.1% in grade 3, $p < 0.001$; Dunn’s post-test) (Fig. 1). This correlation, however, is less dramatic than that observed for MCM6. The LI of the latter increased much steeply with grade, with 66.7, 75.3, and 81.4% for grade 1, 2, and 3 endometrial endometrioid tumors, respectively ($p < 0.001$; Dunn’s post-test) (Fig. 1). Furthermore, MCM6 expression correlated significantly with the FIGO tumor stage (Kruskal-Wallis test, $p = 0.03$), with a mean expression of 70.7% in stage I vs. 78.8% in stages II/III and 77.4% in stage IV. No significant correlation between Ki-67 expression and FIGO tumor stage was found (Kruskal-Wallis test, $p = 0.06$). Finally, MCM6 LI was significantly associated with ESMO risk, with MCM6 LI of 78.1% in high-risk group vs. 70.4% in intermediate-risk groups and 69.3% in low-risk ($p = 0.01$; Kruskal-Wallis test). Similar correlation was found for Ki-67, however, with lower percentage of labeling in each risk group (19.9% in high-risk group vs. 14.8% in intermediate-risk and 14.6% in low-risk groups, $p = 0.04$; Kruskal-Wallis test).

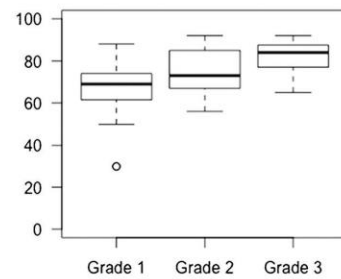
Table 2 MCM6 and Ki-67 mean labeling indexes (LI) according to histologic type, grade, and tumor stage

	N	MCM6		Ki-67	
		Mean LI	p	Mean LI	p
Histological type	89				
Endometrioid adenocarcinoma	89	72.9%		18.3%	
Histological grade	89				
Grade 1	39	66.7%		12.3%	
Grade 2	39	75.3%		19.6%	
Grade 3	11	81.4%	< 0.001	23.1%	< 0.001
FIGO tumor stage	89				
Stage I	71	70.7%		15.7%	
Stages II/III	10	78.8%		22.4%	
Stage IV	8	77.4%	0.03	19.4%	0.06

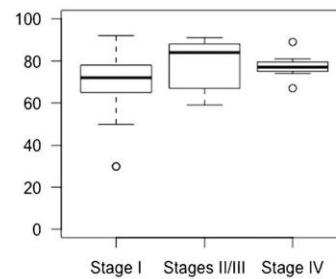
FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics, MCM6 minichromosome maintenance complex component 6, Ki-67 marker of proliferation Ki-67



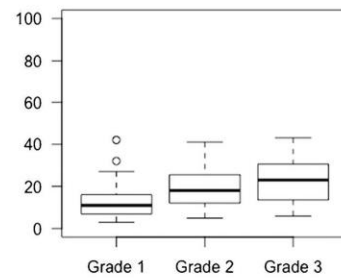
E MCM6 labeling index by histological grade



F MCM6 labeling index by tumor stage



G Ki-67 labeling index by histological grade



H Ki-67 labeling index by tumor stage

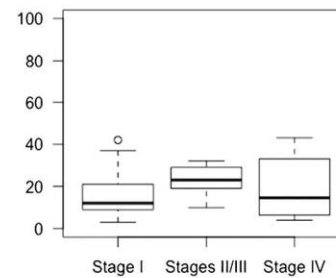


Fig. 1 Marker of proliferation Ki-67 (Ki-67) and minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) immunohistochemical staining. Moderate MCM6 labeling index in a case of grade endometrioid carcinoma (a, $\times 400$ magnification). Strong staining for MCM6 in a grade 3 tumor (b, $\times 400$). Low Ki-67 labeling index in grade 1 (c, $\times 400$) and grade 3 (d, $\times 400$) carcinoma samples. Expression of MCM6 sorted by histological grade (e) ($p < 0.001$) and FIGO stage (f) ($p = 0.03$). Expression of Ki-67, sorted by histological grades (g) ($p < 0.001$) and by FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stage (h) ($p = 0.06$) (boxplots; Kruskal-Wallis tests)

We also performed immunohistochemistry for p53, MSH6, and PMS2. P53 was overexpressed in 10.7% of the cases (9/84). No case showed total negativity for p53. A loss of MSH6 and PMS2 expression was found in 8% (7/88) and 15.9% (14/88) of the cases, respectively. Interestingly, MCM6 LI ($p = 0.003$) was significantly higher in p53-positive tumors, but no such association for Ki-67 LI ($p = 0.23$) (Supplementary Fig. S1). MCM6 LI correlated also significantly with a loss of MSH6 and/or PMS2 ($p = 0.03$), but again no such association was found for Ki-67 ($p = 0.41$) (Supplementary Fig. S2).

Survival analyses

Vaginal extension, myometrial invasion, and FIGO tumor stage all correlated significantly with overall survival (OS, $p < 0.001$; log-rank tests). The presence of metastases was also a significant marker of poor prognosis (OS, $p < 0.001$; log-rank). Histological grade was correlated neither with OS (log-rank test, $p = 0.1$; log-rank) nor with progression-free survival (PFS) ($p = 0.5$; log-rank).

Using log-rank test, higher MCM6 LI correlated significantly with shorter OS ($p = 0.02$) and PFS ($p = 0.02$) (threshold, LI = 73%, median). Using univariate Cox model analysis, for cases with MCM6 LI above the median (73%), it correlated also significantly with OS (hazard ratio (HR) = 4.8 [CI95%, 1.1–22.8], $p = 0.04$) and showed a borderline significance for PFS (HR = 8.0 [CI95%, 1–65], $p = 0.05$). In multivariate Cox regression analysis, in a model combining grade and stage, MCM6 LI did not remain significantly associated with OS ($p = 0.14$). In contrast, Ki-67 LI was correlated neither with OS (log-rank test, $p = 0.79$) nor with PFS (log-rank test, $p = 0.74$) (Fig. 2).

Correlation between markers

The Spearman test showed a strong correlation between MCM6 and Ki-67, with a rho coefficient measured at 0.55 ($p < 0.001$) (Supplementary Fig. S3).

Interobserver reproducibility

The ICC was very good for MCM6 LI, with a value of 0.84 (CI95% [0.83 to 0.91]), as well as for Ki-67 LI (0.84, CI95% [0.77–0.90]).

Benign endometrium

In benign endometrial tissues, we found significantly higher LIs during proliferative phase compared to secretory phase, for Ki-67 (41 vs. 6%, $p = 0.002$) and MCM6 (93 vs. 57%, $p = 0.001$). However, between atypical and non-atypical hyperplasia, the LIs of Ki-67 and MCM6 showed no significant difference (Ki-67, 15 vs. 16%, $p = 0.8$; MCM6, 61 vs. 66% $p = 0.8$). Similarly, no difference in the LI of Ki-67 vs. that of MCM6 was noted between atypical hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma (Ki-67, 12 vs. 11%, $p = 0.46$; MCM6, 61 vs. 69%, $p = 0.43$).

Prognostic value of levels of Ki-67 and MCM6 mRNA in TCGA database and correlation with molecular features

Excluding non-endometrioid subtypes, 307 out of the 373 (82.3%) TCGA multicenter UCEC cohort are endometrioid carcinomas. The mean age of this cohort is 62 years. Among the 307 cases, 231 were FIGO stage classified: stage I (75.4%), 18 stage II (5.8%), 45 stage III (14.6%), 10 stage IV (3.2%), and three with unknown stage (1%). These include 89 (29%) cases of grade 1, 106 (34.5%) of grade 2, and 112 (36.5%) of grade 3.

Upon further analyses of the 307 cases, we identified a positive correlation between the mRNA level of both MCM6 and Ki-67 and the tumor grade (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$ for both). In addition, using Cox model, we found an association between high MCM6 mRNA Z-scores and shorter OS ($p = 0.003$), but not PFS ($p = 0.2$). Equally, with log-rank test, we unveiled an inverse correlation between MCM6 mRNA level above the 75th percentile and OS (log-rank test, $p = 0.04$), but not with PFS (log-rank test, $p = 0.14$) (Supplementary Fig. S4). Interestingly, Ki-67 mRNA Z-score correlated neither with OS ($p = 0.2$) nor with PFS ($p = 0.46$) (univariate Cox model). Regarding the 4 molecular subgroups defined in UCEC TCGA database, MCM6 and Ki-67 mRNA were significantly less expressed in the low copy-number alterations subgroup ($p < 0.001$). There were no differences between the other subgroups ($p = 1$) (Supplementary Fig. S5). Within the low copy-number alteration subgroup, we did not find any significant correlation between MCM6 mRNA expression and OS (log-rank test, $p = 0.68$; Cox model, $p = 0.43$) or PFS (log-rank test, $p = 0.47$; Cox model, $p = 0.86$).

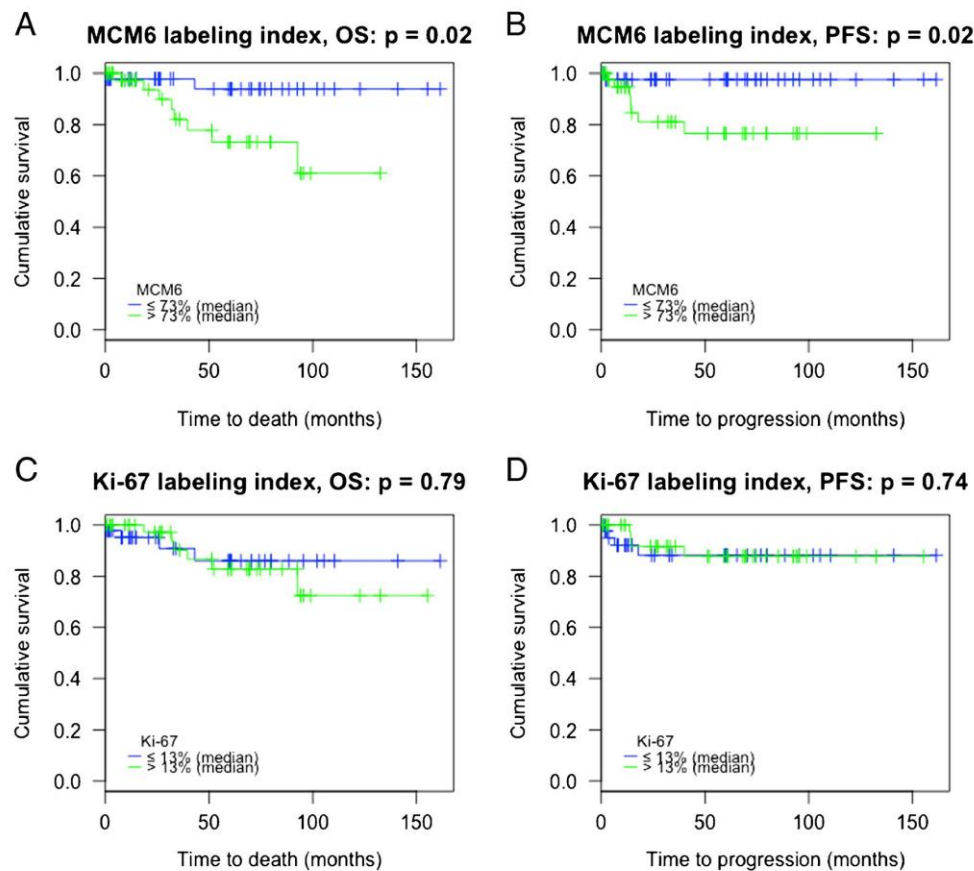


Fig. 2 Survival analyses. Kaplan-Meier curves with log-rank tests. Correlation between minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) immunohistochemical labeling index and overall survival (a) ($p = 0.02$) or progression-free survival (b) ($p = 0.02$)

(threshold, median, 73%). Lack of significant correlation between marker of proliferation Ki-67 (Ki-67) and overall survival (c) ($p = 0.79$) or progression-free survival (d) ($p = 0.74$) (threshold, median, 13%)

We examined further the functional annotations of the genes co-expressed with either MCM6 or Ki-67. In cases with MCM6 Z-score greater than 1, 1783 genes were found upregulated and 2375 downregulated. The most significant functional annotations of the upregulated genes associating with MCM6 overexpression included DNA strand elongation involved in DNA replication ($p = 8.72e-7$), protein localization to chromosome centromeric region ($p = 9.76e-5$), telomere maintenance via recombination ($p = 2.19e-7$), CENP-A containing chromatin organization ($p = 2.48e-9$), tRNA export from nucleus ($p = 2.19e-10$), mitotic chromosome condensation ($p = 4.4e-3$), and DNA replication initiation ($p = 8.94e-11$) (fold enrichment > 8 for all) (Table 3). Functional annotations of the downregulated genes included regulation of cytosolic calcium ion concentration ($p = 2.3e-2$), extracellular matrix organization ($p = 7.41e-3$), G-

protein-coupled receptor signaling pathway ($p = 1.48e-18$), cell-cell adhesion ($p = 1.1e-3$), and inflammatory response ($p = 9.85e-3$) (Table 3).

Discussion

Clinico-pathological prognostic factors in endometrioid type endometrial neoplasm

Endometrioid-type endometrial adenocarcinoma, the most frequent histological type, has good prognosis since a large majority can be diagnosed at an early stage.³¹ Five-year survival rate is about 80% for stage I, but decreases to 30% for stage III and 10% for stage IV.³²

Table 3 Top 10 gene ontology functional annotations associated with the upregulation of MCM6 (sorted by fold enrichment)

GO biological process complete	Fold enrichment	p value
Upregulated in MCM6 overexpressing tumors		
DNA strand elongation involved in DNA replication (GO:0006271)	9.78	8.72E-07
Protein localization to chromosome, centromeric region (GO:0071459)	9.39	9.76E-05
Telomere maintenance via recombination (GO:0000722)	8.72	2.19E-12
DNA strand elongation (GO:0022616)	8.67	3.19E-07
CENP-A containing chromatin organization (GO:0061641)	8.50	2.48E-09
tRNA export from nucleus (GO:0006409)	8.44	2.19E-10
Mitotic chromosome condensation (GO:0007076)	8.38	4.40E-03
DNA replication initiation (GO:0006270)	8.28	8.94E-11
Centromere complex assembly (GO:0034508)	8.15	3.62E-11
Kinetochore organization (GO:0051383)	8.12	2.07E-02
Downregulated in MCM6 overexpressing tumors		
Regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0051480)	< 0.2	2.20E-02
Extracellular matrix organization (GO:0030198)	< 0.2	7.41E-03
Humoral immune response (GO:0006959)	< 0.2	5.14E-04
G-protein coupled receptor signaling pathway (GO:0007186)	0.22	1.48E-18
Leukocyte migration (GO:0050900)	0.23	3.24E-03
Adaptive immune response (GO:0002250)	0.26	2.32E-03
Cell-cell adhesion (GO:0098609)	0.27	1.10E-03
Inflammatory response (GO:0006954)	0.33	9.85E-03
Regulation of ion transport (GO:0043269)	0.35	4.01E-04
Cell surface receptor signaling pathway (GO:0007166)	0.64	1.49E-04

The main prognostic factors are age, operability, histological grade, histological type, degree of myometrial invasion, presence of lymphovascular space invasion, and lymph node invasion.³³ To date, no additional prognostic marker was validated in these tumors.

Significance of MCM6 LI expression vs. Ki-67 LI expression

Ki-67 is a proliferation marker whose prognostic value in endometrial cancer remains unclear. In several studies, a significant association between Ki-67 LI and histological criteria of malignancy and survival was reported,^{6–8} whereas in another no significant correlation was found.⁹ In our study here, Ki-67 correlates indeed with histological grade, but shows no significant correlation with survival. Given the fact that the inter-observer reproducibility is generally good for Ki-67, the variability reported by different groups³⁴ may stem from technical problems like variations in fixation time and antigen-unmasking procedure, but it may also be caused by the relatively low labeling index. As Ki-67 is upregulated in late G1 phase, anti-Ki-67 antibody does not label all proliferating cells, particularly those exiting quiescent G0 for entry into early G1 phase.³⁵ Given that maximum Ki-67-labeled regions in tumor slices may be difficult to locate, differentiating cases of good from those of poor prognosis based on only

few percentage of differences in Ki-67 LI can be a challenging task. This could probably explain the difficulties encountered in using Ki-67 for prognostic purpose in uterine tumors in clinical practice.

MCM, as part of the replicative complex, plays a critical role in initiation of DNA replication.¹² The proliferative index evaluated with anti-MCM6 antibodies correlates highly with that obtained via anti-Ki-67. However, MCM6 is superior marker in that much higher LI can be achieved.^{36–37} Indeed, MCM6 is expressed in the cell cycle much earlier^{38–39} than Ki-67. A couple of studies have analyzed other markers of the MCM complex such as MCM2, MCM3, and MCM7 in endometrial cancers. Li et al. demonstrated a positive correlation between MCM7 expression and histological grade, and an inverse correlation with survival. They also compared MCM7 with Ki-67 and concluded that MCM7 was superior.¹⁶ MCM2 and MCM3, studied by Kato et al., correlated significantly with Ki-67 in normal and hyperplastic tissue, but to a lesser degree, in the cases of endometrial cancer. Paradoxically, these two markers were found expressed at higher level in endometrium during endometrial proliferative phase than in tumor tissue, suggesting the existence of abnormalities in the replication system in endometrial adenocarcinomas.¹⁵ To the best of our knowledge, our study here represents the first evaluation on the expression of MCM6 in endometrial cancer. We found strong correlations

between MCM6 labeling, histological grade, and tumor stage. This overexpression also correlated inversely with overall survival and recurrence-free survival. Our results, using immunohistochemistry on a French cohort, mirror those obtained using *in silico* analyses performed on the database of endometrioid endometrial adenocarcinoma stored in TCGA. On the contrary, no similar correlation on both the grade and survival can be found based on Ki-67 mRNA level reported in the TCGA UCEC cohort. Mechanistic reasons for the absence of correlation for Ki-67 may include alteration in translational efficacy for Ki-67 mRNA.

Correlation of MCM6 and Ki-67 with molecular subgroups

Alteration of certain gene expression may correlate with tumor grade and/or survival. Tumor suppressor gene *TP53* encodes protein p53 essential for cell cycle regulation.⁴⁰ Its mutation is responsible for cell growth stimulation and tumor progression. Mutated p53 is often overexpressed in tumors. Total loss of p53 expression is another pattern of staining that was reported to be associated with TP53 mutation.⁴¹ In higher-grade endometrioid tumors, overexpression of mutated p53 is not only widely observed⁴² but also associated with high histological grades/stages and low survival.^{43–46} In our study, p53 overexpression was found significantly associated with higher MCM6 and Ki-67 expressions. No case showed total negativity for p53. In addition to TP53 mutations, microsatellite instability stemmed from DNA mismatch repair (MMR) as a result of loss of function mutations of MMR regulatory genes, including MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2, is linked to endometrioid cancers as well Lynch syndrome.^{47–48} It is worth noting that MSH6 gene mutations associate most often with familial endometrial cancer and the presence of deficient MMR in endometrioid type endometrial carcinoma is linked to poor prognosis and high tumor grade.^{49–50} In the cohort studied here, we indeed found a positive correlation between MCM6 overexpression and MMR protein deficiency ($p = 0.03$).

Finally, our analyses on the UCEC cohort of TCGA also support the positive correlation between MCM6 expression and tumors with worse prognostic molecular features. Indeed, MCM6 level was higher in POLE, MSI, and high level of copy-number alteration groups than in the low copy number alteration molecular group.²⁵ Our analyses of the TCGA cohort revealed also that tumors with MCM6 overexpression have significant enrichments of mRNAs with functions like DNA replication and elongation, centromere, and mitotic process, supporting thus the roles of MCM6 in cell cycle. Interestingly, the MCM6-enriched tumors expressed significantly less gene functions in matrix organization, cell adhesion, and immune response. Mechanistic studies are needed to understand these original results.²⁶

Clinical perspectives

Our data here support the idea of using the labeling index of proliferation marker MCM6 in addition to the classically used criteria for prognostic determination of endometrioid endometrial carcinoma and for follow-ups on interventions such as surgical and adjuvant therapies. Additionally, as reproducibility is an important factor in the evaluation of a new prognostic marker, we calculated the inter-observer reproducibility of MCM6 by calculating the ICC. Our results indicated that MCM6 is as good as Ki-67 in reproducibility (ICC = 0.84 for both). However, further studies are needed to evaluate the inter-laboratory reproducibility. As MCM6 is a low-cost, easy-to-use, and highly reproducible prognostic marker, it shall be considered as a new prognostic marker for a routine utilization in endometrial endometrioid carcinoma.

Conclusion

This study is the first to assess the prognostic value of MCM6 in endometrial cancer, and the results presented here indicate significant correlations existing between the level of the highly reproducible MCM6 labeling and the tumor grade as well as survival. MCM6, by virtue of its higher expression level, shows comparatively non-ambiguous labeling relative to Ki-67; it thus appears as a good candidate marker for the adoption for routine diagnostic distinction tool and for follow-ups for therapeutic interventions of endometrial adenocarcinoma.

Acknowledgements The authors thank all members of Pathology Departments of CHRU (Nancy) and Institut de Cancérologie de Lorraine (Vandœuvre-lès-Nancy) for their technical support and Ms. Magali LEFEBVRE and Delphine CLABAUT for their advices.

Results are in part generated by the data extracted from the database of TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>.

Compliance with ethical standards The experiments reported here were carried out according to the Declaration of Helsinki principles and in agreement with the French laws on biomedical research (institutional review board n°DC2008-459; CNIL declaration n°1209171).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66(1):7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49(6):1374–1403. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
3. Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, Kline R, Burger RA, Goodman A, Burks RT (2004) Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus

- filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 22(11): 2159–2166. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.184>
4. Thigpen JT, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, DuBeshter B, Burger RA, Liao S (2004) Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 22(19):3902–3908. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.02.088>
 5. Petru E, Lück H-J, Stuart G, Gaffney D, Millan D, Vergote I (2009) Gynecologic cancer intergroup (GCIg) proposals for changes of the current FIGO staging system. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 143(2):69–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.12.015>
 6. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA (1998) Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 4:2779–2785
 7. Gassel AM, Backe J, Krebs S, Schon S, Caffier H, Muller-Hermelink HK (1998) Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long-term outcome. *J Clin Pathol* 51(1):25–29. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.1.25>
 8. Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, Barisic D, Beketic-Oreskovic L (2004) A significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 93(1):34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.12.038>
 9. Chakravarty D, Gupta N, Goda JS, Srinivasan R, Patel FD, Dhaliwal L (2010) Steroid receptors, HER2/neu and Ki-67, in endometrioid type of endometrial carcinoma: correlation with conventional histomorphological features of prognosis. *Acta Histochem* 112(4):355–363. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.03.001>
 10. Tye BK (1999) MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem* 68(1):649–686. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.649>
 11. Ritzi M, Baack M, Musahl C, Romanowski P, Laskey RA, Knippers R (1998) Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem* 273(38):24543–24549. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24543>
 12. Romanowski P, Madine MA (1997) Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: the role of Cdc6p and ORC. *Trends Cell Biol* 7(1):9–10. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)30077-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)30077-4)
 13. Vigouroux C, Casse J-M, Battaglia-Hsu S-F, Brochin L, Luc A, Paris C, Lacomme S, Gueant JL, Vignaud JM, Gauchotte G (2015) Methyl(R217)HuR and MCM6 are inversely correlated and are prognostic markers in non small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 89(2):189–196. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.05.008>
 14. Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, Civit T, Taillandier L, Vignaud JM, Bressenot A (2012) Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol* 36(2):283–291. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318235ee03>
 15. Kato K, Toki T, Shimizu M, Shiozawa T, Fujii S, Nikaido T, Konishi I (2003) Expression of replication-licensing factors MCM2 and MCM3 in normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium: correlation with expression of Ki-67 and estrogen and progesterone receptors. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol* 22(4):334–340. <https://doi.org/10.1097/01.pgp.0000092129.10100.5e>
 16. Li SS, Xue WC, Khoo US, Ngan HYS, Chan KYK, Tam IYS, Chiu PM, Ip PPC, Tam KF, Cheung ANY (2005) Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology* 46(3): 307–313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02069.x>
 17. Sun H, Yan L, Tu R, Zhang Y, Ma L, Tang W, Li L, Chen W, Zhan C, Zang R (2016) Expression profiles of endometrial carcinoma by integrative analysis of TCGA data. *Gynecol Obstet Investig* 82(1): 30–38. <https://doi.org/10.1159/000445073>
 18. Agopianz M, Forgez P, Casse J-M, Lacomme S, Charra-Brunaud C, Clerc-Urmès I, Morel O, Bonnet C, Gueant JL, Vignaud JM, Gompel A, Gauchotte G (2017) Expression of neurotensin receptor 1 in endometrial adenocarcinoma is correlated with histological grade and clinical outcome. *Virchows Arch* 471(4):521–530. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2215-y>
 19. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, Marth C, Nout R, Querleu D, Mirza MR, Sessa C, ESMO-ESGO-ESTRO Endometrial Consensus Conference Working Group (2016) ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Int J Gynecol Cancer* 26(1):2–30. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000609>
 20. Ouldamer L, Bendifallah S, Body G et al (2017) Call for surgical nodal staging in women with ESMO/ESGO/ESTRO high-intermediate risk endometrial cancer: a multicentre cohort analysis from the FRANCOGYN study group. *Ann Surg Oncol* 24(6): 1660–1666. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5731-0>
 21. Alkushi A, Lim P, Coldman A, Huntsman D, Miller D, Gilks CB (2004) Interpretation of p53 immunoreactivity in endometrial carcinoma: establishing a clinically relevant cut-off level. *Int J Gynecol Pathol* 23(2):129–137. <https://doi.org/10.1097/00004347-200404000-00007>
 22. Alvarez T, Miller E, Duska L, Oliva E (2012) Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma? *Am J Surg Pathol* 36(5):753–761. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318247b7bb>
 23. Orbo A, Nilsen MN, Ames MS et al (2003) Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol* 22:141–148
 24. Djordjevic B, Barkoh BA, Luthra R, Broadus RR (2013) Relationship between PTEN, DNA mismatch repair, and tumor histotype in endometrial carcinoma: retained positive expression of PTEN preferentially identifies sporadic non-endometrioid carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 26(10):1401–1412. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.67>
 25. Network CGAR, Kandoth C, Schultz N et al (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497(7447):67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>
 26. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet* 25(1):25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
 27. Core Team R (2015) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
 28. Therneau T (2015) *_A* package for survival analysis in S_ version 2.38
 29. Pohlert T (2014) The Pariwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package
 30. Wolak ME, Fairbairn DJ, Paulsen YR (2012) Guidelines for estimating repeatability. *Methods Ecol Evol* 3(1):129–137. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00125.x>
 31. Sorosky JI (2008) Endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 111(2, Part 1):436–447. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318162f690>
 32. Narducci F, Lambaudie E, Sonoda Y, Papageorgiou T, Tafie S, Cabaret V, Castelain B, Leblanc E, Querleu D (2003) Endometrial

- cancer: what's new? *Gynecol Obstet Fertil* 31(7-8):581–596. [https://doi.org/10.1016/S1297-9589\(03\)00173-5](https://doi.org/10.1016/S1297-9589(03)00173-5)
33. Soslow RA, Bissonnette JP, Wilton A, Ferguson SE, Alektiar KM, Duska LR, Oliva E (2007) Clinicopathologic analysis of 187 high-grade endometrial carcinomas of different histologic subtypes: similar outcomes belie distinctive biologic differences. *Am J Surg Pathol* 31(7):979–987. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31802ee494>
 34. Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rüdiger T, Müller-Hermelink HK, Kreipe H (2002) Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol* 198(3):292–299. <https://doi.org/10.1002/path.1218>
 35. Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R et al (1989) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 92(Pt 4):531–540
 36. Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Bird K, Vowler SL, Coleman N (2006) Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia. *Br J Cancer* 95(3):314–321. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603262>
 37. Scott IS, Morris LS, Bird K, Davies RJ, Vowler SL, Rushbrook SM, Marshall AE, Laskey RA, Miller R, Arends MJ, Coleman N (2003) A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol* 201(2):187–197. <https://doi.org/10.1002/path.1444>
 38. Kingsbury SR, Loddio M, Fanshawe T, Obermann EC, Prevost AT, Stoeber K, Williams GH (2005) Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells. *Exp Cell Res* 309(1):56–67. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.05.027>
 39. Eward KL, Obermann EC, Shreeram S et al (2004) DNA replication licensing in somatic and germ cells. *J Cell Sci* 117(24):5875–5886. <https://doi.org/10.1242/jcs.01503>
 40. Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351(6326):453–456. <https://doi.org/10.1038/351453a0>
 41. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, Kurman RJ (2011) Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 24(9):1248–1253. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.85>
 42. Schultheis AM, Martelotto LG, De Filippo MR, Piscuglio S, Ng CKY, Hussein YR, Reis-Filho JS, Soslow RA, Weigelt B (2016) TP53 mutational spectrum in endometrioid and serous endometrial cancers. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol* 35(4):289–300. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000243>
 43. Kohler MF, Carney P, Dodge R, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Marks JR, Berchuck A (1996) p53 overexpression in advanced-stage endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 175(5):1246–1252. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(96\)70036-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(96)70036-4)
 44. Kohlberger P, Gitsch G, Loesch A, Tempfer C, Kaider A, Reinthaller A, Kainz C, Breitenacker G (1996) p53 protein overexpression in early stage endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 62(2):213–217. <https://doi.org/10.1006/gyno.1996.0218>
 45. Ozalp S, Yalcin OT, Tanir HM, Kabukcuoglu S, Erol G (2003) p53 overexpression as a prognostic indicator in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 24(3-4):275–278
 46. Kudela M, Pilka R, Lubusky M, Hejtmánek P, Dzubak P, Brychtova S (2012) Prognostic importance of selected molecular immunohistochemical markers and DNA ploidy in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 33(2):159–163
 47. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 17(3):271–272. <https://doi.org/10.1038/ng1197-271>
 48. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Weit YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Dunlop MG, Hamilton SR, Petersen GM, de la Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW (1994) Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371(6492):75–80. <https://doi.org/10.1038/371075a0>
 49. An HJ, Kim KI, Kim JY, Shim JY, Kang H, Kim TH, Kim JK, Jeong JK, Lee SY, Kim SJ (2007) Microsatellite instability in endometrioid type endometrial adenocarcinoma is associated with poor prognostic indicators. *Am J Surg Pathol* 31(6):846–853. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213423.30880.ac>
 50. Nelson GS, Pink A, Lee S, Han G, Morris D, Ogilvie T, Duggan MA, Köbel M (2013) MMR deficiency is common in high-grade endometrioid carcinomas and is associated with an unfavorable outcome. *Gynecol Oncol* 131(2):309–314. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.003>

Annexe 2 : Publications scientifiques du candidat (Pubmed 01/04/2018)

1. Hotton J, **Agopianz M**, Leroux A, Charra-Brunaud C, Marie B, Busby-Venner H, Morel O, Guéant JL, Vignaud JM, Battaglia-Hsu SF, Gauchotte G. Minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) expression correlates with histological grade and survival in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2017 Dec 14. doi: 10.1007/s00428-017-2278-9. [Epub ahead of print] PMID: 29243125
2. Cordary D, Braconier A, Guillet-May F, Morel O, **Agopianz M**, Callec R. Immobilization versus immediate mobilization after intrauterine insemination: a systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2017 Sep 27. pii: S2468-7847(17)30187-3. doi: 10.1016/j.jogoh.2017.09.005. [Epub ahead of print] Review. PMID: 28964965
3. **Agopianz M**, Forgez P, Casse JM, Lacomme S, Charra-Brunaud C, Clerc-Urmès I, Morel O, Bonnet C, Guéant JL, Vignaud JM, Gompel A, Gauchotte G. Expression of neurotensin receptor 1 in endometrial adenocarcinoma is correlated with histological grade and clinical outcome. *Virchows Arch*. 2017 Aug 24. doi: 10.1007/s00428-017-2215-y. [Epub ahead of print] PMID: 28836043
4. Liu J, **Agopianz M**, Poupon J, Wu Z, Just PA, Borghese B, Ségal-Bendirdjian E, Gauchotte G, Gompel A, Forgez P. Neurotensin receptor 1 antagonist SR48692 improves response to carboplatin by enhancing apoptosis and inhibiting drug efflux in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug 8. pii: clincanres.0861.2017. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0861. [Epub ahead of print] PMID: 28790113
5. Minebois H, De Souza A, Mezan de Malartic C, **Agopianz M**, Guillet May F, Morel O, Callec R. [Endometriosis and miscarriage: Systematic review]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. 2017 Jul 13. pii: S2468-7189(17)30153-8. doi: 10.1016/j.gofs.2017.06.003. [Epub ahead of print] French. PMID: 28712793
6. **Agopianz M**, Xandre-Rodriguez L, Jin B, Urbistondoy G, Ialy-Radio C, Chalbi M, Wolf JP, Ziyat A, Lefèvre B. Growth arrest specific 1 (Gas1) and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor $\alpha 1$ (Gfra1), two mouse oocyte glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, are involved in fertilisation. *Reprod Fertil Dev*. 2017 Apr;29(4):824-837. doi: 10.1071/RD15367. PMID: 28442042
7. Faivre JC, Bibault JE, Leroy T, **Agopianz M**, Salleron J, Wack M, Janoray G, Roché H, Culine S, Rivera S. Evaluation of the Theoretical Teaching of Postgraduate Radiation Oncology Medical Residents in France: a Cross-Sectional Study. *J Cancer Educ*. 2017 Jan 30. doi: 10.1007/s13187-017-1170-2. [Epub ahead of print] PMID: 28138918
8. **Agopianz M**, Journeau P, Lebon-Labich B, Sorlin A, Cuny T, Weryha G, Leheup B. McCune-Albright syndrome, natural history and multidisciplinary management in a series of 14 pediatric cases. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016 Feb;77(1):7-13. doi: 10.1016/j.ando.2016.01.002. Epub 2016 Feb 2. PMID: 26850292
9. **Agopianz M**, Elhanbali O, Demore B, Cuny T, Demarquet L, Ndiaye C, Barbe F, Brunaud L, Weryha G, Klein M. Thyroid side effects prophylaxis in front of nuclear power plant accidents. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016 Feb;77(1):1-6. doi: 10.1016/j.ando.2015.12.003. Epub 2016 Jan 29. Review. PMID: 26830953
10. Faivre JC, **Agopianz M**, Loeb E, Cassinari K, Wack M, Catoire P, Braun M, Thilly N, Coudane H. [Evaluation of the theoretical teaching of postgraduate medical students in France]. *Rev Med Interne*. 2015 Sep;36(9):579-87. doi: 10.1016/j.revmed.2015.02.009. Epub 2015 May 14. PMID: 25980929
11. **Agopianz M**, Scheffler F, Faivre JC, Bonne S, Catoire P, Weryha G, Gompel A. [Evaluation of theoretical teaching of the French diploma of medical gynecology]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2015 Jan;43(1):25-32. doi: 10.1016/j.gyobfe.2014.11.006. Epub 2014 Nov 8. PMID: 25487011
12. Collet A, Chatelin J, **Agopianz M**, Valduga M, Bonnet C, Allou L, Lambert L, Gospodaru RN, Weryha G, Jonveaux P. [An adult patient with 49, XXXXY syndrome: further clinical and biological delineation]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014 May-Jun;72(3):371-7. doi: 10.1684/abc.2014.0954. PMID: 24876149 Free Article
13. **Agopianz M**, Corbonnois P, Sorlin A, Bonnet C, Klein M, Hubert N, Pascal-Vigneron V, Jonveaux P, Cuny T, Leheup B, Weryha G. Endocrine disorders in Woodhouse-Sakati syndrome: a systematic review of the literature. *J Endocrinol Invest*. 2014 Jan;37(1):1-7. doi: 10.1007/s40618-013-0001-5. Epub 2014 Jan 8. Review. PMID: 24464444

14. Le Chatton M, Zaccabri A, **Agopiantz M**, Leheup B, Weryha G, Foliguet B. [Azoospermia and 45,X/46,XY chromosomal mosaicism: a case report]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013 Mar;41(3):203-6. doi: 10.1016/j.gyobfe.2013.01.007. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23498728
15. **Agopiantz M**, Birène B, Scheffler F. [Demographic status and perspectives in medical gynecology in France in 2012]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013 Mar;41(3):201-2. doi: 10.1016/j.gyobfe.2013.01.008. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23498727
16. Scheffler F, **Agopiantz M**, Le Chatton M, Swierkowski-Blanchard N. [Focusing on young medical gynecologists future in 2012]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013 Mar;41(3):208-10. doi: 10.1016/j.gyobfe.2013.01.006. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23477779
17. Coussy F, **Agopiantz M**. [Medical gynaecology in France: a specific training program]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2010 Mar;38(3):230-1. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.01.004. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20189437

Annexe 3 : Communications connexes

- Agopiantz M, Gauchotte G, Charra-Brunaud C, Vignaud JM, Forgez P, Gompel A. Implication de la Neurotensine et de son récepteur de type 1 dans la progression des carcinomes de l'endomètre. Communication orale au Congrès de la Société française de Pathologie (Paris, 2016)
- Hotton J, Agopiantz M, Gauchotte G. MCM6, un nouveau marqueur pronostique dans les adénocarcinomes endométrioïdes de l'endomètre. Communication orale au Congrès du CNGOF (Montpellier, 2016)
- Agopiantz M, Gauchotte G, Baumann C, Charra-Brunaud C, Vignaud JM, Morel O, Weryha G, Forgez P, Gompel A. Implication de la Neurotensine et de son récepteur de type 1 dans la progression des carcinomes de l'endomètre. Communication orale au Congrès du Collège national de MBDR (Paris, 2014)

RESUME : Le récepteur de haute affinité 1 (NTSR1) et son agoniste, la neurotensine (NTS), sont corrélés avec l'agressivité tumorale dans la plupart des tumeurs solides, y compris les cancers hormono-dépendants. Comme l'endomètre et l'ovaire sont également soumis à une régulation hormonale, nous avons évalué la contribution de NTS/NTSR1 à la carcinogenèse de l'endomètre et de l'ovaire. L'expression du récepteur de la neurotensine 1 (NTSR1) et la méthylation du promoteur NTSR1 (HM450) ont été analysées dans 385 cas de carcinome de l'endomètre du Cancer Genome Atlas (TCGA). De plus, à partir d'une série de 100 carcinomes de l'endomètre et de 66 échantillons d'endomètre bénin, l'expression de NTS et NTSR1 a été évaluée par immunohistochimie. La série TCGA d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade et une série de 46 tissus ovariens ont également été analysés. Dans la série TCGA de carcinomes de l'endomètre, le taux d'ARN messager de NTSR1 (ARNm) était négativement corrélé avec la survie globale (SG) et la survie sans progression (SSP) ($p = 0,0012$ et $p = 0,0116$, respectivement), et positivement corrélé avec le grade ($p = 0,0008$). En incluant seulement les carcinomes endométrioïdes, le niveau d'ARNm de NTSR1 était également négativement corrélé avec la SG (log-rank: $p < 0,0001$) et la SSP (log-rank: $p = 0,002$). Une forte expression d'ARNm de NTSR1 était significativement associée à une perte de méthylation du promoteur NTSR1. L'expression immunohistochimique de NTS et NTSR1 était significativement augmentée dans l'adénocarcinome ($n = 100$), par rapport à l'endomètre bénin ($p < 0,001$). L'expression de NTSR1 était positivement corrélée avec le grade ($p = 0,004$). Une forte expression du NTSR1 cytoplasmique était significativement corrélée avec une SG et une SSP plus courtes ($p < 0,001$ et $p = 0,001$, respectivement). Cette corrélation restait significative en excluant les sous-types non-endométrioïdes ($p = 0,04$ et $p = 0,02$, respectivement). En analyse multivariée, l'expression de NTSR1 était un facteur de mauvais pronostic indépendant ($p = 0,004$). Nos résultats indiquent également la présence d'une corrélation positive entre l'expression du marqueur de prolifération MCM6 et le grade histologique dans le sous-type endométrioïde (grade I, 66,7 %, grade II, 75,3 %, grade III, 81,4 %, $p < 0,001$) et une corrélation inverse à la SG et à la SSP ($p = 0,02$ pour les deux). Dans la cohorte TCGA, les analyses de Cox univariées et multivariées ($p = 0,003$ et $p = 0,03$, respectivement) ont révélé que les z-scores élevés de l'ARNm de MCM6 étaient associés à une SG réduite. Ces associations étaient absentes pour Ki-67. Il n'y avait pas de corrélation significative entre NTSR1 et MCM6 ou Ki-67. Dans l'adénocarcinome de l'ovaire, la NTS et NTSR1 ont été détectés dans 72 % et 74 % des cancers de l'ovaire, respectivement. En outre, dans la grande série d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade, l'ARNm de NTSR1 s'est avéré être en corrélation avec des stades plus élevés et la résistance au platine ($p = 0,02$). Ceci est concordant avec les résultats expérimentaux montrant que l'antagoniste très spécifique de NTSR1, le SR48692, a augmenté la réponse au carboplatine dans les cellules cancéreuses de l'ovaire et les tumeurs expérimentales induites. Lorsque le SR48692 est combiné avec du carboplatine, une augmentation majeure des dommages à l'ADN induits par le platine et de la mort cellulaire, ainsi qu'une diminution de la croissance tumorale, a été notée. La surexpression de NTSR1 est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers de l'endomètre et de l'ovaire, mettant en évidence la contribution de NTS dans la progression du cancer et ses utilisations en tant que marqueur pronostique, et en tant que cible thérapeutique potentielle. L'ajout d'un inhibiteur de NTSR1 en association avec une thérapie à base de sel de platine pourrait améliorer la réponse au traitement.

MOTS CLES : adénoarcinome de l'endomètre, cancer de l'ovaire, endomètre, neurotensine, NTSR1, immunohistochimie, prolifération, MCM6.

SUMMARY: The high affinity receptor 1 (NTSR1) and its agonist, neurotensin (NTS), are correlated with tumor cell aggressiveness in most solid tumors, including hormone-dependent cancers. As the endometrium and ovary are also subjected to hormonal regulation, we evaluated the contribution of NTS to endometrial and ovarian carcinogenesis. Neurotensin receptor 1 (NTSR1) expression and NTSR1 promoter methylation (HM450) were analyzed in 385 cases of endometrial carcinoma from The Cancer Genome Atlas (TCGA). Additionally, from a series of 100 endometrial carcinomas, and 66 benign endometrium samples, NTS and NTSR1 labeling was evaluated by immunohistochemistry. The TCGA series for ovarian high-grade serous adenocarcinoma and a series of 46 ovarian tissues were also analyzed. Using TCGA series, NTSR1 messenger RNA (mRNA) level was negatively correlated with overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) ($p = 0.0012$ and $p = 0.0116$, respectively), and positively correlated with the grade ($p = 0.0008$). When including only endometrioid carcinomas, NTSR1 mRNA level continued to be negatively correlated with OS (log-rank: $p < 0.0001$) and PFS (log-rank: $p = 0.002$). A higher NTSR1 mRNA level was significantly associated with a loss of NTSR1 promoter methylation. Immunohistochemical expression of NTS and NTSR1 was significantly increased in adenocarcinoma ($n = 100$), as compared to benign endometrium ($p < 0.001$). NTSR1 expression was positively correlated with grade ($p = 0.004$). High immunohistochemical expression of cytoplasmic NTSR1 was significantly correlated with a shorter OS and PFS ($p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively). This correlation remained significant when excluding non-endometrioid subtypes ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). In multivariate analysis, the expression of NTSR1 was an independent prognostic factor ($p = 0.004$). Our evidence indicated also the presence of a positive correlation between expression of proliferation marker, MCM6 and the histological grade of endometrioid endometrial adenocarcinoma (grade I, 66.7 %; grade II, 75.3 %; grade III, 81.4 %; $p < 0.001$) and an inverse correlation with OS and PFS ($p = 0.02$ for both). For in silico analyses of the TCGA cohort, both univariate and multivariate Cox analyses ($p = 0.003$ and $p = 0.03$, respectively) revealed high MCM6 mRNA Z-scores associated with reduced OS. These associations were absent for Ki-67. No significant correlation between NTSR1 and MCM6 or Ki-67 was found. In ovarian adenocarcinoma, NTS and NTSR1 were detected in 72 % and 74 % of ovarian cancer, respectively. Furthermore, in a large series of high-grade ovarian cancer, NTSR1 mRNA was shown to correlate with higher stages and platinum resistance ($p = 0.02$). This correlates with experimental results showing the very specific NTSR1 antagonist, SR48692, enhanced the response to carboplatin in ovarian cancer cells and experimental tumors. When SR48692 is combined with carboplatin, a major improvement of platinum-induced DNA damage and cell death, as well as a decrease in tumor growth, was noted. NTSR1 overexpression is a poor prognostic factor in endometrial and ovarian cancer, highlighting the contribution of NTS in cancer progression and its uses as a prognostic marker, and as a potential therapeutic target. The addition of NTSR1 inhibitor in combination with platinum salt-based therapy could improve the response to the drug.

KEYWORDS: endometrial adenocarcinoma, ovarian cancer, endometrium, neurotensin, NTSR1, immunohistochemistry, proliferation, MCM6.