

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2018

N° 2018-76

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES de Génétique Médicale

par

Jessica LE GALL

Née le 19 octobre 1989 à Chartres

Présentée et soutenue publiquement le 26 juin 2018

**Etude de la méthylation du promoteur de *BRCA1* sur 126 tumeurs ovariennes
au CHU de Nantes**

Président du Jury : Monsieur le Professeur Marc DENIS

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU

Membres du jury : Madame le Professeur Céline BOSSARD
Madame le Docteur Capucine DELNATTE

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury :

Monsieur le Professeur Stéphane BEZIEAU,

Vous avez participé à ma formation médicale et à l'élaboration de ce travail de thèse. Pour votre gentillesse, vos conseils et votre disponibilité, soyez assuré de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Marc DENIS,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. Acceptez pour cela mes plus sincères remerciements.

Madame le Professeur Céline BOSSARD,

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur Capucine DELNATTE,

Vous avez participé à ma formation médicale et me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier ma famille et en premier lieu mes parents, qui m'ont soutenue pendant ses onze années, m'ont toujours accompagnée et encouragée dans mes choix. Je remercie également ma sœur Déborah, pour son soutien, sa présence et sa disponibilité depuis près de 28 ans, ainsi que Delphine. Je remercie également ma grand-mère, pour son soutien et son écoute. Merci également à toute ma famille, oncles, tantes, marraine, cousins et cousines, avec une pensée particulière pour Kévin qui a toujours répondu présent pour des sorties nantaises.

Je remercie Geoffroy pour son soutien, son écoute et son attention.

Ce parcours a été fait de nombreuses rencontres dès les premières années d'étude, je remercie tout particulièrement la B****h team tourangelle (Momo, Kuk, Adie, Adé, Marie, Coco et Alice) qui ont toujours été présentes dans les moments de révisions, de stress, et qui par leur bonne humeur et leurs rires ont réussi à marquer ces années de souvenirs mémorables.

Le premier semestre d'internat a la réputation d'être celui au cours duquel on rencontre les personnes qui vont nous accompagner tout au long de l'internat, cet adage s'est confirmé à La Roche sur Yon, je remercie tout particulièrement Marie, Marie-Cha, Sophie ainsi que tous les autres pour leur bonne humeur et leur présence tout au long de cet internat. Et un merci tout particulier à JIG et au Maître qui ont répondu présents à toutes nos soirées sans jamais nous décevoir.

Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontré au cours de mes stages (secrétaires, techniciens, ingénieurs, psychologues, médecins...). Merci pour vos précieux conseils, votre écoute, votre patience et surtout votre bonne humeur. Avec une pensée particulière pour l'équipe d'oncogénétique qui m'a supportée pendant un an, et l'équipe « Blind Test » pour ces soirées mémorables.

Enfin, je tiens à remercier Valérie qui m'a appris la technique de pyroséquençage, et sans qui la réalisation de ce travail aurait été compromise. Et Sandrine pour la relecture de ce manuscrit.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	3
Table des figures.....	6
Table des tableaux.....	7
Liste des abréviations	8
Introduction.....	9
I. Le cancer de l’ovaire.....	9
A. Anatomie	9
B. Epidémiologie.....	9
C. Anatomopathologie des tumeurs ovariennes.....	12
1) Histologie.....	12
a) Les tumeurs épithéliales.....	12
i) Les tumeurs épithéliales malignes	12
ii) Les tumeurs borderlines.....	13
b) Tumeurs non épithéliales	13
2) Origine des cancers épithéliaux ovariens.....	13
3) Stade des tumeurs ovariennes	15
4) Grade des carcinomes ovariens séreux.....	15
a) Carcinomes séreux de bas grade	15
b) Carcinomes séreux de haut grade	16
D. Facteurs de risque	16
1) Prédisposition génétique.....	16
2) Facteurs hormonaux.....	16
3) Autres facteurs de risque associé au cancer de l’ovaire	17
E. Pronostic.....	17
II. Prédisposition génétique aux cancers de l’ovaire.....	18
A. Les gènes <i>BRCA</i>	18
1) Structure et rôle des gènes <i>BRCA</i>	18
2) Spectre tumoral.....	20
a) Prédisposition au cancer du sein.....	20
b) Prédisposition aux cancers de l’ovaire	20
c) Autres cancers	21

3) Caractéristiques des tumeurs.....	22
a) Caractéristiques histologiques	22
b) Caractéristiques pronostiques	22
4) Rôle des protéines BRCA dans la réparation des cassures double brins de l'ADN	22
a) Cassures doubles brin de l'ADN	22
b) Recombinaison homologue.....	24
5) Anomalies au niveau moléculaire	27
a) Modèle de Knudson	27
b) Événement dans les tumeurs ovariennes avec atteinte de <i>BRCA1</i>	28
i) Variants pathogènes.....	28
ii) Perte d'hétérozygotie.....	29
iii) Méthylation du promoteur	29
B. Autres gènes impliqués dans les cancers de l'ovaire	31
1) Gènes impliqués dans la recombinaison homologue.....	32
2) Syndrome de Lynch	32
III. Prise en charge thérapeutique	33
A. Chirurgie	33
B. Chimiothérapie.....	33
C. Les inhibiteurs de PARP	34
1) Rôle des protéines PARP	34
2) Concept de létalité synthétique	34
3) Essais cliniques	35
4) Obtention de l'autorisation de mise sur le marché	36
IV. Recherche de mutations dans les gènes <i>BRCA</i> dans le cancer de l'ovaire.....	36
V. Objectif de l'étude.....	37
Matériel et méthodes.....	38
I. Choix de la méthode d'étude de la méthylation.....	38
A. Pyroséquençage	38
B. Sélection des îlots CpG du promoteur de <i>BRCA1</i> à analyser.....	38
II. Patientes.....	39
III. Estimation du pourcentage tumoral	39
IV. Contrôles positifs et négatifs.....	39
V. Extraction de l'ADN tumoral	40
VI. Traitement au bisulfite	40
VII. Réaction de PCR	40
VIII. Pyroséquençage	42

IX.	Analyse bio-informatique des résultats	44
X.	Etude de la perte d'hétérozygotie.....	44
	Résultats.....	46
I.	Population étudiée :	46
A.	Origine des prélèvements	46
B.	Age au diagnostic	47
C.	Anatomopathologie.....	47
1)	Localisation du prélèvement	47
2)	Type histologique	48
D.	Prélèvement réalisé avant ou après chimiothérapie	48
II.	Méthylation du promoteur de <i>BRCA</i>	48
A.	Pyrogrammes obtenus selon le statut méthylé ou non	48
1)	Première région cible	48
2)	Deuxième région cible.....	49
B.	Résultats obtenus dans les échantillons tumoraux.....	50
	Discussion.....	53
I.	La méthylation du promoteur de <i>BRCA1</i> comme biomarqueur pronostique et thérapeutique	53
II.	Elargissement de l'analyse de la méthylation en routine, place de l'immunohistochimie.....	53
III.	Traitements et cancer de l'ovaire, vers de nouvelles associations de thérapies.....	54
IV.	Mise en doute de l'efficacité des inhibiteurs de PARP sur les cancers ovariens avec méthylation du promoteur de <i>BRCA1</i>	54
V.	Essais cliniques	55
VI.	Extension de ces thérapies aux tumeurs présentant une altération de la recombinaison homologue	55
VII.	Autres traitements efficaces sur les tumeurs BRCAness.....	55
	Conclusion	57
	Bibliographie	58

Table des figures

Figure 1: Représentation et anatomie des ovaires	9
Figure 2: Incidence et mortalité des cancers en 2012, chez les femmes, dans le monde	10
Figure 3: Incidence et mortalité des cancers chez la femme en France métropolitaine en 2012, d'après GLOBOCAN	11
Figure 4: Évolution du nombre de nouveaux cas et de décès de cancer de l'ovaire et des taux standardisés mondiaux correspondants de 1997 à 2017 en France métropolitaine	11
Figure 5: Illustration du développement tumoral à partir de l'épithélium ovarien.....	14
Figure 6: Illustration du développement tumoral à partir des cellules épithéliales tubaires.....	14
Figure 7: classification FIGO 2014 des tumeurs épithéliales de l'ovaire.....	15
Figure 8: Structure et principaux domaines des protéines BRCA1 et BRCA2	19
Figure 9: Types de réparation de cassures doubles brins de l'ADN	24
Figure 10: Etapes de la recombinaison homologue	26
Figure 11: Principaux acteurs de la recombinaison homologue.	27
Figure 12: Modèle de Knudson dans le rétinoblastome	28
Figure 13: méthylation d'une cytosine.....	30
Figure 14: Représentation d'un îlot CpG dans la région promotrice d'un gène suppresseur de tumeur, dans des cellules normales et tumorales	30
Figure 15: variants pathogènes constitutionnels retrouvés dans les carcinomes ovariens, tubaires et péritonéaux chez 360 patientes.....	32
Figure 16: concept de létalité synthétique des inhibiteurs de PARP	35
Figure 17: schéma thérapeutique des femmes porteuses d'un cancer de l'ovaire	36
Figure 18: localisation de la région promotrice du gène <i>BRCA1</i> analysée et des CpG étudiés.....	38
Figure 19: Traitement au bisulfite	40
Figure 20: principe de la PCR.....	41
Figure 21: étapes 1 à 3 du pyroséquençage.....	42
Figure 22: étape 4 du pyroséquençage	43
Figure 23: étape 5 du pyroséquençage	43
Figure 24: étape 6 du pyroséquençage	43
Figure 25: comparaison du pyrogramme selon le statut méthylé ou non du CpG	44
Figure 26: résultats du séquençage des gènes <i>BRCA1/2</i>	46
Figure 27: pyrogrammes de la première région étudiée	49
Figure 28: pyrogramme de la deuxième région étudiée.....	50

Table des tableaux

Tableau 1: risque cumulé de cancer du sein à 70 ans, intervalle de confiance 95%	20
Tableau 2: risque cumulé de cancer de l'ovaire à 70 ans, intervalle de confiance 95%	21
Tableau 3: pourcentage de tumeurs ovariennes présentant une méthylation du promoteur de BRCA1 dans la littérature	31
Tableau 4: témoins négatifs étudiés et pathologies expliquant l'ovariectomie chez ces patientes.....	39
Tableau 5: Amorces utilisées pour le pyroséquençage	41
Tableau 6: provenance des échantillons	47
Tableau 7: sites de prélèvement de l'échantillon tumoral	47
Tableau 8: caractéristiques histologiques des tumeurs analysées	48
Tableau 9: Taux de méthylation des échantillons méthylés	51
Tableau 10: caractéristiques histologiques des tumeurs méthylées	51
Tableau 11: Analyse de la perte d'hétérozygotie dans les tumeurs méthylées	52

Liste des abréviations

AMM: Autorisation de mise sur le marché

BER: Base Excision Repair

BIR: Break-Induced Replication

BRCT: *BRCA1* C Terminus

CDB: Cassure Double Brin

DNMT: ADN MéthylTranferases

DSBR: double-strand break repair

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FIGO: International Federation of gynecology and Obstetrics

HR: Homologous Recombination

InVS: Institut de Veille Sanitaire

MRN: Mre11-Rad50-Nbs1

NES: Nuclear Export Signal

NHEJ: Non Homologous End Joining

NLS: Nuclear Localisation Signal

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PARP: Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1

RPA: Replication Protein A

SDSA: Synthesis-Dependant Strand Annealing

TSS: Transcription Start Site

VEGF: Vascular endothelial growth factor)

Introduction

I. Le cancer de l'ovaire

A. Anatomie

Les ovaires, au nombre de deux chez la femme, font partie des annexes de l'utérus avec les trompes de Fallope. Ce sont les gonades féminines, glandes exocrines produisant les ovules, mais également endocrines sécrétant les hormones sexuelles (œstrogènes, progestérone) (figure 1).

Les ovaires sont situés contre la cavité pelvienne latérale, de part et d'autre de l'utérus. Chacun mesure entre 3 et 4 centimètres de long et deux centimètres de large. Chez la femme nullipare ou l'adulte jeune, la surface de l'ovaire est relativement lisse. Au fur et à mesure des grossesses et avec l'âge, cette surface devient irrégulière et on voit apparaître sur la face externe des cicatrices qui correspondent aux corps jaunes. A la ménopause, l'ovaire s'atrophie complètement et devient une petite bande fibreuse alors incapable de sécréter des œstrogènes et de la progestérone.

L'épithélium ovarien est en contact avec le péritoine et entoure l'ovaire.^{1,2}

VUE DE FACE

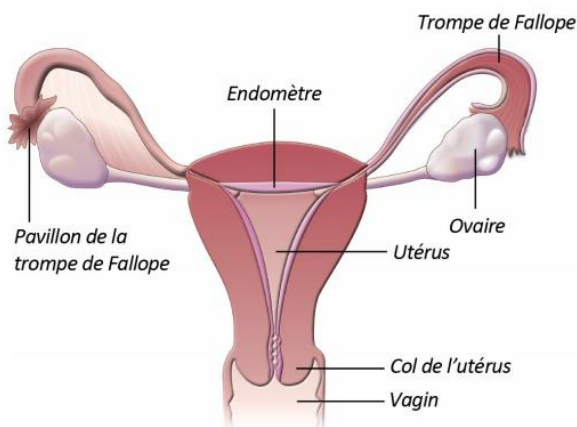


Figure 1: Représentation et anatomie des ovaires (Source : https://www.hpsj.fr/userfiles/GHPSJ/chir_gyn/Chir_gyn_livretA5_V23janv_2015.pdf)

B. Epidémiologie

En 2015, la cinquième version du GLOBOCAN est publiée. Cette étude mondiale rapportait l'incidence et la mortalité de différents cancers, dans 184 pays, et classait le cancer de l'ovaire comme le septième cancer le plus fréquent chez la femme avec 239 000 cas en 2012 ; et le huitième cancer le plus mortel chez la femme dans le monde avec 152 000 décès en 2012³ (figure 2).

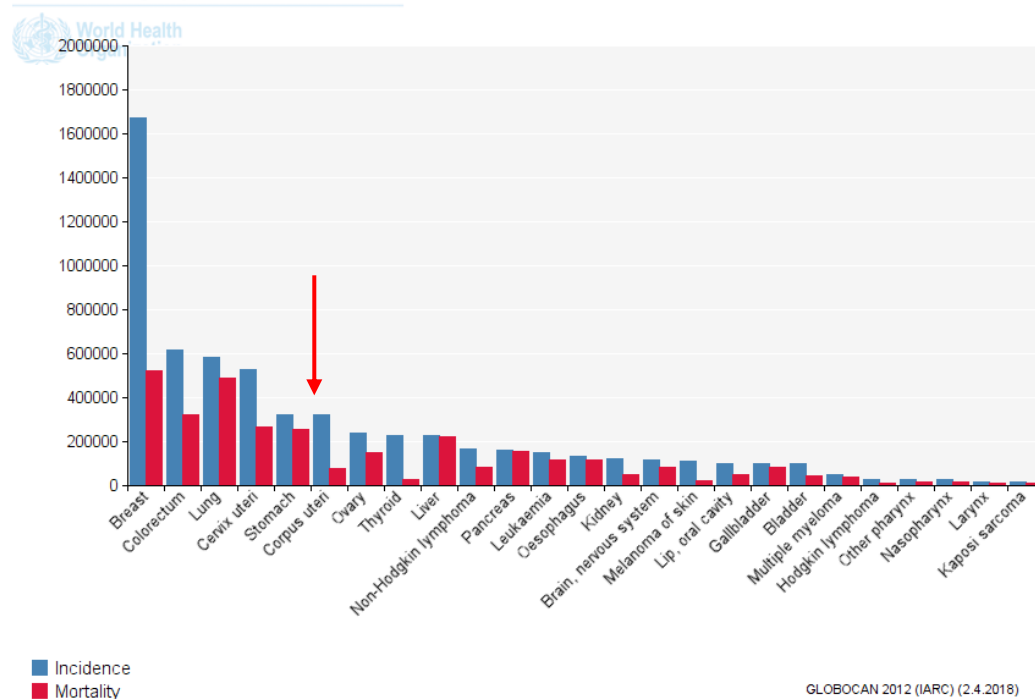


Figure 2: Incidence et mortalité des cancers en 2012, chez les femmes, dans le monde (Source : <http://globocan.iarc.fr>)

Dans cette même étude, en 2012 en France métropolitaine, le cancer de l'ovaire était le neuvième cancer le plus fréquent chez la femme avec 4600 cas diagnostiqués, et le cinquième cancer le plus mortel chez la femme avec près de 3400 décès³ (figure 3).

Selon les données de l'institut de veille sanitaire (InVS), dans la population générale, le risque d'être atteint de ce cancer avant 74 ans varie selon la cohorte de naissance. Il est de 1,09 %, pour la cohorte née en 1930, puis diminue progressivement jusqu'à 0,90 % pour la cohorte née en 1950^{4,5}.

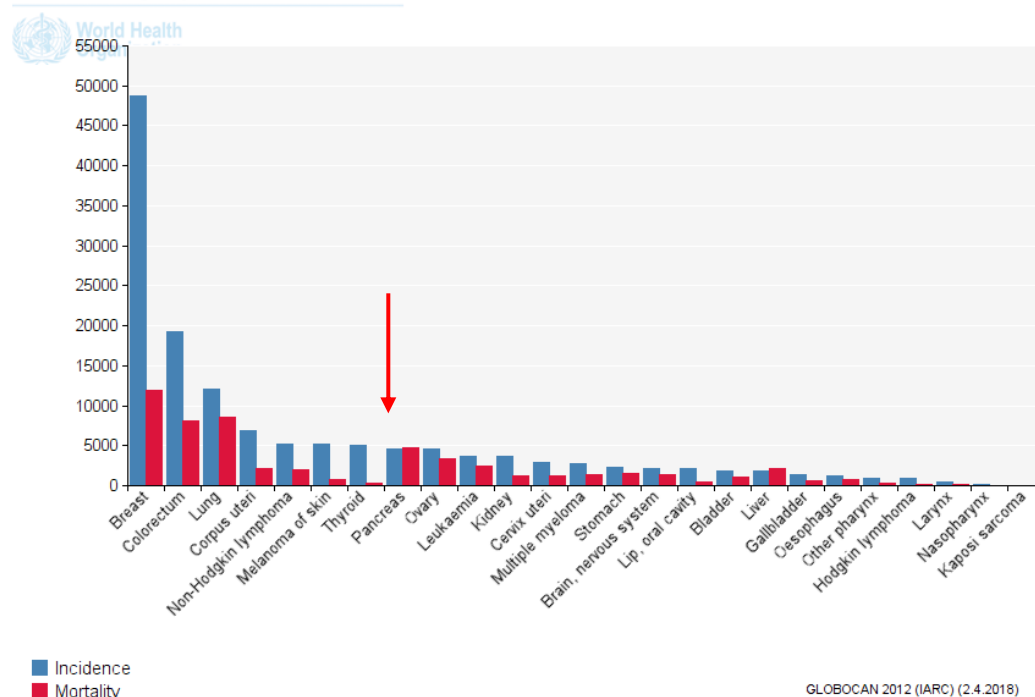


Figure 3: Incidence et mortalité des cancers chez la femme en France métropolitaine en 2012, d'après GLOBOCAN (Source : <http://globocan.iarc.fr>)

En 2017, le rapport technique concernant la projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine estimait l'incidence du cancer de l'ovaire en France à 4714 cas, et un nombre de décès à 3111 cas. Soit un nombre de cas légèrement plus élevé mais une diminution de la mortalité⁶ (figure 4).

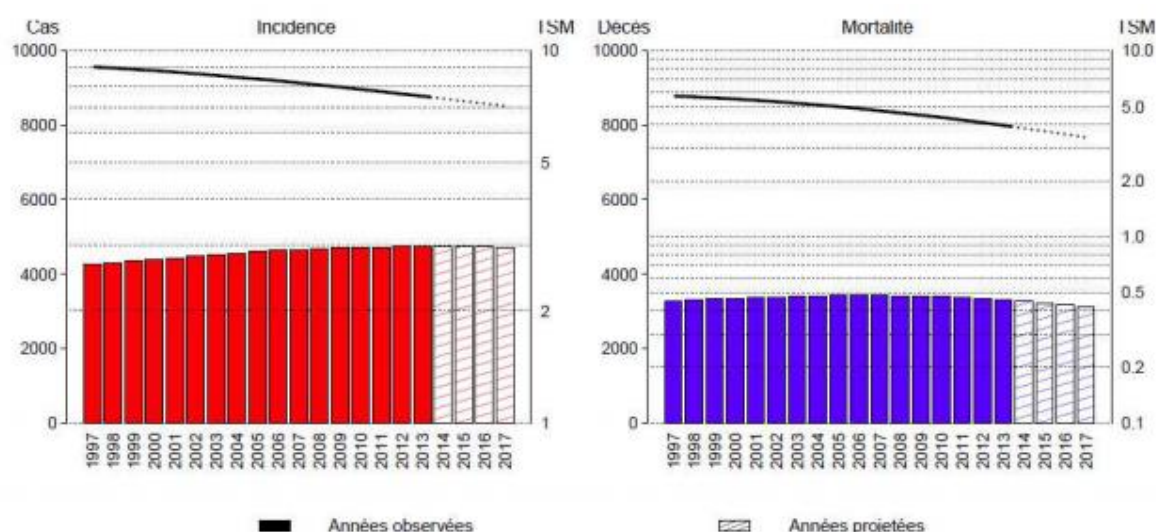


Figure 4: Évolution du nombre de nouveaux cas et de décès (barres) et des taux standardisés mondiaux correspondants (TSM) (courbes, échelle logarithmique) de 1997 à 2017 en France métropolitaine (Source : <http://invs.santepubliquefrance.fr>)

Le risque de développer une tumeur de l'ovaire augmente avec l'âge, l'âge médian au diagnostic est de 65 ans³.

Le taux de mortalité élevé est principalement lié au diagnostic tardif, trois quarts de ces cancers étant diagnostiqués à un stade avancé. La survie à 5 ans, tous stades confondus est basse, estimée, entre 2000 et 2014, entre 30 et 50% selon les pays. En France, la survie à 5 ans est de 41%⁷.

C. Anatomopathologie des tumeurs ovariennes

Les tumeurs ovariennes sont classées en fonction de leur type histologique, de leur stade (qui sera développé par la suite) et de leur grade.

Les tumeurs ovariennes malignes les plus fréquentes sont les tumeurs épithéliales, elles représentent près de 90% des tumeurs⁸.

1) *Histologie*

L'examen anatomopathologique précise le type histologique de la tumeur selon la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS).

a) Les tumeurs épithéliales

i) Les tumeurs épithéliales malignes

En 2003, l'OMS classe les tumeurs épithéliales, également appelées adénocarcinomes, en sept sous-types :

- Tumeurs séreuses
- Tumeurs mucineuses
- Tumeurs endométrioides
- Tumeurs à cellules claires
- Tumeurs à cellules transitionnelles
- Tumeurs indifférenciées
- Tumeurs épithéliales mixtes

Ces adénocarcinomes peuvent se développer à partir des cellules épithéliales de l'ovaire, mais aussi des cellules épithéliales des trompes ou du péritoine⁹.

ii) Les tumeurs borderlines

Cette variété tumorale est particulière à l'ovaire, ces tumeurs se situent entre les lésions morphologiquement bénignes et les tumeurs malignes.

Les tumeurs borderlines représentent 15 à 20% des tumeurs épithéliales ovariennes, elles surviennent en moyenne à un âge plus précoce que les tumeurs invasives, et présentent un meilleur pronostic avec un taux de survie globale de 90% à cinq ans. Ce sont des tumeurs épithéliales de l'ovaire à faible potentiel malin, pouvant se présenter sous une forme limitée à l'ovaire ou étendue au péritoine¹⁰.

Le diagnostic des tumeurs borderline est anatomo-pathologique avec l'association de plusieurs critères : pluristratification et bourgeonnement épithélial, augmentation de l'activité mitotique, atypies cytonucléaires et absence d'invasion stromale¹¹.

b) Tumeurs non épithéliales

Les tumeurs non épithéliales représentent environ 10% des cancers de l'ovaire, les plus fréquentes sont les tumeurs germinales et stromales. Ces tumeurs concernent la femme plus jeune.

La prise en charge et le pronostic des cancers non épithéliaux sont très différents et ne seront pas discutés ici.

2) *Origine des cancers épithéliaux ovariens*

Depuis plusieurs années, le site de tumorigénèse des cancers de l'ovaire épithéliaux est remis en question. Ces cancers se développent-ils au sein de la surface de l'épithélium ovarien ou de l'épithélium des trompes de Fallope ?¹²

Les arguments en faveur de la première théorie, considérant l'épithélium ovarien comme le siège initial du développement des adénocarcinomes, s'appuie sur l'hypothèse que les ovulations itératives contribueraient à l'initiation de la tumeur en favorisant un micro-environnement pro-inflammatoire favorisant l'acquisition de cassures doubles brins de l'ADN ; si ces cassures sont mal réparées, cela entraînerait une instabilité génomique et donc le développement tumoral. Cette théorie s'appuie sur plusieurs arguments, comme le fait que les femmes présentant un nombre d'ovulations élevé au cours de leur vie sont plus à risque de développer un cancer de l'ovaire, un autre argument est le fait que les mutations dans les gènes *BRCA1/2*¹³, impliqués dans la réparation des cassures doubles brins, augmentent le risque de cancer de l'ovaire. De plus, les inclusions kystiques de l'ovaire peuvent être considérées comme des formations métaplasiques qui auraient un fort potentiel de transformation maligne. Néanmoins, ces arguments sont contrebalancés par le fait que de nombreuses femmes sont porteuses de kystes bénins sans pour autant développer de tumeurs malignes (figure 5).

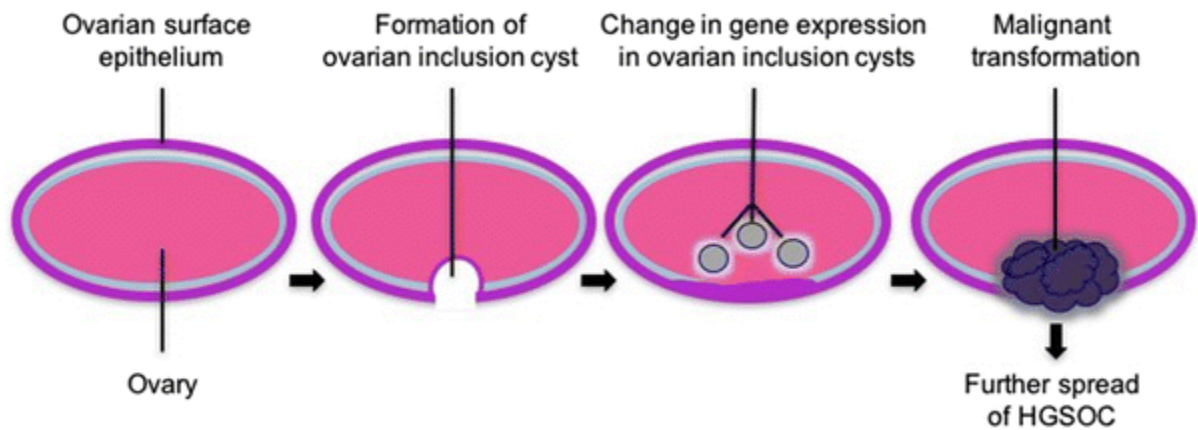


Figure 5: Illustration du développement tumoral à partir de l'épithélium ovarien. La formation d'inclusions kystiques favorise un environnement pro-inflammatoire, une instabilité génétique au sein des cellules épithéliales ovariennes, la formation de tumeurs qui vont se développer et devenir des tumeurs séreuses ovariennes de haut grade (HGSOC) (source : Klotz, 2014¹²)

La deuxième théorie considère l'épithélium des trompes de Fallope comme le lieu d'initiation tumorale. Elle s'appuie sur le fait que bien souvent, des lésions tubaires sont retrouvées associées aux tumeurs de l'ovaire (67%). De plus, comparé aux tumeurs séreuses de bas grade, endométrioides, mucineuses ou à cellules claires, les tumeurs séreuses de haut grade proviennent de lésions précurseurs au niveau des trompes de Fallope, appelées carcinomes intraépithéliaux des trompes séreuses. Enfin, il est fréquent de retrouver dans le cadre d'annexectomie prophylactique chez les femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA*, des dysplasies tubaires, non retrouvées chez les femmes non porteuses de ces mutations¹⁴ (figure 6).

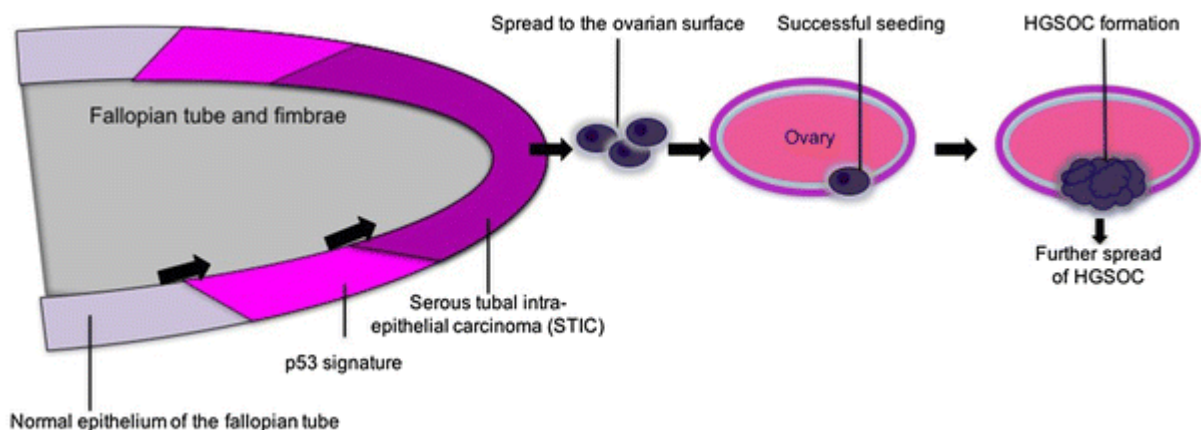


Figure 6: Illustration du développement tumoral à partir des cellules épithéliales tubaires. Des carcinomes intraépithéliaux tubaires se forment au niveau de l'épithélium tubaire et vont s'étendre à l'épithélium ovarien puis se transformer en adénocarcinome séreux de haut grade (source : Klotz, 2014¹²)

Ces deux modèles sont vrais, cependant, le deuxième modèle serait le plus fréquent concernant les adénocarcinomes de haut grade.

Ces théories expliqueraient pourquoi les facteurs de risque diffèrent selon les types histologiques observés¹⁴.

3) *Stade des tumeurs ovariennes*

Comme pour toute tumeur, pour estimer au mieux l'étendue de la tumeur, le pronostic, et afin d'adapter le traitement, ces tumeurs sont classées par stade selon la classification FIGO. Les caractéristiques analysées pour déterminer le stade concernent l'étendue et l'extension de la tumeur, ainsi que les localisations à distance (figure 7). Plus le stade est élevé, plus la tumeur est invasive et donc plus le pronostic est sombre.

Classification FIGO des cancers de l'ovaire.
Stade I : Tumeurs limitées aux ovaires (survie à 5 ans : 84 %)
➤ IA : Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte ➤ IB : Tumeurs des deux ovaires, capsules intactes ➤ IC : Rupture capsulaire ou tumeur à la surface ovarienne ou cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
Stade II : Tumeurs étendues au pelvis (survie à 5 ans : 59 %)
➤ IIA : Extension à l'utérus et/ou aux trompes ➤ IIB : Extension aux autres organes pelviens ➤ IIC : Extension pelvienne avec cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
Stade III : Métastases péritonéales au-delà du pelvis et/ou adénopathies métastatiques régionales (survie à 5 ans : 35 %)
➤ IIIA : Métastases péritonéales microscopiques ➤ IIIB : Métastases péritonéales macroscopiques < 2 cm ➤ IIIC : Métastases péritonéales > 2 cm et/ou adénopathies métastatiques régionales
Stade IV : Métastases à distance autres que les métastases péritonéales (survie à 5 ans : 22 %)

Figure 7: classification FIGO 2014 des tumeurs épithéliales de l'ovaire (Source : <http://cancer2.medicclub.info/>)

4) *Grade des carcinomes ovariens séreux*

On classe les carcinomes ovariens séreux en deux grades : bas grade et haut grade.

Ce classement est basé sur plusieurs paramètres : cliniques, histologiques et moléculaires¹⁵.

a) *Carcinomes séreux de bas grade*

Sur le plan clinique, les carcinomes séreux de bas grade sont plus rares que ceux de haut grade, ils sont diagnostiqués chez la femme plus jeune entre 45 et 57 ans. Ces tumeurs évoluent plus lentement que les carcinomes de haut grade¹⁵.

Sur le plan histologique, elles présentent peu d'atypies nucléaires, et l'index mitotique est bas.

Chronologiquement, la lésion primitive est un adénofibrome ou un cystadénome, qui va évoluer vers une tumeur séreuse proliférative atypique (tumeur borderline), puis vers une tumeur séreuse borderline non invasive qui par la suite pourra devenir invasive.

Sur le plan moléculaire, on retrouve fréquemment des mutations dans les gènes *KRAS*, *BRAF* et *ERBB2*.

La survie à 5 ans (hors stade 1) est estimée entre 40 et 56%. Ce faible pourcentage s'explique par la fréquente résistance aux chimiothérapies.

b) Carcinomes séreux de haut grade

Les carcinomes séreux de haut grade sont plus fréquents que les bas grades, ils sont diagnostiqués à un âge plus tardif, entre 55 et 65 ans, ils évoluent rapidement.

Sur le plan histologique, ils présentent de nombreuses atypies nucléaires, et un index mitotique élevé.

Sur le plan moléculaire, au niveau tumoral, on retrouve très fréquemment des mutations dans le gène *TP53* (dans plus de 90% des cas), et, dans 20% des cas, des anomalies dans les gènes *BRCA1/2*¹⁵.

D. Facteurs de risque

1) Prédisposition génétique

L'histoire familiale est le facteur de risque le plus important dans les tumeurs ovariennes.

Environ 10% des cancers de l'ovaire surviennent dans un contexte de prédisposition génétique.

On estime le risque pour une femme de développer un cancer de l'ovaire quand une de ses apparentée au premier degré est également atteinte, multiplié par trois comparé à la population générale. Le risque est plus élevé quand le cancer est apparu précocement, avant l'âge de 50 ans^{16,17}.

Les femmes présentant une prédisposition génétique aux cancers de l'ovaire ont un diagnostic plus précoce que dans la population générale¹⁸. En effet, l'âge médian au diagnostic dans la population générale est de 65 ans³, chez les patientes porteuses d'une mutation du gène *BRCA1*, l'âge médian au diagnostic est de 60 ans et pour les patientes porteuses d'une mutation du gène *BRCA2* il est de 62 ans¹⁹.

2) Facteurs hormonaux

L'histoire hormonale de la femme influence également le risque de cancer de l'ovaire. Les données épidémiologiques montrent que les facteurs réduisant le nombre d'ovulation durant la vie ont un effet protecteur. En effet, l'utilisation de contraceptifs oraux, le nombre de grossesses menées à terme, la ligature des trompes diminuent le risque de cancer de l'ovaire^{20, 21, 22}.

Concernant l'allaitement, l'effet protecteur est évoqué mais n'est pas encore attesté. Plusieurs études réalisées ont trouvé des résultats discordants, certaines ne montraient pas de corrélation significative²¹, alors que de précédentes études épidémiologiques avaient montré un rôle protecteur significatif²³, la raison évoquée pour expliquer ces différents résultats est la durée de l'allaitement. En effet, l'allaitement prolongé (de plus de 18 mois) aurait un rôle protecteur significatif.

À l'inverse, les facteurs hormonaux augmentant le nombre d'ovulation telles une ménopause tardive (après 55 ans), la nulliparité ou la prise prolongée d'un traitement hormonal substitutif de la ménopause augmente le risque de cancer de l'ovaire²⁴.

Concernant la puberté précoce comme facteur de risque favorisant la survenue de cancer de l'ovaire, les résultats des études épidémiologiques étant différents selon les études, son rôle reste encore à prouver^{24, 8}.

3) *Autres facteurs de risque associé au cancer de l'ovaire*

D'autres facteurs de risque ont été évoqués, mais leur impact n'est pas encore avéré, de plus amples études étant attendues pour valider ou non ces facteurs²¹.

Les femmes atteintes d'endométriose semblent avoir un risque de développer un cancer de l'ovaire plus élevé que dans la population générale. Ce risque est significatif pour les tumeurs épithéliales à cellules claires et endométrioïdes²⁵.

Concernant le syndrome des ovaires polykystiques, le risque de survenue de cancers de l'ovaire n'est pas avéré, les résultats étant discordants selon les études^{26, 27}.

L'utilisation de talc, le tabac, l'alcoolisme ont également été évoqués mais tout comme le syndrome des ovaires polykystiques, les résultats ne sont pas toujours significatifs selon les études²¹.

Comme montré dans l'étude de Wentzensen en 2016⁸, une hétérogénéité des facteurs de risque est constatée selon le type histologique de la tumeur. Par exemple, une parité élevée est plus fortement associée au risque de développer un carcinome endométrioïde ou à cellules claires. De même, sont uniquement associées à ces sous-types les facteurs de risque suivants : l'âge de ménopause tardif, l'endométriose, la ligation tubaire. Ces associations seraient liées au fait que ces types de tumeurs ont pour origine les cellules épithéliales ovariennes et non les cellules épithéliales tubaires.

Enfin, certains environnements professionnels (amiante, industrie automobile, industrie du caoutchouc, agriculture) pourraient exposer les femmes à un léger surrisque de cancer, mais ces données doivent encore être confirmées.

E. Pronostic

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus mortel dans le monde^{28, 29}.

Le pronostic des cancers de l'ovaire dépend de plusieurs facteurs, comme le type histologique, le grade, l'étendue (stade FIGO), l'état général de la patiente, le volume de reliquat tumoral postopératoire^{18, 31}.

Dans la majorité des cas, le cancer de l’ovaire reste asymptomatique pendant une longue période. C’est pourquoi, la plupart du temps, ce cancer n’est découvert qu’à un stade avancé, lorsqu’il a déjà formé des métastases dans les cavités pelvienne et abdominale. De ce fait, la survie à 5 ans est faible. De plus les rechutes et résistance aux traitements sont fréquentes.

II. Prédilection génétique aux cancers de l’ovaire

Comme nous l’avons vu précédemment, le principal facteur de risque est l’hérédité. En effet, on estime qu’environ 10% des tumeurs ovariennes épithéliales seraient liées à une prédisposition génétique. Les principaux gènes identifiés dans cette prédisposition sont *BRCA1* et *BRCA2*. Des mutations dans ces gènes sont également retrouvées chez des femmes n’ayant pas d’antécédents familiaux de cancers de l’ovaire³².

A. Les gènes *BRCA*

1) Structure et rôle des gènes *BRCA*

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (BRCAst Cancer gene) ont été décrits au début des années 90 comme augmentant le risque de développer un cancer du sein et/ou de l’ovaire chez les femmes porteuses de mutations constitutionnelles dans ces gènes.

Ces gènes sont des gènes suppresseurs de tumeurs, et sont impliqués dans la réparation des cassures doubles brins de l’ADN via la recombinaison homologe, principal garant de la stabilité du génome.

Le gène *BRCA1* a été découvert grâce au clonage positionnel en 1994, comme prédisposant aux cancers du sein et de l’ovaire^{33, 34}.

BRCA1 est localisé en 17q21, contient 24 exons dont 22 codant, et code pour une protéine de 1863 acides aminés. La protéine BRCA1 contient plusieurs domaines (figure 8a)³⁵ :

- A l’extrémité N-terminal, un domaine en doigts de zinc RING caractérisé par un motif conservé de cystéines et d’histidines permettant des interactions protéine-protéine et protéine-ADN, notamment la liaison à la protéine BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) ; cette extrémité possède également une séquence d’exportation nucléaire (NES) ;

- La région centrale de BRCA1 contient deux séquences de localisation nucléaire (NLS) suivies d’un site de phosphorylation sensible à la protéine CHK2, en position S988, cette phosphorylation est importante pour l’activation des checkpoints du cycle cellulaire médiés par BRCA1 (G2-M et phase S)³⁶ ; suivie d’une superhélice qui s’associe avec la protéine PALB2 (Partner And Localizer of BRCA2) ;

- L’extrémité C-terminal contient un groupe de motifs SQ/TQ sensibles à la phosphorylation par ATM (Ataxia Telangiectasia mutated), et un domaine BRCT constitué de deux séquences répétées très conservées. Ce domaine interagit avec plusieurs protéines telles abraxas³⁷, CtBP-interacting protein (CtIP)³⁸ et BRIP1 (BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1). Ce dernier domaine est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l’ADN et le cycle cellulaire tel P53. Le complexe BRCA1-CtIP permet d’activer ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related) et la

recombinaison homologue en s'associant avec le complexe MRN (comprenant MRE11, RAD50, NBS1) qui facilite la résection des cassures double brins.

Le gène *BRCA2* a été découvert en 1995³⁹, il est localisé en 13q12.3, contient 27 exons, et code pour 3418 acides aminés.

Comme *BRCA1*, la protéine *BRCA2* est composée de plusieurs domaines (figure 8b)^{35, 40}:

-En N-terminal, on trouve le domaine de liaison avec la protéine PALB2⁴¹, et également un premier domaine de liaison à l'ADN qui va faciliter la stabilisation de RAD51 sur la cassure double brin⁴² ;

-Au centre de la protéine, il y a huit répétitions du motif BRC entre les acides aminés 1009 à 2083, qui se lient à la protéine RAD51. Ensuite, on a un domaine en hélice, 3 domaines de liaison aux oligonucléotides qui lient l'ADN simple brin, et un domaine en tour responsable de l'activité de liaison à l'ADN double-brin⁴³. Cette région se lie également à DSS1 (deleted in split-hand/split-foot syndrome), cette protéine permet d'assurer la stabilité de *BRCA2*⁴⁴ ;

-Dans la partie C-terminale, on a le domaine NLS, et un site de phosphorylation sensible à CDK (cyclin-dependent kinase), qui se lie également à RAD51, ainsi qu'un deuxième domaine se liant à l'ADN au niveau de la cassure double brin⁴⁰.

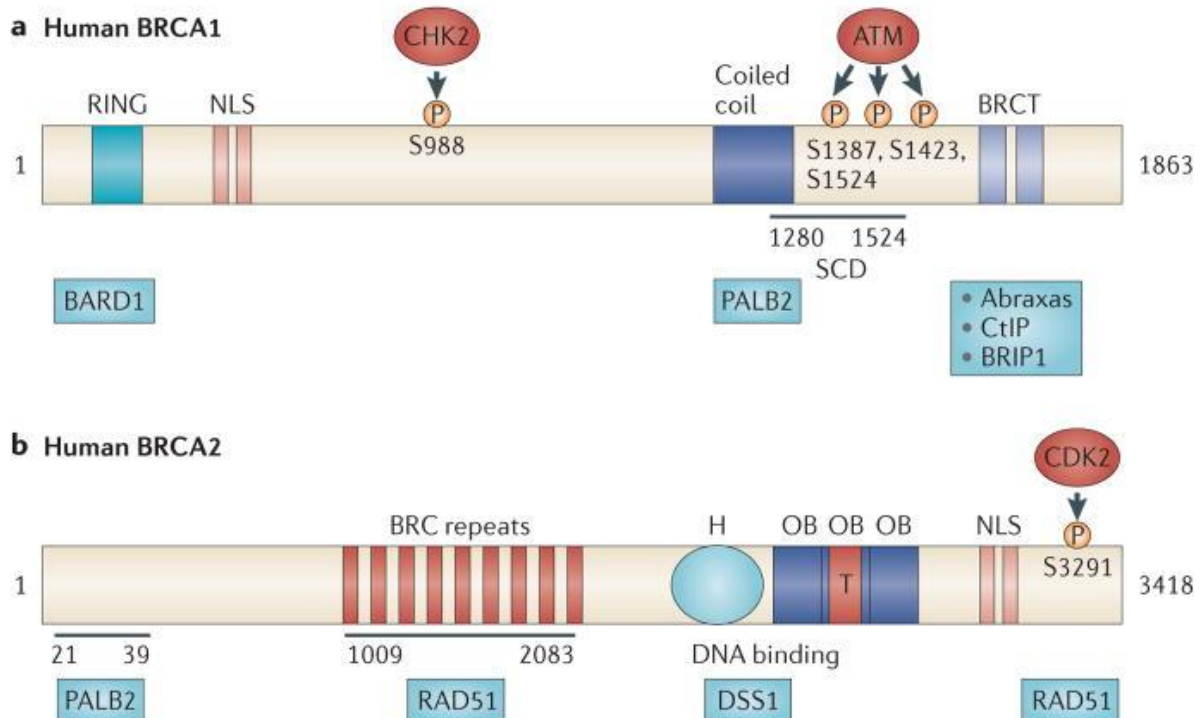


Figure 8: Structure et principaux domaines des protéines a) *BRCA1* et b) *BRCA2* (source : Roy 2012³⁵)

2) Spectre tumoral

a) Prédisposition au cancer du sein

Les femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* ont un risque plus élevé de développer un cancer du sein^{45, 46}. Ce risque dépend du gène muté. Selon plusieurs études, le risque cumulé de cancer du sein à 70 ans est estimé entre 55 et 65% pour les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA1*, et entre 45 et 55% pour les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA2*^{45, 46, 47, 48, 49} (tableau 1). Une étude prospective récente de 2017 portant sur 3886 femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA*, a estimé le risque cumulé à 80 ans à 72% pour les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA1* et de 69% dans le gène *BRCA2*⁵⁰.

L'âge médian au diagnostic est plus précoce que dans la population générale, il est estimé entre 40 et 42 ans pour les femmes porteuses de mutations *BRCA1* et entre 43 et 45 ans pour celles porteuses de mutations dans *BRCA2*⁴⁷.

Tableau 1: risque cumulé de cancer du sein à 70 ans, intervalle de confiance 95%

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Antoniou 2003 ⁴⁵	65% (51-75%)	45% (33-54%)
Chen 2007 ⁴⁶	55% (50 to 59%)	47% (42 to 51%)
Mavaddat 2012 ¹⁹	60% (44-75%)	55% (41-70%)

Le risque de développer un cancer du sein controlatéral est également plus élevé comparé aux femmes ayant eu un cancer du sein sporadique⁴⁸. En effet, le risque cumulé à 70 ans de développer un cancer controlatéral est estimé à 83% chez les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA1*, et à 62% chez les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA2*¹⁹. Dans une autre étude, ce risque est estimé à 47,1% dans les familles porteuses de mutations dans *BRCA1* ou *BRCA2*. Plus l'âge au diagnostic du premier cancer est jeune, plus le risque d'avoir un cancer bilatéral est élevé⁴⁹. Dans une étude prospective récente portant sur 2213 femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA*, le risque de développer un cancer du sein controlatéral dans les 20 années suivant le diagnostic du premier était estimé à 40% chez les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA1* et à 26% chez les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA2*⁵⁰.

Chez les hommes porteurs d'une mutation constitutionnelle de *BRCA1* ou *BRCA2*, le risque cumulé de cancer du sein est supérieur à de la population générale. Ce risque est plus élevé en cas de mutation *BRCA2* (risque cumulé à 70 ans autour de 7 %) qu'en cas de mutation *BRCA1* (risque cumulé à 70 ans autour de 1 %)^{51, 52}.

b) Prédisposition aux cancers de l'ovaire

Comme vu précédemment, les adénocarcinomes peuvent, par extension, se développer au niveau des trompes de Fallope ou du péritoine. Les mutations dans les gènes *BRCA* prédisposent également aux adénocarcinomes touchant ces organes voisins (adénocarcinomes tubaires et carcinomes péritonéaux primitifs).

Les femmes porteuses d'une mutation dans les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* ont un risque plus élevé de développer un cancer de l'ovaire comparé à la population générale. Ce risque varie selon le gène *BRCA* muté⁴⁵. Le risque cumulé à 70 ans de développer un cancer de l'ovaire chez une femme porteuse d'une mutation dans le gène *BRCA1* est estimé entre 39 et 59% ; et entre 11 et 17 % pour les femmes porteuses d'une mutation dans le gène *BRCA2*^{46, 19} (Tableau 2).

Le cancer de l'ovaire survient plus précocement en cas de mutation dans le gène *BRCA1* que dans le gène *BRCA2*. L'âge médian au diagnostic est de 60 ans pour les femmes porteuses d'une mutation dans *BRCA1* et de 62 ans pour celles porteuses d'une mutation dans *BRCA2*^{19, 53}. Dans une étude prospective récente de 2017 portant sur 5066 femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA*, le risque cumulé à 80 ans de développer un cancer des annexes était estimé à 44% chez les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA1* et de 17% chez les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA2*⁵⁰.

Tableau 2: risque cumulé de cancer de l'ovaire à 70 ans, intervalle de confiance 95%

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Antoniou 2003 ⁴⁵	39% (22-51%)	11% (4,1-18%)
Chen 2007 ⁴⁶	39% (34 to 45%)	39% (34 to 45%)
Mavaddat 2012 ¹⁹	59% (43-76%)	16,5% (7,5-34%)

Concernant les cancers des ovaires sporadiques, sans histoire familiale associée, on retrouve une mutation dans les gènes *BRCA* dans près de 20% des cas (15% de variants pathogènes constitutionnels et 5% de variants pathogènes tumoraux)^{32, 47}.

De plus, 44% des patientes mutées *BRCA* en constitutionnel n'ont pas d'histoire familiale ou personnelle de cancer du sein et/ou de l'ovaire³².

c) Autres cancers

Chez les femmes ou les hommes porteurs d'une mutation de *BRCA1*, même si les résultats des études ne sont pas concordants, il semble globalement qu'elle ne soit pas associée à un surrisque de mélanome ou de cancer de la prostate^{48, 54, 55}. Une augmentation du risque de développer un cancer du pancréas associé à une mutation de *BRCA1* a été mise en évidence dans une étude⁵⁶, ce surrisque n'a pas été retrouvé dans une autre étude⁵⁴.

Les résultats apparaissent plus concordants en cas de mutation dans le gène *BRCA2*. Ils mettent en évidence une augmentation du risque de développer un mélanome, un cancer du pancréas ou un cancer de la prostate associée à une mutation de ce gène, mais ce surrisque reste modéré^{54, 55, 56}.

Les femmes porteuses de mutation dans le gène *BRCA1* auraient un risque plus élevé de développer un cancer colorectal avant l'âge de 50 ans (risque estimé à 1% comparé à 0,2% dans la population générale)^{57, 58}. Ce risque n'a pas été démontré chez les patients porteurs de mutation dans *BRCA2*.

Enfin, une étude récente évoque un risque plus important de développer un cancer séreux endométrial chez les femmes porteuses de mutation dans les gènes *BRCA*⁵⁹. Une étude sur une plus grande cohorte est attendue pour confirmer ce résultat.

3) *Caractéristiques des tumeurs*

a) *Caractéristiques histologiques*

Concernant les cancers du sein, en cas de mutation dans le gène *BRCA1*, un type particulier de tumeurs est observé plus fréquemment que dans les tumeurs sporadiques, il s'agit de tumeurs triples négatives. Ces tumeurs se caractérisent par l'absence de récepteurs hormonaux (aux œstrogènes et à la progestérone) et l'absence de récepteurs à la protéine HER2, visualisée par l'étude immunohistochimique. Ce statut modifie la prise en charge thérapeutique. En effet, les femmes porteuses de ce type de cancer ne sont pas éligibles à l'hormonothérapie.

Concernant les cancers de l'ovaire, les cancers épithéliaux séreux de haut grade sont majoritaires en cas de mutation dans les gènes *BRCA*, mais des mutations dans ces gènes ont également été retrouvées dans des tumeurs endométrioïdes, des carcinomes à cellules claires, des carcinosarcomes^{32, 60, 61, 62, 63}. Seulement 4 à 5% des tumeurs avec une mutation dans *BRCA* sont de bas grade.

La répartition des types histologiques des cancers des annexes est similaire entre les patientes porteuses d'une mutation *BRCA1* et celles porteuses d'une mutation *BRCA2*, c'est-à-dire des tumeurs épithéliales, de type séreux de haut grade^{64, 65, 66, 67}.

b) *Caractéristiques pronostiques*

Les patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle *BRCA1* ou *BRCA2* ont une survie globale significativement meilleure en comparaison aux autres patientes présentant un cancer de l'ovaire sans mutation détectée dans ces gènes^{68, 69, 70}.

Les tumeurs ovariennes associées à une mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* surviennent souvent avant 60 ans. Ces tumeurs sont de meilleur pronostic, car elles sont généralement plus sensibles au traitement par chimiothérapie.

4) *Rôle des protéines BRCA dans la réparation des cassures double brins de l'ADN*

Depuis leur découverte dans les années 90, le rôle des gènes *BRCA* a été fortement étudié, Les protéines BRCA sont impliqués notamment dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN, via la recombinaison homologue, et par ce biais, sont les garants de la maintenance de la stabilité génomique.

a) *Cassures doubles brin de l'ADN*

L'ADN est en permanence attaqué, que ce soit par des agents endogènes ou exogènes, à l'origine de cassures des brins d'ADN, simple ou double brin.

On estime qu'une cellule subit 105 lésions d'ADN par jour⁷¹, et qu'environ dix de ces lésions seraient des Cassures Double-Brin (CDB)⁷². Ce nombre est nettement plus bas que les autres types de dommages, mais l'impact que peut avoir une CDB est considérable. Les CDB sont générées quand les deux brins complémentaires de l'hélice d'ADN se rompent simultanément, ces cassures sont considérées comme des lésions sévères et délétères pour la cellule et sont dites « génotoxiques », puisqu'elles menacent l'intégrité du génome. Un défaut de réparation peut causer des pertes dans l'information génétique (perte de morceaux de chromosome), des réarrangements chromosomiques (translocations, réversion...) qui participeraient à la cancérogenèse par instabilité génomique.

Afin de réparer les cassures doubles brins de l'ADN, deux principaux mécanismes sont impliqués. Le premier consiste à réparer l'ADN par recombinaison homologue, ce mécanisme permet une réparation fiable de l'ADN, en copiant l'autre brin intact. Du fait de l'implication du second brin d'ADN, ce mécanisme ne peut être utilisé qu'au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire, quand l'ADN est répliqué.

Le deuxième mécanisme est la recombinaison non homologue (NHEJ), qui répare la cassure double brin par jonction d'extrémités non homologues permettant une liaison directe des deux extrémités de l'ADN cassé. L'avantage de ce mécanisme est qu'il peut être utilisé tout au long du cycle cellulaire car il ne requiert pas de brin complémentaire, l'inconvénient est la perte de fidélité que ce mécanisme engendre, pourvoyeur de nombreuses erreurs⁴⁴. (Figure 9)

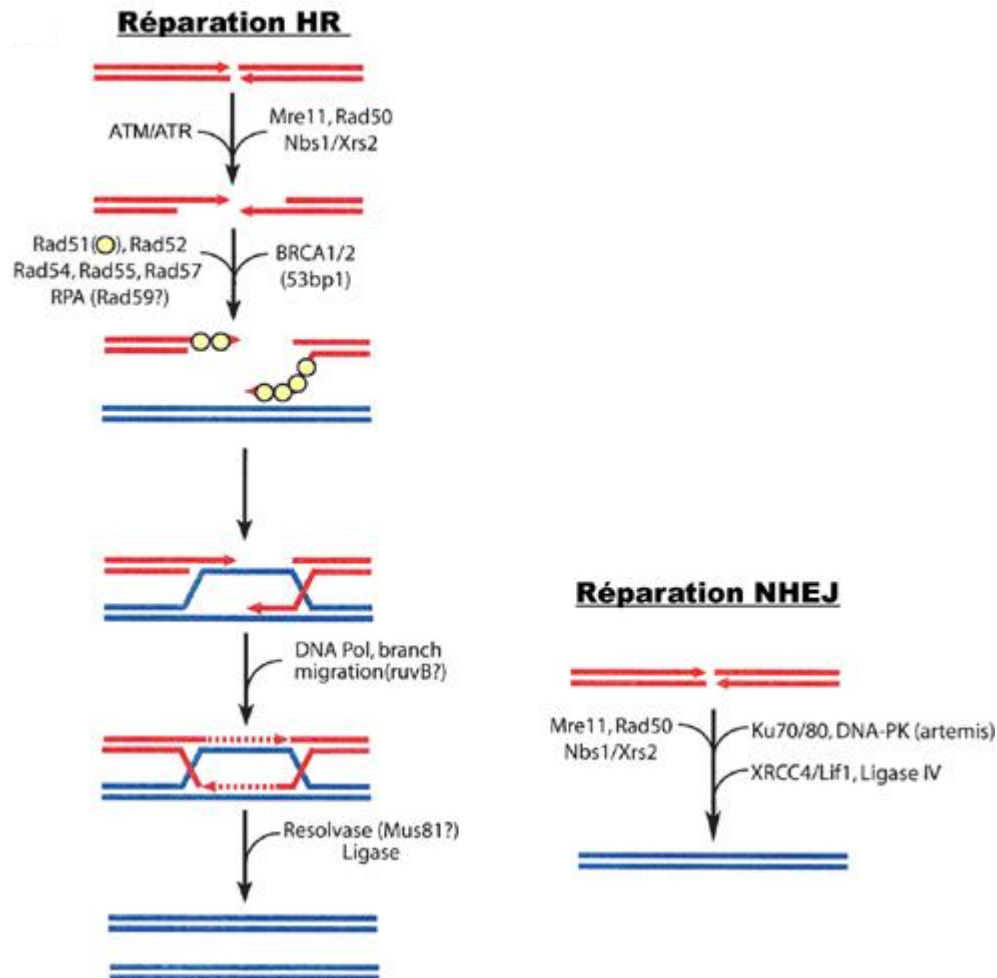


Figure 9: Types de réparation de cassures doubles brins de l'ADN (source : Peterson, 2009⁷³)

b) Recombinaison homologue

La recombinaison homologue utilise soit la chromatide sœur présente après la réplication de l'ADN, soit, un chromosome homologue lors de la méiose, comme une matrice comportant l'information génétique intacte permettant de réparer l'ADN brisé⁷⁴.

L'une des protéines clé de la réparation des CDB par recombinaison homologue est RAD51. Cette protéine va aller rechercher la séquence homologue intacte et catalyser l'échange de brin qui va permettre la réparation de la CDB. BRCA2 interagit avec RAD51 en lui permettant de se localiser au site de la CDB. De par ce fait, un déficit en protéine BRCA2 fonctionnelle est à l'origine d'une instabilité génomique.

On peut diviser ce mécanisme en 3 étapes : la phase présynaptique, la phase synaptique, et la phase postsynaptique.

La phase présynaptique consiste à réséquer les extrémités de la cassure pour former un ADN 3'-protubérant. Au cours de cette phase, la protéine RPA (replication protein A) va se lier à l'ADN simple brin formé à la suite de la résection de la cassure double brin afin de protéger l'ADN des attaques de nucléases et empêcher la formation de structures secondaires ou la liaison de protéines

inappropriées. Par la suite, des cofacteurs, tels BRCA2 et PALB2, vont être recrutés afin de déplacer RPA au profit de RAD51. La protéine RAD51 va se lier sur l'ADN simple brin, autour duquel elle va former un filament nucléoprotéique.

Au cours de la phase synaptique, RAD51 va provoquer l'invasion de l'ADN 3'-protubérant dans l'ADN double-brin complémentaire de la chromatide sœur et former une boucle de déplacement. Les mêmes cofacteurs PALB2 et BRCA2 vont stimuler l'activité recombinaise permettant l'étape d'invasion.

La phase post-synaptique consiste à allonger l'ADN envahissant par l'action d'une ADN polymérase afin de recopier l'information manquante.

Après l'étape d'extension, trois mécanismes différents peuvent être utilisés pour compléter la réparation : le DSBR, le SDSA, le BIR (figure 10).

Dans la voie du DSBR (double-strand break repair), la seconde partie du brin cassé va s'associer au brin d'ADN déplacé, et entraîner la formation de deux jonctions de Holiday. La double jonction de Holiday va ensuite être éliminée, soit par résolution, soit par dissolution. La résolution, c'est-à-dire la coupure simultanée des deux jonctions, va aboutir à des produits d'ADN de type « crossover » (contenant des échanges réciproques de morceaux d'ADN) ou « non-crossover ». La dissolution va aboutir à des produits de type « non crossover ».

Dans la voie du SDSA (synthesis-dependent strand annealing), la boucle de déplacement est dissoute avant formation de la jonction de Holiday pour s'hybrider avec l'ADN simple brin de la deuxième extrémité de la cassure. Ce mécanisme forme uniquement des produits d'ADN de type non-crossover.

Dans la voie BIR (break-induced replication), la boucle de déplacement se convertit en fourche pour recopier le bras entier du chromosome.

La voie du SDSA est prédominante dans la réparation par recombinaison homologue de l'ADN, tandis que la voie du BIR est la moins fréquente.

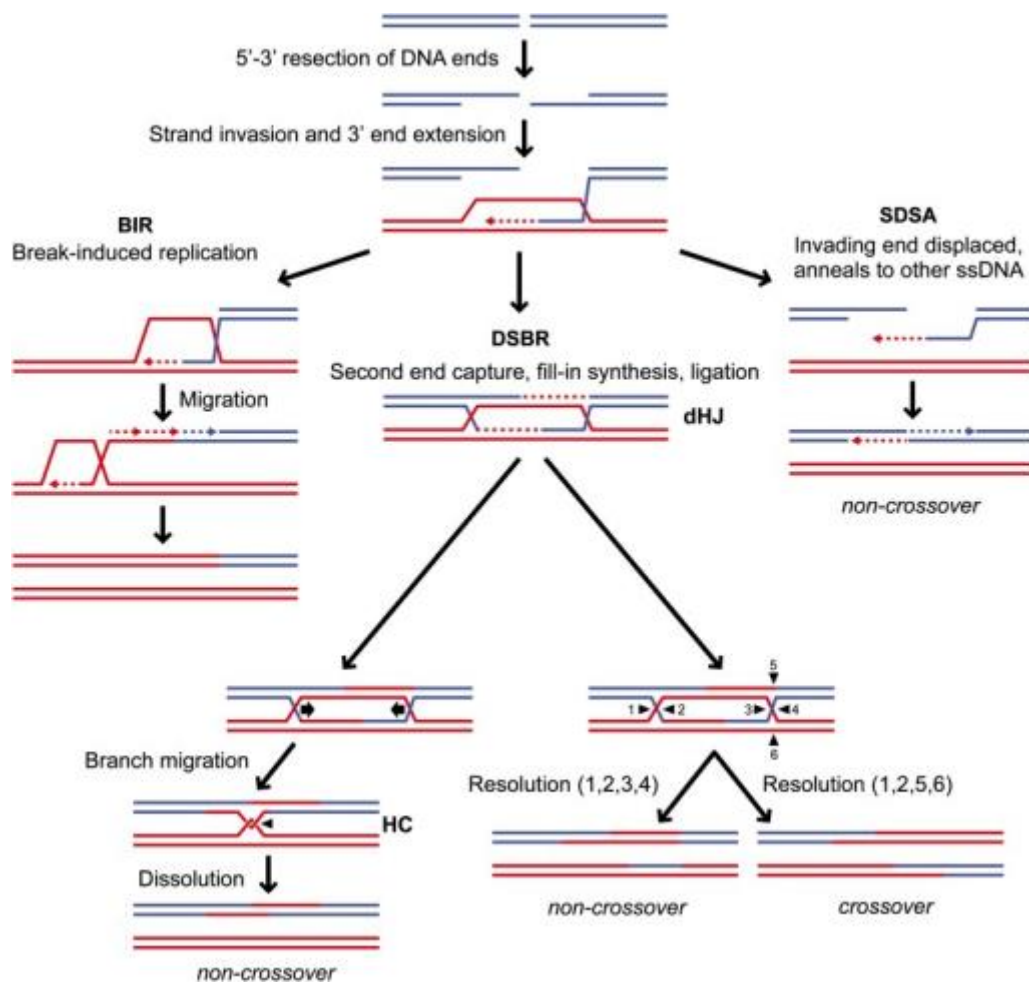


Figure 10: Etapes de la recombinaison homologue (source : Symington 2014⁷⁵)

La protéine BRCA1 est directement impliquée dans la réparation des cassures double brins par recombinaison homologue. BRCA1 se lie aux cassures doubles brins via son association avec le complexe abraxas-RAP80, qui s'associe avec les histones ubiquitinyllées aux cassures doubles brins de l'ADN. Ensuite BRCA1 interagit avec CtIP et le complexe MRN (comprenant les protéines MRE11, RAD50 et NBS1). Le complexe BRCA1-CtIP active la résection des CDB CtIP-5'. BRCA1 est également requis pour le recrutement de RAD51 aux sites de lésions de l'ADN via son interaction avec BRCA2 et PALB2^{35, 76}. (Figure 11)

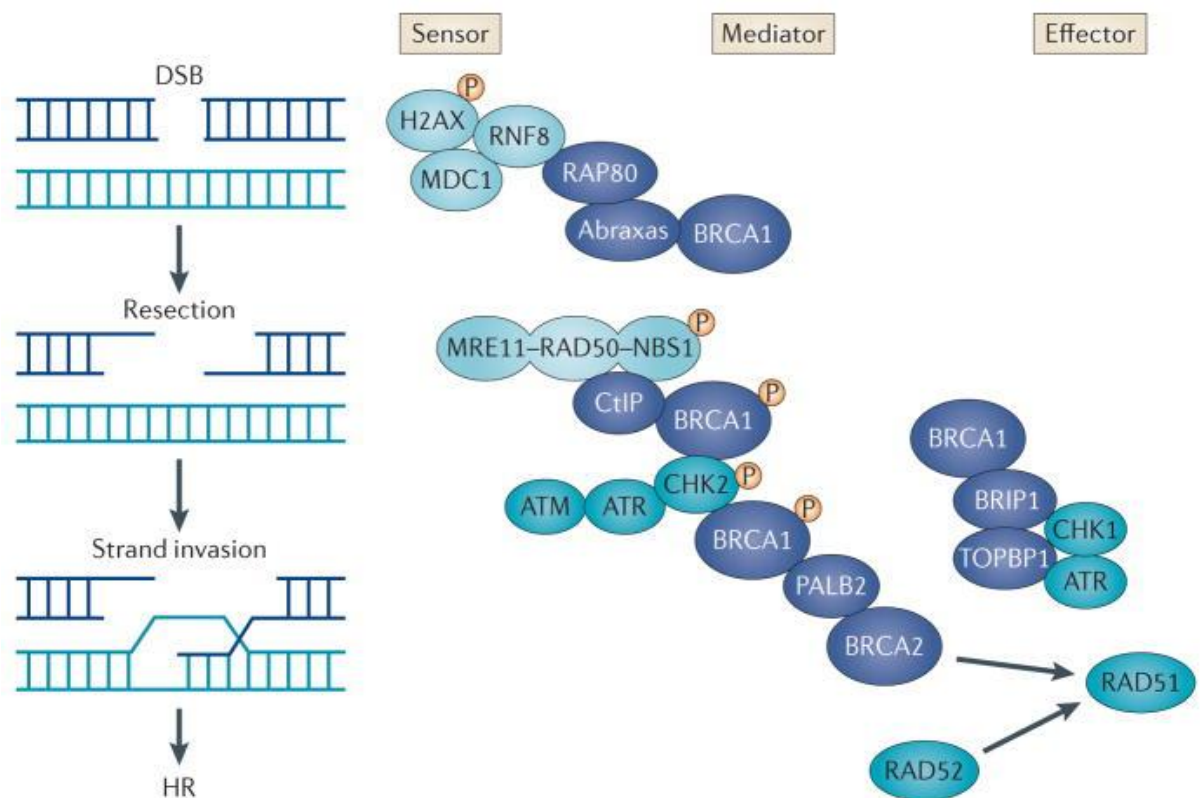


Figure 11: Principaux acteurs de la recombinaison homologue. En bleu clair sont représentées les protéines détectant la cassure double brin, en bleu foncé sont représentées les protéines médiant la réparation par recombinaison homologue et en turquoise sont représentées les protéines impliquées directement dans la réparation. (Source : Roy, 2012³⁵)

5) Anomalies au niveau moléculaire

Les gènes *BRCA1/2* sont des gènes suppresseurs de tumeur. Le modèle de Knudson des deux hits peut s'appliquer à ces deux gènes⁷⁸.

a) Modèle de Knudson

En 1971, Knudson publie son hypothèse des deux hits (« two-hit hypothesis »), en étudiant le rétinoblastome⁷⁸. Le rétinoblastome est une tumeur rare de la rétine, apparaissant dans l'enfance (généralement avant l'âge de trois ans). Il existe 10% de formes familiales, souvent bilatérales, avec une pénétrance élevée. A partir de ce modèle, Knudson a réalisé des analyses statistiques sur plusieurs familles de patients présentant un rétinoblastome et a formulé pour la première fois l'hypothèse des deux hits. C'est-à-dire que, pour être atteint de rétinoblastome, il faut deux altérations génétiques indépendantes dans la tumeur, menant à l'inactivation du gène. Dans les cas familiaux, le premier évènement est constitutionnel et hérité de façon dominante, le second évènement est somatique et conduit à la transformation maligne. Dans les cas sporadiques, les deux évènements arrivent au niveau somatique (Figure 12).

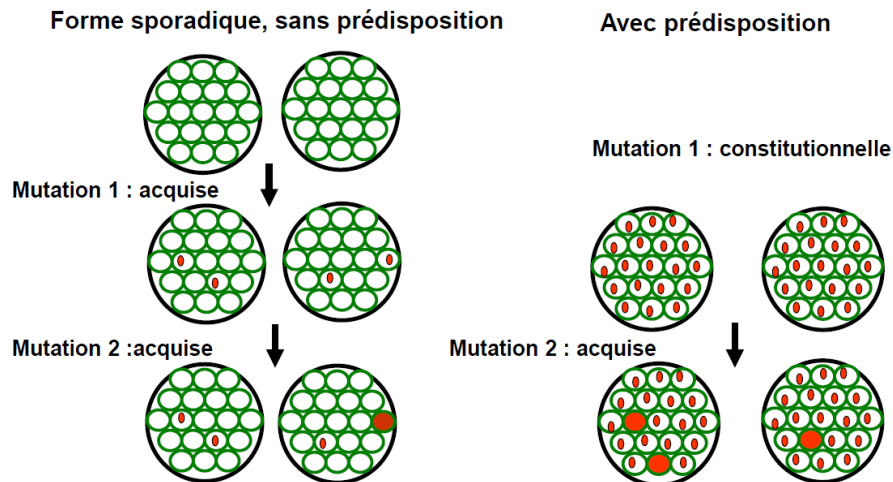


Figure 12: Modèle de Knudson dans le rétinoblastome

En 1973, Comings complète cette hypothèse en ajoutant que les deux altérations génétiques doivent intervenir sur les deux allèles d'un même gène⁷⁹.

On peut, par extension, appliquer cette hypothèse aux gènes suppresseurs de tumeur. Les deux copies du gène suppresseur doivent être modifiées, contrairement aux oncogènes. Les caractéristiques générales de ces syndromes de prédisposition aux cancers étant le diagnostic à un âge plus précoce que dans la population générale, la multifocalité et la bilatéralisation des tumeurs en cas d'organes paires, les cancers multiples et l'histoire familiale rapportant plusieurs cas atteints.

b) Événement dans les tumeurs ovariennes avec atteinte de *BRCA1*

i) Variants pathogènes

Plusieurs types d'altérations génétiques peuvent mener à l'inactivation du gène, et donc altérer son expression protéique.

La présence de variants pathogènes ponctuels dans le gène est le mécanisme le plus connu, qu'ils soient silencieux, faux-sens ou non-sens. De nombreux variants sont décrits dans les gènes *BRCA*, il n'existe pas de hotspot, ces variants sont étalés tout le long du gène. Les corrélations génotypes/phénotypes évoquées dans quelques articles, n'ont à ce jour pas été prouvées.

Des grands réarrangements dans les gènes *BRCA* sont également décrits, plus fréquemment dans le gène *BRCA1* que dans *BRCA2*, ces grands réarrangements aboutissent à l'exclusion d'un ou plusieurs exons.

Dans les prédispositions familiales aux cancers du sein et de l'ovaire, le premier hit, d'après le modèle de Knudson, est une mutation de ce type.

D'après la base UMD, qui rassemble les données de tous les centres français, 930 variants pathogènes distincts dans le gène *BRCA1* ont été rapportés, et 1002 variants pathogènes dans *BRCA2* ont été rapportés⁸⁰.

ii) Perte d'hétérozygotie

On définit la perte d'hétérozygotie au sein d'une cellule comme la perte de matériel génétique provenant de l'un des deux parents, provoqué par une mutation d'effacement ou une perte chromosomique entraînant une hémizygotie anormale. Dans le cadre des prédispositions liées à *BRCA1/2*, une perte de l'allèle sauvage au profit de l'allèle porteur de la mutation est observée. Finalement, cette extinction aboutit à la perte d'expression de la protéine BRCA1 ou BRCA2 selon le gène affecté, et donc la perte de la recombinaison homologue, et enfin une instabilité génomique. Cette perte d'hétérozygotie est également observée dans les tumeurs sans variant pathogène retrouvé. Suggérant que d'autres mécanismes mènent à l'inactivation de ces gènes^{81, 82}. Ce phénomène est principalement retrouvé dans les tumeurs séreuses de haut grade, et concerne plus fréquemment le gène *BRCA1* que le gène *BRCA2* (87,2% pour *BRCA1* versus 52,9% dans *BRCA2*⁸¹).

Cet évènement est considéré comme le deuxième hit si on reprend le modèle de Knudson.

iii) Méthylation du promoteur

La méthylation est un phénomène épigénétique, permettant le maintien et la régulation du génome. Cette modification n'altère pas la séquence génomique. Sur le plan biochimique, la méthylation consiste à ajouter, via une liaison covalente par la famille d'enzymes DNMT (DNA MéthylTransferase), un groupement méthyl en position 5 d'une cytosine d'un dinucléotide CpG, et forme donc une 5-méthyl-cytosine⁸³ (figure 13).

Il existe des régions riches en dinucléotides CpG, si ces régions font plus de 500 paires de base et sont composées de plus de 55% de CpG, elles sont définies comme étant des îlots CpG. 50% des îlots CpG sont localisés au niveau des régions TSS (transcription start site) des gènes, situées au niveau des régions promotrices en 5' de nombreux gènes^{84, 85} (Figure 14).

La méthylation de ces sites module l'expression de ces gènes. En effet, si cette région n'est pas méthylée, les facteurs de transcription peuvent se fixer et transcrire le gène. A l'inverse, en cas de méthylation de cette région, les facteurs de transcription ne peuvent se fixer et la transcription est abolie. Environ la moitié de nos gènes présente un promoteur riche en CpG. Si on observe la méthylation normale du génome, près de 80% des CpG hors des îlots sont méthylés, à l'inverse, les CpG présents dans les îlots sont généralement non méthylés⁸⁶.

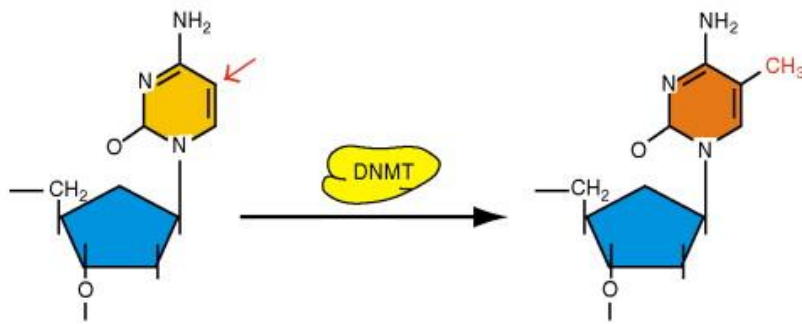


Figure 13: méthylation d'une cytosine (Source : Kulis 2010⁸⁶)

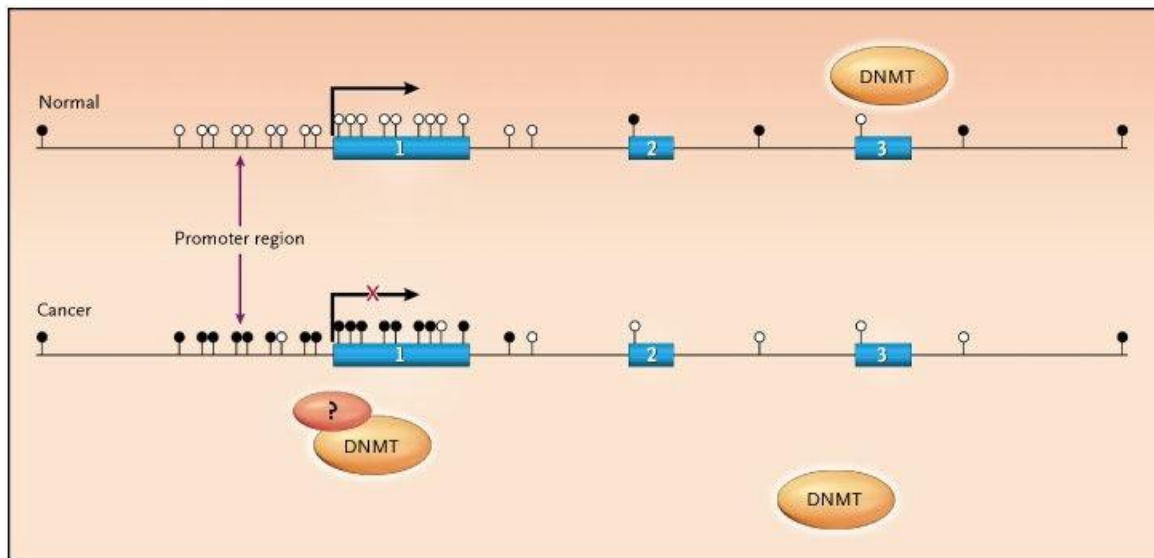


Figure 14: Représentation d'un îlot CpG dans la région promotrice d'un gène suppresseur de tumeur, dans des cellules normales et tumorales (Source : Herman 2003⁸⁵)

Dans les cancers⁸⁷, une dérégulation de la méthylation de l'ADN est observée. Globalement, les cellules cancéreuses présentent une diminution de la méthylation comparée aux cellules normales. Cette hypométhylation du génome est à l'origine d'une instabilité génomique et peut également activer la transcription d'oncogènes normalement inactivés⁸⁷. Une hyperméthylation des promoteurs de certains gènes est également observée, en particulier au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs.

Il est intéressant de noter que chaque type tumoral a son propre méthylome. En effet, les gènes inactivés via l'hyperméthylation du promoteur dans les cancers du côlon sont différents de ceux qui seront inactivés dans le cancer du sein^{85, 88}.

Le gène *BRCA1* ayant un îlot CpG dans son promoteur, l'hypothèse selon laquelle le promoteur de *BRCA1* pourrait être méthylé dans les tumeurs de son spectre (sein et ovaire) a été avancé pour la première fois par Dobrovic en 1997⁸⁹. Après avoir analysé la méthylation de sept carcinomes mammaires sporadiques, deux tumeurs présentaient une hyperméthylation du promoteur. Une autre étude analysait en parallèle cette méthylation dans des lignées cellulaires de cancers du sein sporadique, sur les six lignées, l'une d'elle présentait une hyperméthylation, et était associé à une

diminution drastique de l'expression de l'ARN messager de *BRCA1*⁹⁰. Deux ans plus tard, cette même équipe confortait ces résultats par l'analyse de 21 tumeurs du sein, trois d'entre elles présentaient une hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* et des taux d'expression protéiques de *BRCA1* très bas comparés aux tumeurs ne présentant pas l'hyperméthylation⁹¹. Ces études suggéraient alors que l'hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* était un mécanisme induisant l'inactivation transcriptionnelle de *BRCA1* dans la carcinogénèse mammaire sporadique.

En 2000, Baldwin publiait la première étude mettant en évidence la présence de la méthylation du promoteur de *BRCA1* dans des tumeurs ovariennes dans 12% des tumeurs analysées (étude réalisée sur 98 tumeurs ovariennes), et l'immunohistochimie réalisée en parallèle montrait une absence d'expression protéique de *BRCA1*⁹².

La même année, l'équipe d'Esteller avait également analysé la méthylation du promoteur de *BRCA1* dans des tumeurs du sein et de l'ovaire et avait retrouvé, sur 31 tumeurs sporadiques de l'ovaire, quatre tumeurs présentant une méthylation, soit 13%. Il est à noter que ces tumeurs présentaient également une perte d'hétérozygotie. En revanche, dans les tumeurs ne présentant pas de perte d'hétérozygotie (18 sur 31 tumeurs), aucune n'était méthylée⁹³. (Tableau 3)

Tableau 3: pourcentage de tumeurs ovariennes présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1* dans la littérature

	Nombre de tumeurs analysées	Méthylation
Baldwin 2000 ⁹²	98 tumeurs ovariennes sporadiques	12%
Bol 2010 ⁹⁴	50 carcinomes ovariens sporadiques	14%
Rzepecka 2012 ⁸¹	241 carcinomes ovariens	13,7%
Esteller 2000 ⁹³	31 tumeurs du sein et de l'ovaire	13%
TCGA 2011 ⁹⁵	489 carcinomes séreux de haut grade	11%
Cunningham 2014 ⁹⁷	482 adénocarcinomes ovariens	9,4%
Weren 2017 ⁹⁸	127 adénocarcinomes ovariens	10,2%

Plusieurs études ont montré que la méthylation du promoteur de *BRCA1* n'était jamais associée à un variant pathogène de ce gène mais toujours associée à une perte d'hétérozygotie, suggérant que, d'après le modèle de Knudson, la méthylation serait le premier événement, suivi d'une perte d'hétérozygotie^{89, 96, 97}.

La méthylation du promoteur de *BRCA2* a également été étudiée, néanmoins, son impact au niveau tumoral n'a pas été démontré⁹⁹.

B. Autres gènes impliqués dans les cancers de l'ovaire

Plusieurs gènes ont été décrits comme prédisposant aux carcinomes ovariens, tubaires et péritonéaux. On peut diviser ces gènes en deux catégories : ceux impliqués dans la recombinaison homologue, et ceux impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN et à l'origine du syndrome de Lynch¹⁰⁰ (figure 15).

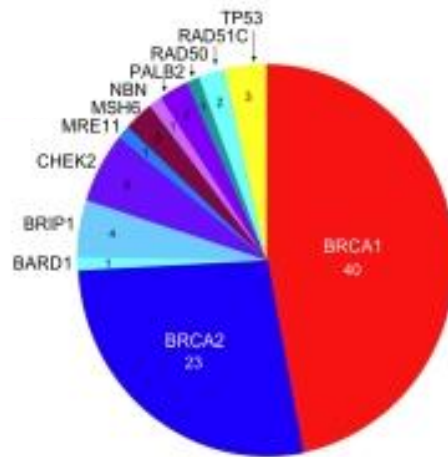


Figure 15: variants pathogènes constitutionnels retrouvés dans les carcinomes ovariens, tubaires et péritonéaux chez 360 patientes (source : Walsh 2011¹⁰⁰)

1) Gènes impliqués dans la recombinaison homologue

Comme vu précédemment, la voie de la recombinaison homologue implique plusieurs protéines autres que BRCA1 et BRCA2. La perte d'expression de certaines de ces protéines a été démontrée comme augmentant le risque de développer un cancer de l'ovaire.

C'est notamment le cas du gène *RAD51* et ses paralogues *RAD51C* et *RAD51D* codant pour les protéines du même nom. En cas de cassures double brin de l'ADN, ce sont ces protéines qui vont chercher la séquence homologue et débiter l'appariement avec l'ADN simple brin lésé¹⁰¹.

Le risque de développer un cancer de l'ovaire en cas de variant pathogène dans *RAD51C* ou *RAD51D* est élevé, proche du risque des femmes porteuses d'une mutation dans *BRCA2*. En cas de mutation de *RAD51C*, par exemple, le risque de développer une tumeur de l'ovaire à 80 ans est de 9%¹⁰². Des mutations dans ces gènes sont maintenant recherchées, en routine, en cas de tumeur ovarienne.

D'autres gènes impliqués dans la recombinaison homologue ont été décrit comme favorisant le risque de développer un cancer de l'ovaire, comme *BRIP1*, *ATM/ATR*, *CHEK2*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD50*^{62, 12, 103, 102, 104, 105, 106}.

2) Syndrome de Lynch

Les gènes MMR (Mismatch Repair) codent pour des protéines impliquées dans la réparation des mésappariements de l'ADN lors de la réplication. Ce sont également des gènes suppresseurs de tumeur.

Plusieurs gènes sont impliqués dans ce syndrome, ils codent pour des protéines jouant un rôle dans cette voie de réparation : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. Un autre gène, *EPCAM*, est également impliqué dans ce syndrome bien qu'il ne code pas de protéine de cette voie, mais une délétion d'*EPCAM* entraîne une méthylation du promoteur *MSH2*, et donc la perte d'expression protéique de *MSH2*¹⁰⁶.

Le spectre tumoral de ce syndrome est divisé en deux : étroit et élargi. Le spectre étroit définit les cancers ayant un risque relatif élevé, supérieur à 8, de se développer chez les patients porteurs de mutation dans ces gènes comparé à la population générale, il regroupe le cancer colorectal, le cancer de l'endomètre, le cancer des voies urinaires supérieures, et le cancer de l'intestin grêle. Dans le spectre élargi, sont ajoutés les cancers ayant un risque relatif modéré de se développer, entre 5 et 8, tels les cancers gastrique, ovarien, le cholangiocarcinome, le glioblastome et les tumeurs cutanées (kérato-acanthomes, adénomes et carcinomes sébacés).

Chez les femmes porteuses de mutations dans les gènes *MMR*, le risque de développer un cancer de l'ovaire est estimé entre 8 et 10%¹⁰⁶.

III. Prise en charge thérapeutique

A. Chirurgie

Le traitement de première intention est la résection complète de la tumeur ovarienne par voie chirurgicale. La résection en marge saines est l'objectif¹⁰⁷.

L'annexectomie bilatérale avec hystérectomie totale est associée à une omentectomie totale, une appendicectomie, un curage ganglionnaire pelvien et aortique infrarénal bilatéral, des biopsies péritonéales, une cytologie péritonéale, par laparotomie.

B. Chimiothérapie

Les patientes porteuses d'une mutation *BRCA*, présentent une sensibilité accrue aux sels de platine¹⁰⁷.

La chimiothérapie est indiquée à titre adjuvant après chirurgie complète. Lorsque la chirurgie complète d'emblée n'est pas envisageable, une chimiothérapie néoadjuvante est indiquée.

La chimiothérapie est à base de sels de platine (Cisplatine ou carboplatine). Un cancer de l'ovaire est dit platine-sensible, si aucune rechute n'intervient dans les six premiers mois post-chimiothérapie.

À la suite de ces traitements (chirurgie et chimiothérapie), le pourcentage de rechute est estimé à 70%, et une seconde chimiothérapie est requise^{108, 18}. Les tumeurs platine-sensibles ont une bonne réponse à une seconde chimiothérapie à base de sels de platine. Cependant, la toxicité cumulée et l'apparition de résistance limitent l'utilisation de ces traitements^{109, 110}. En effet, les autres traitements cytotoxiques restent peu efficaces sur ces tumeurs.

Les sels de platine agissent comme des agents alkylants, c'est-à-dire qu'ils se fixent sur les bases puriques de l'ADN, et forment des ponts inter brins dans l'ADN.

C. Les inhibiteurs de PARP

Dans ce contexte, de nouvelles thérapies étaient attendues afin de mieux traiter le cancer de l'ovaire, et les inhibiteurs de PARP ont émergés^{111, 112}.

1) Rôle des protéines PARP

Les Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) 1 et 2 sont des enzymes impliquées dans la réparation des cassures simples brins de l'ADN, par le biais de la voie BER (Base excision pathway)¹¹³. Ces enzymes se lient à l'ADN au niveau de la cassure simple brin et recrutent les autres acteurs de la réparation.

En présence d'inhibiteur de PARP, l'activité catalytique de ces enzymes est inhibée, empêchant la réparation de ces cassures et menant à des cassures doubles brins. En effet, au cours de la phase de réplication, ces cassures simples brins se transforment en cassures double brin.

Plusieurs équipes ont démontré que les inhibiteurs de PARP piègent l'enzyme PARP sur l'ADN et empêche la dissociation PARP-ADN essentielle à l'action de la voie BER^{114, 115}.

Les enzymes PARP joueraient également un rôle dans la NHEJ¹¹⁶.

2) Concept de léthalité synthétique

En 2005, deux études ont démontré l'efficacité, *in vitro* et *in vivo* sur l'animal, des inhibiteurs des poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) sur les cellules tumorales déficitaires pour *BRCA* alors qu'ils restaient sans effet sur les cellules tumorales sans déficit^{117, 118}.

Dans le cas d'une cellule normale, en présence d'inhibiteur de PARP, la réparation des cassures double brin s'effectue par recombinaison homologue et reste sans conséquence. En revanche, en cas de déficit en *BRCA*, des voies de réparation autre que la recombinaison homologue sont mises en jeu telle la NHEJ, pourvoyeuse de nombreuses erreurs, et va mener à la mort de la cellule. Ce synergisme est appelé léthalité synthétique (figure 16).

Autrement dit, il faut l'inhibition des deux voies pour aboutir à la mort cellulaire, alors que si l'une ou l'autre des voies reste active, la cellule peut survivre.

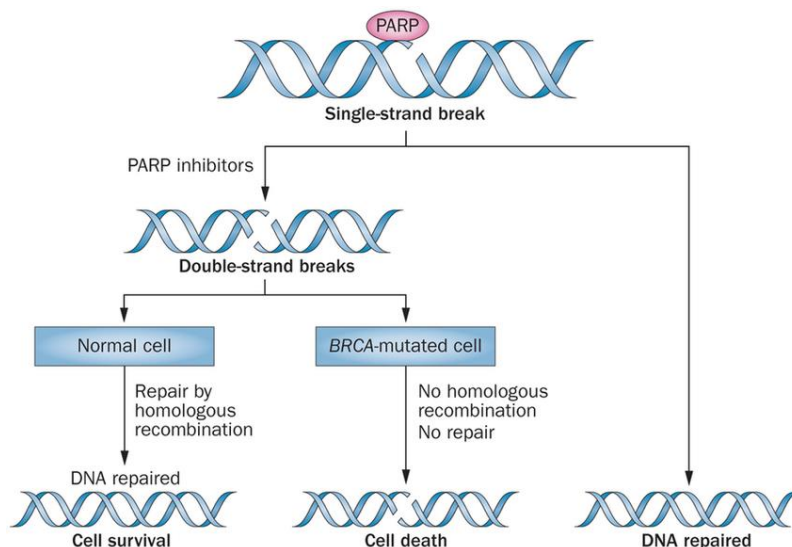


Figure 16: concept de létalité synthétique des inhibiteurs de PARP (Source : Sonnenblick 2014¹¹⁹)

3) Essais cliniques

À la suite de ces études chez l'animal, des essais cliniques chez l'homme ont été réalisés, dans le cadre de traitement de maintenance en cas de rechute.

Une étude de phase I, publiée en 2009, a testé la tolérance de l'Olaparib (AstraZeneca), le premier inhibiteur de PARP, sur 60 personnes atteintes de divers cancers, dont un tiers de l'ovaire et 22 porteuses d'une mutation germinale de *BRCA*. Les résultats ont montré un effet anti-tumoral chez les patientes porteuses d'une mutation constitutionnelle de *BRCA*. Avec 63% de bénéfices cliniques (réponse tumorale ou maladie stable pendant au moins quatre mois)¹²⁰.

Une étude de phase II, incluant 57 patientes avec un cancer de l'ovaire récidivant et porteuses d'une mutation *BRCA*, a confirmé l'activité de l'Olaparib avec un taux de réponse tumorale de 33% au dosage le plus élevé (400mg deux fois par jour) et une durée médiane de réponse de 5 à 8 mois¹²¹.

Une autre étude de phase II dont les résultats ont été publiés en 2012, randomisée, en double aveugle concernait des femmes présentant une récurrence de tumeur sévère de l'ovaire platine sensible et ayant reçu au moins deux traitements par platine. La prise d'Olaparib, à la dose de 400mg fois deux par jour, a montré une nette augmentation de la survie sans progression comparée au groupe recevant le placebo (8,4 mois versus 4,8 mois, $p < 0,001$)⁶⁸. En 2014, la même équipe a réanalysé ces résultats en prenant en compte la présence ou non de mutation constitutionnelle ou somatique dans les gènes *BRCA*, et a montré que la médiane de survie sans progression était significativement allongée chez les patientes présentant une mutation *BRCA* et traitées par Olaparib comparé aux patientes mutées *BRCA* recevant le placebo (11,2 mois versus 4,2 mois)¹²².

Une étude de phase III concernait les patientes ayant un cancer de l'ovaire en rechute, platine sensible, sévère de haut grade ou endométrioïde, le traitement débutait huit semaines après la fin de leur dernière cure de chimiothérapie à base de sels de platine. La survie sans progression était significative avec 19,1 mois sans récurrence versus 5,5 mois dans le groupe placebo¹²³.

D'autres études ont également été réalisées en utilisant les inhibiteurs de PARP en traitement seul chez les femmes ayant un carcinome de l'ovaire séreux de haut grade et porteuse d'une mutation *BRCA* constitutionnelle^{124, 125}.

4) Obtention de l'autorisation de mise sur le marché

Le 19 décembre 2014, l'Olaparib devient le premier inhibiteur de PARP à obtenir l'autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) et de l'EMA (European Medicines Agency) chez les patientes porteuses d'une mutation *BRCA* avec un cancer séreux de haut grade de l'ovaire, des trompes de Fallope, ou péritonéal primitif, en rechute après au moins deux lignes de traitements.

L'AMM est obtenue en Europe, en Australie et au Canada comme suit : « En monothérapie pour le traitement d'entretien des patientes adultes atteintes d'un cancer épithélial séreux de haut grade de l'ovaire, des trompes de Fallope ou péritonéal primitif, récidivant et sensible au platine avec une mutation du gène *BRCA* (constitutionnelle ou somatique) et qui sont en réponse (complète ou partielle) à une chimiothérapie à base de platine »^{126, 127}.

L'Olaparib est prescrit en monothérapie, à la dose de 400mg deux fois par jour, matin et soir. Il faut le débiter moins de 8 semaines après le dernier cycle de chimiothérapie (figure 17).

Actuellement, il n'y a pas d'indication à proposer un traitement par Olaparib en cas de rechute réfractaire ou résistante.

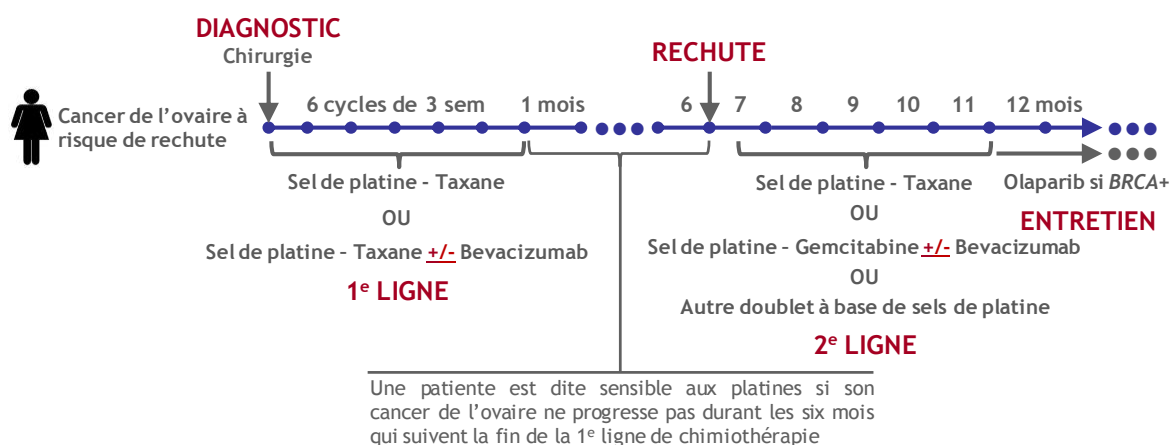


Figure 17: schéma thérapeutique des femmes porteuses d'un cancer de l'ovaire

IV. Recherche de mutations dans les gènes *BRCA* dans le cancer de l'ovaire

Avant l'autorisation de mise sur le marché des inhibiteurs de PARP, une analyse constitutionnelle des gènes *BRCA* était préconisée devant des critères familiaux de cancers du sein et de l'ovaire¹²⁸ :

-Au moins deux cas de cancers du sein chez des femmes dont au moins un cas avant 40 ans, apparentées au premier degré ou de deuxième degré via un homme.

-Au moins un cas de cancer du sein et un cas de cancer de l'ovaire chez des femmes apparentées au premier degré ou de deuxième degré via un homme.

-Au moins un cas de cancer du sein ou de l'ovaire chez une femme et un cas de cancer du sein chez l'homme chez des apparentés au premier degré ou de deuxième degré via un homme.

-Au moins trois cas de cancer du sein ou de l'ovaire chez des apparentés de premier degré ou de deuxième degré appartenant à la même branche familiale

A l'heure actuelle, et depuis l'arrivée des inhibiteurs de PARP, l'analyse des gènes *BRCA1* et *BRCA2* est recommandée d'emblée dès le diagnostic d'une tumeur épithéliale de haut grade de l'ovaire, ou du péritoine primitive, ou des trompes de type séreuse, endométrioïde, indifférenciée, carcinosarcome ou à cellules claires. Cette analyse est justifiée par le fait que plus de 15% des femmes porteuses de ces tumeurs ont une mutation dans les gènes *BRCA*, et, parmi elles, près de la moitié ne présentent pas d'antécédents familiaux suggérant une prédisposition à ce syndrome.^{62, 129, 130}

En France, cette analyse se réalise d'abord sur un prélèvement sanguin à la recherche d'une mutation constitutionnelle, après consultation d'oncogénétique et après obtention d'un consentement libre et éclairé. Si aucun variant pathogène n'est retrouvé, une analyse sur échantillon tumoral fixé en formaline et inclus en paraffine (FFPE) sera réalisée.

En cas de rechute sensible (apparaissant plus de 6 mois après la fin du traitement), si le statut *BRCA* est inconnu, la consultation initiale de génétique est organisée selon un circuit rapide et les analyses constitutionnelles et tumorales seront réalisées en parallèle.

V. Objectif de l'étude

Actuellement, seules les femmes présentant une tumeur épithéliale de haut grade ovarienne, péritonéale primitive ou tubaire avec un variant pathogène de *BRCA1/2* constitutionnel ou tumoral est éligible au traitement par anti-PARP, ce qui représente environ 20% des patientes.

Etant donné que la méthylation du promoteur de *BRCA1* réprime la transcription du gène, il n'y a donc plus d'expression de la protéine BRCA1, et donc un défaut de réparation par recombinaison homologue. Nous faisons donc l'hypothèse que les tumeurs présentant une hyperméthylation de ce promoteur soient également sensibles aux inhibiteurs de PARP.

L'objectif de cette étude est donc de mettre au point une technique d'analyse de la méthylation du promoteur de *BRCA1* sur les tumeurs ovariennes applicable en routine et d'évaluer le nombre de tumeurs présentant cette anomalie, au sein du laboratoire de biologie moléculaire de Nantes.

Matériel et méthodes

I. Choix de la méthode d'étude de la méthylation

A. Pyroséquençage

La première étape du projet consistait à sélectionner la méthode d'analyse de la méthylation. Etant donné que cette étude était réalisée sur des échantillons tumoraux, il était important d'avoir une méthode quantitative. L'analyse de la méthylation par pyroséquençage était donc apparue comme la technique idéale, étant donné sa reproductibilité, et le fait qu'elle était quantitative. L'inconvénient étant que cette technique analysait des fragments courts (120 bases maximum)^{131, 132}.

L'analyse par pyroséquençage se divisait en plusieurs parties. Tout d'abord, il fallait traiter l'ADN avec du bisulfite, puis amplifier la région souhaitée par PCR, et enfin réaliser la réaction de pyroséquençage^{133, 134}.

B. Sélection des îlots CpG du promoteur de *BRCA1* à analyser

L'îlot CpG de la région promotrice de *BRCA1* mesure 2kb. Il était donc difficile d'analyser toute cette région par pyroséquençage. Comme décrit dans les articles analysant la méthylation du promoteur de *BRCA1*, la région analysée a été celle présente dans l'exon 1B du gène *BRCA1*, mesurant 313kb, juste avant le TSS et comportant 11 CpG^{99, 135, 136, 137, 138, 139, 140} (figure 18).

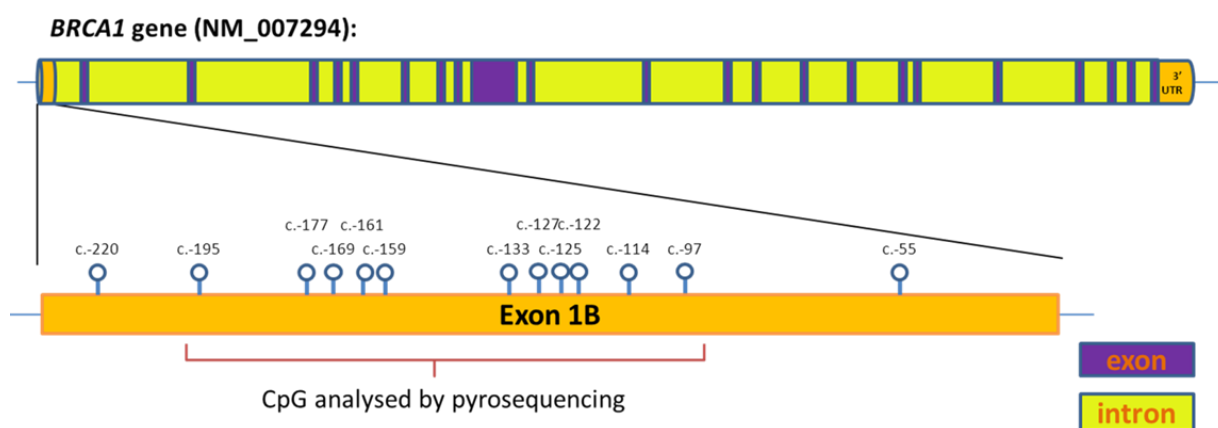


Figure 18: localisation de la région promotrice du gène *BRCA1* analysée et des CpG étudiés

II. Patientes

À la suite de l'obtention de l'AMM pour l'Olaparib, la recherche de variants pathogènes dans les gènes *BRCA1/2* se réalise aussi bien au niveau tumoral que constitutionnel, chez les femmes ayant un cancer de l'ovaire.

Depuis avril 2016, le laboratoire de biologie moléculaire de Nantes réalise en diagnostique la recherche de variants pathogènes tumoraux dans les gènes *BRCA* par séquençage haut débit sur lame FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) en utilisant le kit BRCA Tumor plus Dx de Multiplicom et le séquenceur MiSeq Illumina¹⁴¹.

Les patientes sélectionnées pour l'analyse de la méthylation du promoteur de *BRCA1* étaient celles pour qui la recherche de variants pathogènes de *BRCA1* et *BRCA2* était négative. Les échantillons présentant un résultat ininterprétable n'étaient pas sélectionnés.

III. Estimation du pourcentage tumoral

Afin de pouvoir interpréter au mieux la méthylation ainsi que la perte d'hétérozygotie, chaque lame était réanalysée au sein du laboratoire d'anatomo-pathologie de Nantes pour estimer le pourcentage de cellules tumorales.

IV. Contrôles positifs et négatifs

Afin de valider la méthode, il a été utilisé un contrôle positif hyperméthylé. Pour l'obtenir, nous avons utilisé l'enzyme CpG Methyltransferase M.SssI (bioLabs) sur un ADN contrôle du laboratoire, le principe de cette enzyme étant de méthyliser tous les CpG de l'ADN.

Pour les témoins négatifs, le service d'anatomo-pathologie de Nantes nous avait fourni dix lames FFPE d'ovaire sain. Les pathologies présentées par ces patientes sont décrites dans le tableau 4. Ces échantillons n'ayant pas de potentiel malin, ils ne présentaient pas de méthylation du promoteur.

Tableau 4: témoins négatifs étudiés et pathologies expliquant l'ovariectomie chez ces patientes.

Numéro	Histologie
1	Carcinome rénal à cellules claires
2	Kyste folliculaire
3	Endométriose
4	Cystadénome mucineux controlatéral
5	Adénocarcinome endométrial séreux à cellules claires
6	Endométriose
7	Endométriose
8	Annexectomie bilatérale à la suite d'un cancer du sein
9	Kyste folliculaire
10	Kyste folliculaire

V. Extraction de l'ADN tumoral

L'ADN tumoral des lames FFPE a été extrait selon le protocole de routine du laboratoire grâce au kit Maxwell de Promega.

VI. Traitement au bisulfite

Le principe du traitement par bisulfite est de convertir les cytosines en uracile, sans modifier les 5-méthylcytosines. De ce fait, après traitement par bisulfite, les cytosines non méthylées sont converties en uracile, et les cytosines méthylées restent des cytosines. Du coup, après analyse d'un ADN traité par bisulfite, les cytosines restantes sont des cytosines méthylées (figure 19).

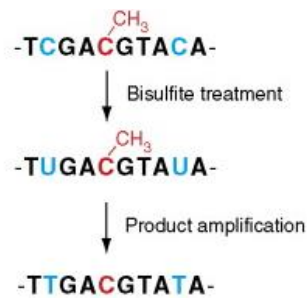


Figure 19: traitement au bisulfite (Source : Kulis 2010⁸⁷)

Le traitement au bisulfite des échantillons a été réalisé avec le kit EpiTect bisulfite de QIAGEN, selon le protocole appliqué au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Nantes. Le protocole se divisait en plusieurs étapes. Tout d'abord la réaction bisulfite sur un microgramme d'ADN, cette conversion se réalisait grâce à un thermocycleur. Ensuite la purification de l'ADN traité grâce à plusieurs tampons de lavage, puis la désulfonation et enfin la précipitation, qui nous permettait de récupérer 40 microlitres d'ADN traité.

VII. Réaction de PCR

Afin de réaliser notre PCR (Polymerase chain reaction), deux couples d'amorces étaient utilisés (figure 5). Dans chaque couple, l'amorce liée au brin d'ADN que l'on souhaitait analyser par pyroséquençage était biotinylée.

La PCR était réalisée grâce au kit HotStarTaq de QIAGEN.

Tableau 5: Amorces utilisées pour le pyroséquençage

		5' – 3'
Région cible 1	Forward	(biotine)TGATTTAGTATTTTGAGAGGTTGTTGTT
	Reverse	CAATTATCTAAAAAACCCCAACCTA
Région cible 2	Forward	GTATTTTGAGAGGTTGTTGTT
	Reverse	(biotine)AAAACCCCAACCTATCC

La réaction de PCR se divise en trois étapes : la dénaturation qui permet de séparer les deux brins d'ADN à 94°C pendant 30 secondes, puis l'appariement de nos amorces sur les brins d'ADN, à 61°C pendant 30 secondes, et l'élongation, c'est-à-dire l'allongement de l'ADN grâce à la polymérase, à 72°C pendant 30 secondes. Ces étapes ont été répétées 45 fois afin d'obtenir une quantité suffisante de copies du brin d'ADN de référence pour le pyroséquençage (figure 20).

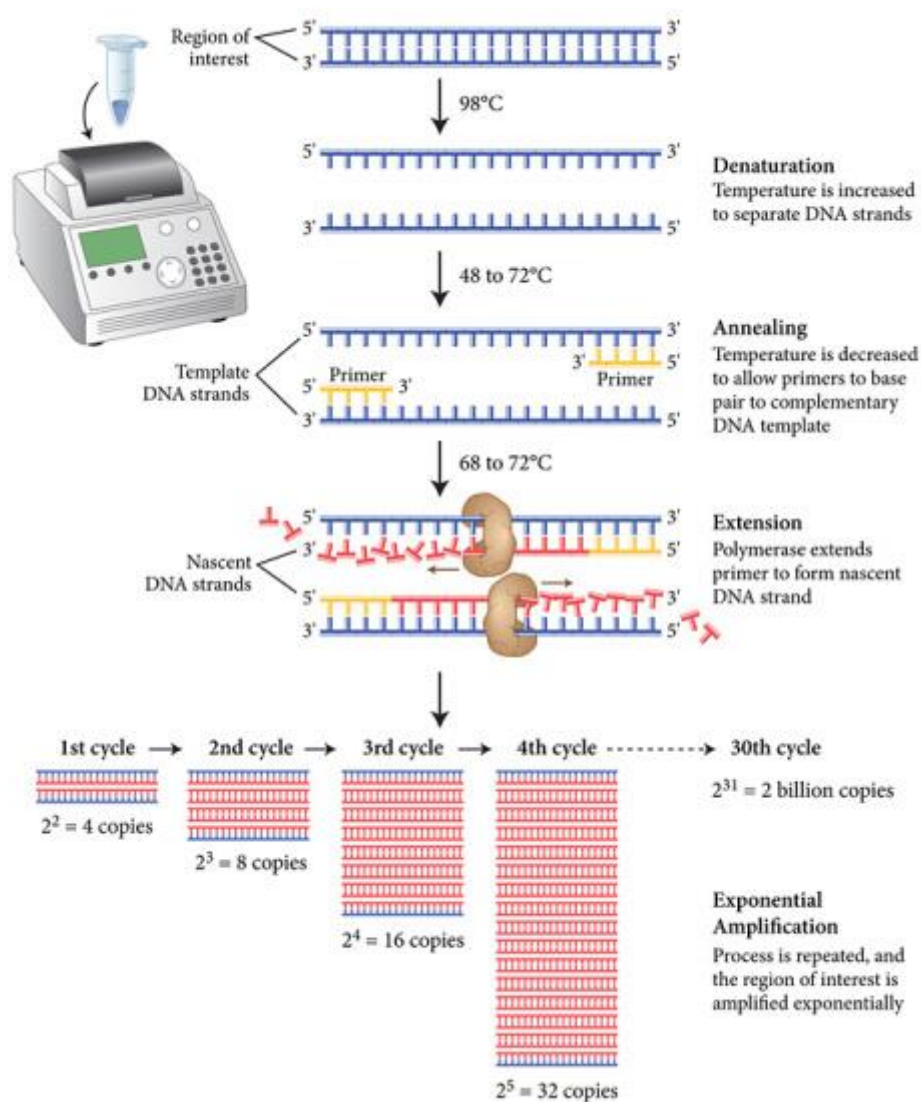


Figure 20: principe de la PCR (source : <https://mesuturkey.files.wordpress.com/2014/04/pcr.jpg>)

Une migration sur gel d'agarose à 1,5% nous permettait de vérifier si la PCR avait bien marché.

VIII. Pyroséquençage

La réaction de pyroséquençage se divise en six étapes.

La première étape consistait à isoler le brin d'ADN à analyser, c'est-à-dire celui porteur de l'amorce biotinylée. Pour cela, les produits PCR étaient immobilisés sur les billes de Sépharose-steptavidine.

La deuxième étape consistait à mélanger les éléments essentiels à la réaction de pyroséquençage. C'est à dire un troisième primer qui se fixait sur notre brin biotinylé juste avant la séquence d'intérêt, des ADN polymérases qui allongaient le brin d'ADN et les enzymes nécessaires à la réaction : l'ATP sulfurylase, la luciférase et l'apyrase, ainsi que leurs substrats.

La troisième étape consistait à ajouter le premier deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP). La polymérase catalysait l'addition de ce dNTP. Si ce dNTP était complémentaire de notre brin de référence, il était intégré à la séquence et donc libérait un pyrophosphate. La quantité de pyrophosphate relarguée était proportionnelle au taux de nucléotides incorporés. A l'inverse, si le nucléotide n'était pas complémentaire, rien ne se passait (Figure 21).

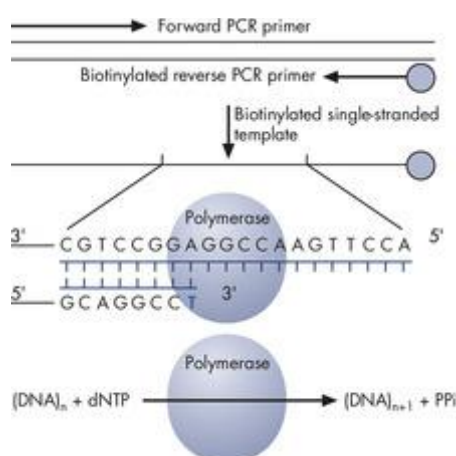


Figure 21: étapes 1 à 3 du pyroséquençage (source : <https://www.qiagen.com>)

La quatrième étape consistait à convertir le pyrophosphate (PPi) en ATP grâce à l'adénosine 5' phosphosulfate (APS). Cet ATP permettait de convertir la luciférine en oxyluciférine qui génèrait un signal lumineux proportionnel au taux d'ATP. Ce signal était détecté par une caméra et traduit en pic sur un pyrogramme. La taille de chaque pic était proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés (Figure 22).

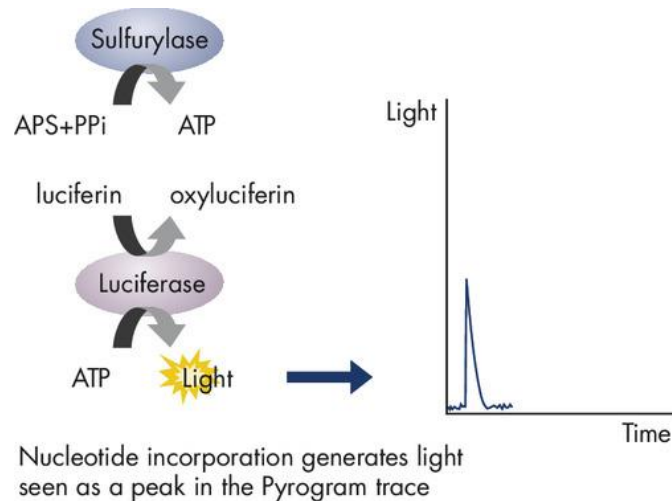


Figure 22: étape 4 du pyroséquençage (source : <https://www.qiagen.com>)

L'étape 5 consistait à détruire les nucléotides non incorporés ainsi que l'ATP grâce à l'enzyme Apyrase. Cette étape était essentielle avant l'ajout de nouveaux dNTPs (Figure 23).

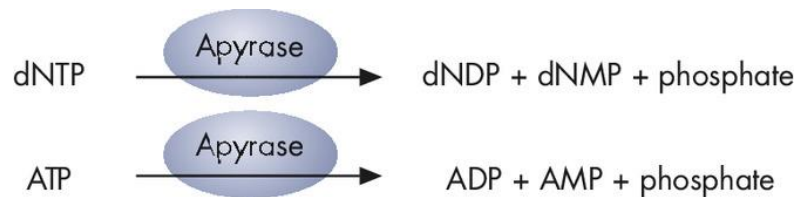


Figure 23: étape 5 du pyroséquençage (source : <https://www.qiagen.com>)

L'étape 6 consistait à allonger le brin selon la complémentarité entre notre brin source et les nucléotides ajoutés séquentiellement (figure 24).

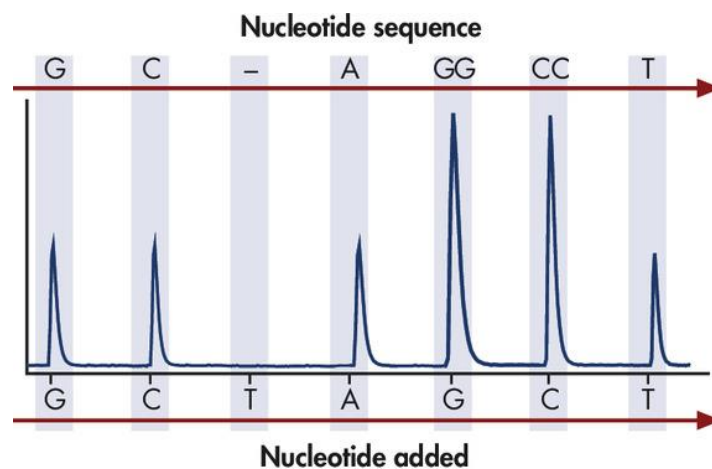


Figure 24: étape 6 du pyroséquençage. Ici, l'intégration d'une guanine par la polymérase entraîne la libération d'un pyrophosphate qui, via la sulfurylase, va se transformer en ATP puis, via la Luciferase, cet ATP va émettre un signal lumineux qui va être capté par le pyroséquenceur et traduit par un pic sur le pyrogramme. Si deux mêmes bases sont intégrées, le pic sera deux fois plus haut. (Source : <https://www.qiagen.com>)

Dans le cadre de l'étude de la méthylation des CpG, à une position CpG donnée, une tyrosine était d'abord incorporée suivie d'une cytosine. Nous obtenions deux pics successifs sur notre pyrogramme correspondant à une même position. En cas de méthylation, le traitement au bisulfite n'avait pas transformé la cytosine, une cytosine était donc incorporée. A l'inverse, en l'absence de méthylation, la cytosine était transformée en uracile (puis en tyrosine), une tyrosine était donc incorporée. Le ratio du taux de cytosine sur le taux de tyrosine était réalisé et le pourcentage obtenu reflétait le taux de méthylation (figure 25).

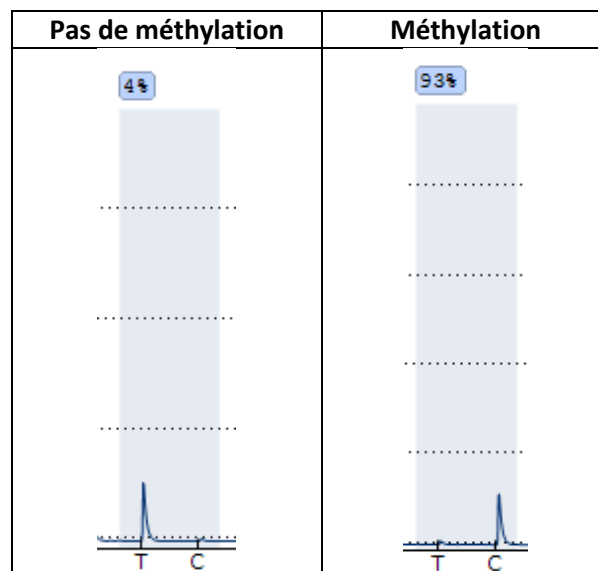


Figure 25: comparaison de pyrogramme selon le statut méthylé ou non du CpG

IX. Analyse bio-informatique des résultats

Le pyrogramme était analysé grâce au logiciel fourni par QIAGEN : Pyromarq Q24 Advanced assay.

La qualité de l'analyse était assurée grâce à l'intégration de contrôles négatifs ainsi qu'un contrôle bisulfite. Les contrôles négatifs consistaient à incorporer un nucléotide ne devant pas être intégré, afin de s'assurer que la réaction était spécifique (aucun pic ne devait être vu). Le contrôle bisulfite consistait à incorporer une cytosine en dehors d'un CpG, c'est-à-dire qu'après traitement au bisulfite, les cytosines à cet endroit devaient être totalement transformées en uracile, aucun pic ne devait donc être vu.

La méthylation globale était calculée en faisant la moyenne de la méthylation des 11 sites CpG analysés.

Le seuil de positivité de méthylation était défini à 10%.

X. Etude de la perte d'hétérozygotie

La perte d'hétérozygotie était déterminée en analysant les résultats du séquençage haut débit des gènes *BRCA* réalisés en première intention, et plus particulièrement les SNP (single nucleotide

polymorphism) fréquents (soit 16 dans le gène *BRCA1* et 20 dans le gène *BRCA2*). Si une patiente présentait un SNP hétérozygote, il était donc présent à 50% sur l'ADN constitutionnel. Sur l'analyse de l'ADN tumoral, si l'allèle porteur du polymorphisme était inhibé, le SNP était retrouvé à un faible pourcentage. A l'inverse, si l'allèle inhibé n'était pas porteur du SNP, le polymorphisme était retrouvé à un taux proche de 100%. Etant donné que les échantillons n'étaient pas constitués à 100% d'ADN tumoral et que des cellules saines étaient présentes, il était important de corréliser ces résultats au pourcentage de cellules tumorales estimés précédemment.

Résultats

I. Population étudiée :

Entre avril 2016 et janvier 2017, 170 échantillons tumoraux de tumeurs épithéliales de haut grade ovarienne, tubaire, péritonéale, ou de localisation secondaire ont été reçus au laboratoire de biologie moléculaire de Nantes afin d'analyser les gènes *BRCA*.

Parmi ces tumeurs, 19 étaient porteuses d'un variant pathogène dans les gènes *BRCA* (11%), 126 ne présentaient pas d'anomalie dans les gènes *BRCA* et 25 étaient ininterprétables (figure 26).

Séquençage des gènes *BRCA1* et *BRCA2*

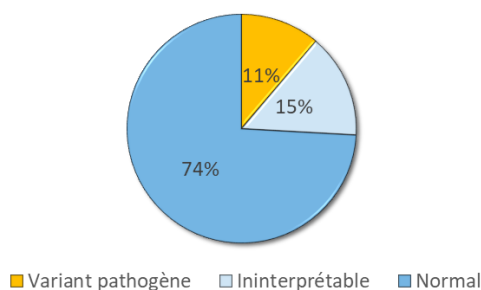


Figure 26: résultats du séquençage des gènes *BRCA1/2*

Les 126 échantillons tumoraux ayant un résultat normal ont donc été analysés par pyroséquençage.

A. Origine des prélèvements

Les prélèvements provenaient de plusieurs centres, localisés dans le grand ouest de la France.

Tableau 6: provenance des échantillons

Département	Nombre	Pourcentage
Loire-Atlantique	37	29,37%
Finistère	36	28,57%
Indre-et-Loire	29	23,02%
Vienne	6	4,76%
Loiret	5	3,97%
Maine-Et-Loire	3	2,38%
Charente-Maritime	3	2,38%
Eure-et-Loir	2	1,59%
Loir-et-Cher	2	1,59%
Deux-Sèvres	1	0,79%
Cher	1	0,79%
Morbihan	1	0,79%

B. Age au diagnostic

La médiane de l'âge au diagnostic était de 65 ans, avec une étendue de 44 à 82 ans.

C. Anatomopathologie

1) Localisation du prélèvement

Les tumeurs étaient principalement ovariennes ou péritonéales (89% des tumeurs), les échantillons pouvaient également concerner des localisations secondaires (ganglionnaire, cérébrale) ou des régions voisines concernées par l'extension de la tumeur (paroi colique, ombilic) (tableau 7).

Tableau 7: sites de prélèvement de l'échantillon tumoral

Localisation	Nombre	Pourcentage
Ovaire	65	51,59%
Péritoine	47	37,30%
Ganglion	4	3,17%
Trompe	3	2,38%
Paroi colique	1	0,79%
Ascite	1	0,79%
Localisation secondaire cérébrale	1	0,79%
Ombilic	1	0,79%
Endomètre	2	1,59%
Epiploon	1	0,79%

2) Type histologique

Toutes les tumeurs étaient épithéliales de haut grade. Le sous-type séreux était majoritairement représenté à 92% (tableau 8).

Tableau 8: caractéristiques histologiques des tumeurs analysées

Histologie	Nombre	Pourcentage
Séreux	116	92,06%
Indifférencié	4	3,17%
Endométrioïde	3	2,38%
À cellules claires	1	0,79%
Carcinosarcome	1	0,79%
Indéterminé	1	0,79%

D. Prélèvement réalisé avant ou après chimiothérapie

Nous savons que la chimiothérapie reçue avant prélèvement peut altérer nos échantillons et donc rendre l'analyse plus difficile, que ce soit le séquençage haut débit ou le pyroséquençage. Parmi nos 126 échantillons, 29 avait été obtenus après chimiothérapie, soit 23%, et 81 avait été prélevés avant chimiothérapie soit 64%. Pour les 16 restants, nous n'avons pas eu accès à l'information.

II. Méthylation du promoteur de *BRCA*

A. Pyrogrammes obtenus selon le statut méthylé ou non

1) Première région cible

Cette région couvrait cinq CpG. Le premier pyrogramme de la figure 26 montre les résultats obtenus en cas d'absence de méthylation. Le deuxième pyrogramme montre les résultats obtenus en cas de méthylation. (Figure 27)

Parmi nos dix témoins négatifs, le taux de méthylation était en moyenne de 3% pour chaque ilot CpG (étendue de 1 à 5%).

Notre témoin hyperméthylé présentait une méthylation moyenne de 84%, médiane de 86%, étendue de 73 à 91%.

Pour un échantillon donné, la méthylation était homogène d'un CpG à l'autre.

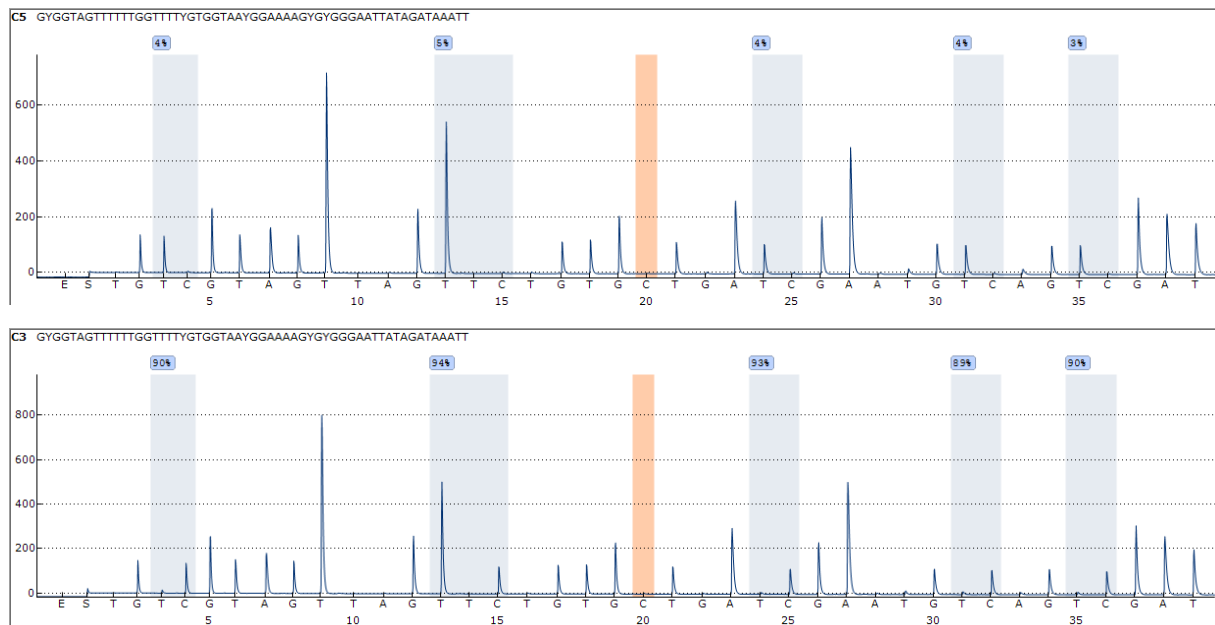
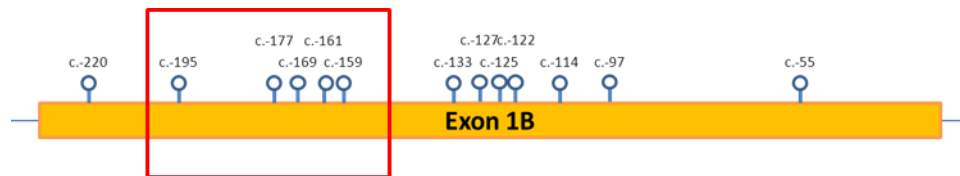


Figure 27: pyrogrammes de la première région étudiée. A) CpG étudiés. B) Pyrogramme d'un témoin négatif. C) Pyrogramme d'un témoin positif.

2) Deuxième région cible

Cette région couvrait six CpG. Le premier pyrogramme montre les résultats obtenus en cas d'absence de méthylation. Le deuxième pyrogramme montre les résultats obtenus en cas de méthylation (figure 28).

Parmi nos dix témoins négatifs, le taux de méthylation était en moyenne de 5% pour chaque ilot CpG (étendue de 2 à 9%).

Pour un échantillon donné, la méthylation était homogène d'un CpG à l'autre.

Notre témoin hyperméthylé présentait une méthylation moyenne de 91%, médiane de 90%, étendue de 89 à 94%.



Figure 28: pyrogramme de la deuxième région étudiée. A) CpG étudiés. B) Pyrogramme d'un témoin négatif. C) Pyrogramme d'un témoin positif.

B. Résultats obtenus dans les échantillons tumoraux

La méthylation du promoteur de *BRCA1* était normale dans 106 tumeurs ovariennes sur nos 126 étudiées.

Cinq résultats n'étaient pas interprétables, probablement dû à la mauvaise qualité de l'ADN extrait.

Quinze tumeurs présentaient une méthylation du promoteur de *BRCA1*.

La méthylation était bien au-dessus de notre seuil fixé à 10%, et présente sur tous les CpG analysés. Néanmoins nous retrouvons une hétérogénéité du pourcentage de méthylation entre chaque CpG, par exemple la patiente n°27 présentait une méthylation moyenne de 60%, le CpG le plus faiblement méthylé était à 21% et le plus méthylé était à 90% (tableau 9).

Tableau 9: Taux de méthylation des échantillons méthylés

Numéro	Tumoralité	Statut	Moyenne	Médiane	Valeur minimale	Valeur maximale
5	60%	Méthylé	42%	43%	34%	62%
8	60%	Méthylé	58%	59%	45%	70%
19	60%	Méthylé	23%	22%	16%	30%
27	80%	Méthylé	60%	60%	21%	90%
36	90%	Méthylé	50%	50%	26%	73%
48	80%	Méthylé	72%	73%	56%	86%
57	80%	Méthylé	29%	36%	30%	41%
71	80%	Méthylé	52%	50%	42%	63%
80	70%	Méthylé	54%	51%	44%	68%
81	80%	Méthylé	65%	63%	54%	77%
88	70%	Méthylé	44%	43%	28%	62%
95	90%	Méthylé	32%	29%	12%	38%
103	70%	Méthylé	60%	60%	47%	76%
113	80%	Méthylé	37%	38%	23%	52%
116	50%	Méthylé	29%	26%	22%	37%

Histologiquement, les tumeurs méthylées étaient majoritairement séreuses de haut grade. Nous avons retrouvé une tumeur endométrioïde présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1* (Tableau 10).

Tableau 10: caractéristiques histologiques des tumeurs méthylées

Numéro	Histologie de la tumeur	Grade	Localisation
5	Adénocarcinome séreux de haut grade péritonéal	haut	péritoine
8	Adénocarcinome séreux de haut grade péritonéal	haut	péritoine
19	Adénocarcinome séreux de haut grade de la paroi colique	haut	paroi colique
27	Adénocarcinome séreux de haut grade tubaire	haut	tubaire
36	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
48	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
57	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
71	Adénocarcinome endométrioïde de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
80	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
81	Carcinome peu différencié de l'ovaire	haut	ovaire
88	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
95	Adénocarcinome séreux de haut grade du péritoine	haut	péritoine
103	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
113	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire
116	Adénocarcinome séreux de haut grade de l'ovaire	haut	ovaire

L'âge au diagnostic était plus précoce que dans l'ensemble de notre échantillon, avec une moyenne de 58 ans, une médiane de 55 ans et une étendue de 44 à 77 ans. Cette donnée était en accord avec les données de la littérature.

L'information concernant la perte d'hétérozygotie était disponible pour 10 patientes sur nos 15 porteuses d'une méthylation du promoteur. Ces 10 patientes présentaient une perte d'hétérozygotie de *BRCA1*. Sur l'ensemble de notre échantillon, 83 tumeurs présentaient une perte d'hétérozygotie (66%), ce statut était inconnu pour 30 tumeurs (24%), 13 n'avait pas de perte d'hétérozygotie de *BRCA1* (10%) (tableau 11)

Tableau 11: Analyse de la perte d'hétérozygotie dans les tumeurs méthylées

Numéro	Tumoralité	Perte d'hétérozygotie de <i>BRCA1</i>
5	60%	82%
8	60%	68%
19	60%	79%
27	80%	Statut inconnu
36	90%	80%
48	80%	Statut inconnu
57	80%	Statut inconnu
71	80%	81%
80	70%	79%
81	80%	85%
88	70%	76%
95	90%	Statut inconnu
103	70%	86%
113	80%	Statut inconnu
116	50%	62%

Enfin, la recherche de méthylation du promoteur de *BRCA1* constitutionnelle a été recherchée chez 12 des 15 patientes porteuses d'une méthylation du promoteur sur ADN leucocytaire. Aucune n'était porteuse de méthylation constitutionnelle.

Discussion

I. La méthylation du promoteur de *BRCA1* comme biomarqueur pronostique et thérapeutique

Notre étude a donc retrouvé, de façon identique à la littérature, que près de 12% des carcinomes séreux de haut grade ovarien, tubaire ou péritonéaux, présentaient une méthylation du promoteur de *BRCA1*.

Cette méthylation était associée à une perte d'hétérozygotie. Nous retrouvons ici le modèle de Knudson avec nos deux événements aboutissant à la perte de fonction du gène *BRCA1* : tout d'abord la méthylation du promoteur, suivie de la perte de l'allèle sauvage¹⁴².

Ces événements aboutissent donc au même résultat qu'en cas de mutation perte de fonction du gène *BRCA1*, c'est à dire l'absence de transcription du gène et donc l'absence d'expression protéique et par conséquent un défaut de recombinaison homologue. De ce fait, les patientes présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1* devraient répondre, tout comme les patientes porteuses de variant pathogène dans les gènes *BRCA*, aux inhibiteurs de PARP.

Cette hypothèse a été testée en 2010 sur des lignées cellulaires mammaires tumorales, présentant une méthylation du promoteur. Ces cellules étaient autant sensibles aux inhibiteurs de PARP que les cellules porteuses d'une mutation dans les gènes *BRCA*¹⁴³.

La méthylation du promoteur de *BRCA1* associée à une perte d'hétérozygotie au niveau du locus de *BRCA1* pourrait être recherchée pour tout carcinome séreux de haut grade ovarien, tubaire, péritonéal primitif. Cette recherche permettrait de proposer aux patientes présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1*, le même traitement qu'aux patientes porteuses de variant pathogène.

De plus, certaines études ont montré que les tumeurs présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1* avaient un potentiel d'agressivité plus important que les tumeurs sporadiques. Ces tumeurs apparaissaient plus précocement, souvent en période de pré-ménopause, l'atteinte ganglionnaire était plus fréquente et la mortalité plus importante. La recherche de la méthylation pourrait donc être également vue comme un marqueur pronostique de la tumeur^{144, 145, 146}.

II. Elargissement de l'analyse de la méthylation en routine, place de l'immunohistochimie

L'analyse de la méthylation par pyroséquençage est fiable, reproductible et peut être réalisée en routine en l'absence de variants pathogènes retrouvés dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*.

Plusieurs auteurs ont testé en parallèle de la méthylation du promoteur de *BRCA1*, l'expression protéique de *BRCA1* par immunohistochimie^{91, 147}. Comme attendu, la méthylation est associée à une perte d'expression protéique de *BRCA1*, ce qui appuie notre hypothèse selon laquelle, en présence de méthylation, la protéine *BRCA1* n'est pas traduite, ce qui aboutit à un défaut de recombinaison homologue. L'étude de la méthylation du promoteur de *BRCA1* apporte donc une information supplémentaire, c'est-à-dire que les tumeurs présentant une hyperméthylation n'exprime pas la

protéine BRCA1. Nous pouvons imaginer associer ces deux techniques, c'est-à-dire qu'en l'absence de mutation retrouvée dans les gènes *BRCA*, une analyse immunohistochimique tumorale de BRCA1 pourrait être réalisée dans un premier temps et, si elle montre l'absence d'expression de la protéine BRCA1, une étude de la méthylation du promoteur de *BRCA1* serait réalisée dans un deuxième temps.

III. Traitements et cancer de l'ovaire, vers de nouvelles associations de thérapies

Tout comme les tumeurs porteuses de mutation dans les gènes *BRCA1/2*, les tumeurs présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1* répondent aux sels de platine.

Deux études ont montré, sur des lignées cellulaires tumorales mammaires, ovariennes, pancréatiques, présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1*, ainsi que sur des souris présentant des tumeurs avec méthylation du promoteur de *BRCA1*, que la croissance tumorale était réduite en cas de traitement par inhibiteur de PARP, d'autant plus quand ce traitement était associé aux sels de platine^{143, 148, 109}.

IV. Mise en doute de l'efficacité des inhibiteurs de PARP sur les cancers ovariens avec méthylation du promoteur de *BRCA1*

Cependant, l'hypothèse selon laquelle les tumeurs méthylées répondraient aux inhibiteurs de PARP est remise en cause dans certains articles. En effet, nous savons que dans les tumeurs porteuses de variant pathogène de *BRCA1/2*, nous pouvons observer une réactivation du gène inhibé suite à un traitement par inhibiteur de PARP. Si nous reprenons le concept de léthalité synthétique, il faut que la voie de la recombinaison homologue soit inhibée via l'absence des protéines BRCA1 ou BRCA2, pour que les inhibiteurs de PARP soient efficaces et mènent à la mort de la cellule. Si la protéine est de nouveau présente, alors les inhibiteurs de PARP ne seront plus efficaces et nous observerons une résistance au traitement^{126, 145, 149}.

En cas de méthylation du promoteur de *BRCA1*, il est plus simple pour la cellule tumorale de lever l'inhibition de transcription du gène, tout simplement en déméthylant le promoteur, on observe alors une restauration de la fonction protéique de BRCA1 et donc un échappement thérapeutique. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs auteurs, qui ont observé une méthylation du promoteur plus importante dans les tumeurs primitives que dans les tumeurs en rechute, ce qui appuie cette hypothèse⁹⁴.

En comparaison, les tumeurs présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1* répondent moins bien au traitement par sel de platine que les tumeurs porteuses de variants pathogènes dans les gènes *BRCA*. Sachant que les tumeurs résistantes aux sels de platine répondent peu aux inhibiteurs de PARP, nous pouvons supposer une résistance plus importante aux inhibiteurs de PARP pour les tumeurs méthylées^{95, 127}.

V. Essais cliniques

Etant donné que l'efficacité des inhibiteurs de PARP sur les tumeurs présentant une hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* n'est pas attestée, il est nécessaire à l'heure actuelle d'évaluer l'efficacité de ce traitement en menant des essais cliniques de phase III utilisant les inhibiteurs de PARP chez les femmes porteuses de tumeurs présentant une méthylation du promoteur de *BRCA1*.

Seuls les résultats de ces études nous indiqueront s'il est nécessaire ou non d'étudier en diagnostique le profil de méthylation du promoteur de *BRCA1* dans les laboratoires de biologie moléculaire.

VI. Extension de ces thérapies aux tumeurs présentant une altération de la recombinaison homologue

Le concept BRCAness caractérise certaines tumeurs ne présentant pas de mutation dans les gènes *BRCA1/2*, mais aboutissant au même phénotype, c'est-à-dire un défaut de recombinaison homologue. Une signature spécifique de perte de recombinaison homologue est observée dans près de 50% des carcinomes séreux de haut grade ovariens⁹⁵.

Les anomalies moléculaires observées dans ces adénocarcinomes séreux de haut grade sont diverses et touchent des gènes codant des protéines impliquées dans la recombinaison homologue. Les anomalies rapportées dans une étude de 2011 sont une amplification ou mutation de *EMSY* (8%), la méthylation du promoteur de *RAD51C* (3%), une mutation dans les gènes *ATM/ATR* (2%), une mutation dans les gènes de l'anémie de Fanconi (5%), une micro délétion ou mutation dans le gène *PTEN*⁹⁵.

On peut donc penser que les patientes présentant une tumeur avec un profil BRCAness sont également éligibles à un traitement par inhibiteur de PARP^{150, 95, 151, 104}. Cependant, du fait du nombre faible de patientes présentant des variants pathogènes dans chacun de ces gènes, il est difficile de réaliser un essai clinique assez puissant qui attesterait de l'efficacité des inhibiteurs de PARP.

VII. Autres traitements efficaces sur les tumeurs BRCAness

D'autres traitements sont actuellement en cours d'évaluation dans le traitement des tumeurs des carcinomes séreux de haut grade, notamment les inhibiteurs de l'angiogenèse. En effet, les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire tel VEGF (Vascular endothelial growth factor) stimulent la néo angiogenèse, c'est-à-dire la croissance de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires existants au sein de la tumeur, permettant son extension. Si la néo angiogenèse est inhibée, les cellules tumorales ne seront plus vascularisées, et donc la tumeur ne pourra pas s'étendre. Dans le cadre des tumeurs épithéliales de l'ovaire, deux essais cliniques de phase III ont testé l'efficacité du bevacizumab (anticorps monoclonal anti VEGF-A) associé aux sels de platine, et avaient trouvé une augmentation significative de la survie sans progression¹⁵¹.

Concernant les tumeurs présentant un profil BRCAness, la combinaison des inhibiteurs de PARP et de l'angiogénèse doit être envisagée. En effet, les inhibiteurs de PARP augmentent la phosphorylation de VEGFR2 et donc l'activation de la survie cellulaire, cet effet serait éliminé par l'ajout d'anti-VEGF. De plus, l'inhibition de VEGFR entraîne une hypoxie, qui va entraîner des défauts de recombinaison homologue et donc une meilleure sensibilité aux inhibiteurs de PARP dans les tumeurs tumorales hypoxiques^{130, 151}.

Conclusion

La prise en charge des cancers a beaucoup évolué ces dernières années avec l'apparition des thérapies ciblées. Une nouvelle approche se développe, c'est l'approche théranostique, qui consiste à étudier le comportement des cellules tumorales afin de proposer un traitement spécifique.

En génétique, le développement rapide de nouvelles technologies, comme le séquençage haut débit, a permis d'identifier, au sein des cellules tumorales, des altérations génétiques, pouvant être utilisées comme biomarqueur moléculaire. L'un des intérêts majeurs de ces biomarqueurs concerne le choix du traitement. En effet, ces biomarqueurs vont permettre de mettre en place, selon le statut du marqueur, des thérapies ciblées.

C'est le cas, comme présenté ici, pour les adénocarcinomes de haut grade ovariens, tubaires et péritonéaux primitifs qui, s'ils présentent une mutation dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, sont sensibles au traitement par inhibiteur de PARP. L'identification de nouveaux biomarqueurs va être un enjeu majeur des prochaines années.

Nous avons fait l'hypothèse que la méthylation du promoteur de *BRCA1* pouvait être un biomarqueur prédictif de réponse aux inhibiteurs de PARP. Si des essais cliniques le confirme, le nombre de femmes éligibles à ce traitement augmenterait de plus de 10% et serait donc une avancée majeure dans le traitement des cancers épithéliaux de haut grade de l'ovaire.

Bibliographie

- 1- Drake R, Vogl W, Pelvis et périnée. In : Gray's anatomie pour les étudiants. Issy-les-Moulineaux : Elsevier-Masson ; 2006. P.429-433
- 2- Histologie de l'appareil génital féminin. [Internet]. [cité 25 avril 2018]. Disponible sur : http://www.epathologies.com/acad/h_cd/genfem.pdf
- 3- 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*. 1 mars 2015;136(5):E359-386.
- 4- Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire ; 2013. 122p.
- 5- Lowe KA, Chia VM, Taylor A, O'Malley C, Kelsh M, Mohamed M, et al. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecol Oncol*. juill 2013;130(1):107-14.
- 6- Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017 / 2018 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [Internet]. [cité 30 mai 2018]. Disponible sur : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2018/Projection-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-en-2017>
- 7- Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 17 mars 2018;391(10125):1023-75.
- 8- Wentzensen N, Poole EM, Trabert B, White E, Arslan AA, Patel AV, et al. Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *J Clin Oncol*. 20 août 2016;34(24):2888-98.
- 9- OncoBretagne. Thésaurus appareil gynécologique. [Internet]. 2015 [cité 25 mai 2018]. Disponible sur : <http://www.oncobretagne.fr/wp-content/uploads/2015/08/gyneco2015.pdf>
- 10- Tulpin L, Rouzier R, Morel O, Malartic C, Daraï E, Barranger E. [Borderline ovarian tumors: an update]. *Gynecol Obstet Fertil*. avr 2008;36(4):422-9.
- 11- Tulpin L, Akerman G, Morel O, Desfeux P, Malartic C, Barranger E. [Management of borderline tumors of the ovary]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. juill 2008;37 Spec No 2:F69-76.
- 12- Klotz DM, Wimberger P. Cells of origin of ovarian cancer: ovarian surface epithelium or fallopian tube? *Arch Gynecol Obstet*. déc 2017;296(6):1055-62.
- 13- Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol*. nov 2001;195(4):451-6.
- 14- Kotsopoulos J, Terry KL, Poole EM, Rosner B, Murphy MA, Hecht JL, et al. Ovarian cancer risk factors by tumor dominance, a surrogate for cell of origin. *Int J Cancer*. 1 août 2013;133(3):730-9.
- 15- Vang R, Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. sept 2009;16(5):267-82.
- 16- Stratton JF, Pharoah P, Smith SK, Easton D, Ponder BA. A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*. mai 1998;105(5):493-9.
- 17- Jervis S, Song H, Lee A, Dicks E, Tyrer J, Harrington P, et al. Ovarian cancer familial relative risks by tumour subtypes and by known ovarian cancer genetic susceptibility variants. *J Med Genet*. févr 2014;51(2):108-13.

- 18- Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet*. 11 oct 2014;384(9951):1376-88.
- 19- Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. janv 2012;21(1):134-47.
- 20- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*. 26 janv 2008;371(9609):303-14.
- 21- Tsilidis KK, Allen NE, Key TJ, Dossus L, Lukanova A, Bakken K, et al. Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer*. 25 oct 2011;105(9):1436-42.
- 22- Sieh W, Salvador S, McGuire V, Weber RP, Terry KL, Rossing MA, et al. Tubal ligation and risk of ovarian cancer subtypes: a pooled analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol*. avr 2013;42(2):579-89.
- 23- Jordan SJ, Siskind V, C Green A, Whiteman DC, Webb PM. Breastfeeding and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Causes Control*. janv 2010;21(1):109-16.
- 24- Gong T-T, Wu Q-J, Vogtmann E, Lin B, Wang Y-L. Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 15 juin 2013;132(12):2894-900.
- 25- Heidemann LN, Hartwell D, Heidemann CH, Jochumsen KM. The relation between endometriosis and ovarian cancer - a review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. janv 2014;93(1):20-31.
- 26- Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online*. sept 2009;19(3):398-405.
- 27- Barry JA, Aziz 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*. oct 2014;20(5):748-58.
- 28- Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. mai 2017;41:3-14.
- 29- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. oct 2010;60(5):277-300.
- 30- Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin*. juin 2011;61(3):183-203.
- 31- Delpech Y, Barranger E. Évaluation des facteurs pronostiques des tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2012 ; 14 (supplément 1) : 63-9 doi:10.1684/mte.2012.0411
- 32- Alsop K, Fereday S, Meldrum C, deFazio A, Emmanuel C, George J, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 20 juill 2012;30(21):2654-63.
- 33- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 7 oct 1994;266(5182):66-71.
- 34- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. déc 1994;8(4):399-404.
- 35- Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 23 déc 2011;12(1):68-78.
- 36- Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. janv 2004;24(2):708-18.

- 37- Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet.* oct 2007;8(10):735-48.
- 38- Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J Biol Chem.* 25 sept 1998;273(39):25388-92.
- 39- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 21 déc 1995;378(6559):789-92.
- 40- Martinez JS, Baldeyron C, Carreira A. Molding BRCA2 function through its interacting partners. *Cell Cycle.* 2015;14(21):3389-95.
- 41- Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.* sept 2009;10(9):990-6.
- 42- von Nicolai C, Ehlén Å, Martin C, Zhang X, Carreira A. A second DNA binding site in human BRCA2 promotes homologous recombination. *Nat Commun.* 15 sept 2016;7:12813.
- 43- Yang H, Li Q, Fan J, Holloman WK, Pavletich NP. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature.* 10 févr 2005;433(7026):653-7.
- 44- Buisson R, Masson J-Y. [Functions of PALB2 and BRCA2 tumor suppressors in DNA double-strand break repair]. *Med Sci (Paris).* mars 2013;29(3):301-7.
- 45- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. 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.* mai 2003;72(5):1117-30.
- 46- Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 10 avr 2007;25(11):1329-33.
- 47- Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst.* 5 juin 2013;105(11):812-22.
- 48- Thésaurus - Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 / Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque - Ref : RECOBRCATHES17 | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 23 avr 2018]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Thesaurus-Femmes-porteuses-d-une-mutation-de-BRCA1-ou-BRCA2-Detection-precoce-du-cancer-du-sein-et-des-annexes-et-strategies-de-reduction-du-risque>
- 49- Graeser MK, Engel C, Rhiem K, Gadzicki D, Bick U, Kast K, et al. Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol.* 10 déc 2009;27(35):5887-92.
- 50- Kuchenbaecker KB, McGuffog L, Barrowdale D, Lee A, Soucy P, Dennis J, et al. Evaluation of Polygenic Risk Scores for Breast and Ovarian Cancer Risk Prediction in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *J Natl Cancer Inst.* 01 2017;109(7).
- 51- Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 5 déc 2007;99(23):1811-4.
- 52- Evans DGR, Susnerwala I, Dawson J, Woodward E, Maher ER, Lalloo F. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *J Med Genet.* oct 2010;47(10):710-1.
- 53- Finch A, Wang M, Fine A, Atri L, Khalouei S, Pupavac M, et al. Genetic testing for BRCA1 and BRCA2 in the Province of Ontario. *Clin Genet.* mars 2016;89(3):304-11.
- 54- Moran A, O'Hara C, Khan S, Shack L, Woodward E, Maher ER, et al. Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer.* juin 2012;11(2):235-42.
- 55- Agalliu I, Gern R, Leanza S, Burk RD. Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations. *Clin Cancer Res.* 1 févr 2009;15(3):1112-20.
- 56- Mocci E, Milne RL, Méndez-Villamil EY, Hopper JL, John EM, Andrulis IL, et al. Risk of pancreatic cancer in breast cancer families from the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* mai 2013;22(5):803-11.

- 57- Lee MV, Katabathina VS, Bowerson ML, Mityul MI, Shetty AS, Elsayes KM, et al. BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management. *Radiographics*. août 2017;37(4):1005-23.
- 58- Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, Lubinski J, Gronwald J, Moller P, et al. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer*. 21 janv 2014;110(2):530-4.
- 59- Saule C, Mouret-Fourme E, Briaux A, Becette V, Rouzier R, Houdayer C, et al. Risk of Serous Endometrial Carcinoma in Women With Pathogenic BRCA1/2 Variant After Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy. *J Natl Cancer Inst*. 1 févr 2018;110(2).
- 60- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Fan I, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst*. 6 déc 2006;98(23):1694-706.
- 61- Soegaard M, Kjaer SK, Cox M, Wozniak E, Høgdall E, Høgdall C, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence and clinical characteristics of a population-based series of ovarian cancer cases from Denmark. *Clin Cancer Res*. 15 juin 2008;14(12):3761-7.
- 62- Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1 févr 2014;20(3):764-75.
- 63- Malander S, Ridderheim M, Måsbäck A, Loman N, Kristoffersson U, Olsson H, et al. One in 10 ovarian cancer patients carry germ line BRCA1 or BRCA2 mutations: results of a prospective study in Southern Sweden. *Eur J Cancer*. févr 2004;40(3):422-8.
- 64- Berchuck A, Heron KA, Carney ME, Lancaster JM, Fraser EG, Vinson VL, et al. Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. oct 1998;4(10):2433-7.
- 65- Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, Flanagan A, Arnout L, Merrett S, et al. Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Clin Cancer Res*. 1 avr 2004;10(7):2473-81.
- 66- Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, Takahashi H, Morgan MA, LiVolsi VA, et al. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N Engl J Med*. 7 nov 1996;335(19):1413-6.
- 67- Sowter HM, Ashworth A. BRCA1 and BRCA2 as ovarian cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis*. oct 2005;26(10):1651-6.
- 68- Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med*. 12 avr 2012;366(15):1382-92.
- 69- Sun C, Li N, Ding D, Weng D, Meng L, Chen G, et al. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e95285.
- 70- Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus SJ, Karlan BY, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA*. 25 janv 2012;307(4):382-90.
- 71- Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 8 oct 2009;361(15):1475-85.
- 72- Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:181-211.
- 73- Peterson CL, Côté J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*. 15 mars 2004;18(6):602-16.
- 74- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 22 oct 2009;461(7267):1071-8.
- 75- Symington LS, Rothstein R, Lisby M. Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. nov 2014;198(3):795-835.
- 76- Les dommages à l'ADN et leur réparation [Internet]. Planet-Vie. [cité 26 mai 2018]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/article/2115/dommages-adn-leur-reparation>

- 77- Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. avr 1971;68(4):820-3.
- 78- Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. déc 1973;70(12):3324-8.
- 79- BRCA Share: A Collection of Clinical BRCA Gene Variants. Bérout, C., Letovsky, S. I., Braastad, C. D., Caputo, S. M., Beaudoux, O., Bignon, Y. J., ... & Coulet, F. (2016). *Human Mutation*, 37(12), 1318-1328.
- 80- Hennessy BTJ, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1 août 2010;28(22):3570-6.
- 81- Rzepecka IK, Szafron L, Stys A, Bujko M, Plisiecka-Halasa J, Madry R, et al. High frequency of allelic loss at the BRCA1 locus in ovarian cancers: clinicopathologic and molecular associations. *Cancer Genet*. mars 2012;205(3):94-100.
- 82- Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, Potter J, Carey MS, Meyer LA, et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 6 nov 2012;107(10):1776-82.
- 83- Cartron P-F, Pacaud R, Salbert G. Méthylation/déméthylation de l'ADN et expression du génome. /data/revues/1773035X/v2015i473/S1773035X15301581/ [Internet]. 17 juin 2015 [cité 24 avr 2018]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/984791>
- 84- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 13 mars 2008;358(11):1148-59.
- 85- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 20 nov 2003;349(21):2042-54.
- 86- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010;70:27-56.
- 87- Feinberg AP. A genetic approach to cancer epigenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:335-41.
- 88- Koukoura O, Spandidos DA, Daponte A, Sifakis S. DNA methylation profiles in ovarian cancer: implication in diagnosis and therapy (Review). *Mol Med Rep*. juill 2014;10(1):3-9.
- 89- Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res*. 15 août 1997;57(16):3347-50.
- 90- Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene*. 8 oct 1998;17(14):1807-12.
- 91- Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*. sept 2000;21(9):1761-5.
- 92- Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res*. 1 oct 2000;60(19):5329-33.
- 93- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*. 5 avr 2000;92(7):564-9.
- 94- Bol GM, Suijkerbuijk KPM, Bart J, Vooijs M, van der Wall E, van Diest PJ. Methylation profiles of hereditary and sporadic ovarian cancer. *Histopathology*. sept 2010;57(3):363-70.
- 95- Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 29 juin 2011;474(7353):609-15.
- 96- Prieske K, Prieske S, Joosse SA, Trillsch F, Grimm D, Burandt E, et al. Loss of BRCA1 promotor hypermethylation in recurrent high-grade ovarian cancer. *Oncotarget*. 10 oct 2017;8(47):83063-74.
- 97- Cunningham JM, Cicek MS, Larson NB, Davila J, Wang C, Larson MC, et al. Clinical characteristics of ovarian cancer classified by BRCA1, BRCA2, and RAD51C status. *Sci Rep*. 2014;4:4026.

- 98- Weren RDA, Mensenkamp AR, Simons M, Eijkelenboom A, Sie AS, Ouchene H, et al. Novel BRCA1 and BRCA2 Tumor Test as Basis for Treatment Decisions and Referral for Genetic Counselling of Patients with Ovarian Carcinomas. *Hum Mutat.* févr 2017;38(2):226-35.
- 99- Collins N, Wooster R, Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer.* 1997;76(9):1150-6.
- 100- Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1 nov 2011;108(44):18032-7.
- 101- Alshareeda AT, Negm OH, Aleskandarany MA, Green AR, Nolan C, TigHhe PJ, et al. Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: a key DNA damage response protein. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;159(1):41-53.
- 102- Golmard L, Castéra L, Krieger S, Moncoutier V, Abidallah K, Tenreiro H, et al. Contribution of germline deleterious variants in the RAD51 paralogs to breast and ovarian cancers. *Eur J Hum Genet.* déc 2017;25(12):1345-53.
- 103- Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J, Richters L, Groß E, Blümcke B, et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res.* 24 janv 2018;20(1):7.
- 104- Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* nov 2015;5(11):1137-54.
- 105- Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, Contu G, Grandi G, Cagnacci A, et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:341723.
- 106- Kanchi KL, Johnson KJ, Lu C, McLellan MD, Leiserson MDM, Wendl MC, et al. Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2014;5:3156.
- 107- <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-l-ovaire/Chirurgie>
- 108- Tan DSP, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, et al. « BRCAness » syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol.* 1 déc 2008;26(34):5530-6.
- 109- Stefansson OA, Villanueva A, Vidal A, Martí L, Esteller M. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. *Epigenetics.* nov 2012;7(11):1225-9.
- 110- McMeekin DS, Tillmanns T, Chaudry T, Gold M, Johnson G, Walker J, et al. Timing isn't everything: an analysis of when to start salvage chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* oct 2004;95(1):157-64.
- 111- Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* oct 2013;24 Suppl 6:vi24-32.
- 112- <https://www.revmed.ch/RMS/2011/RMS-296/Inhibiteurs-de-la-PARP-nouvelle-arme-therapeutique-pour-les-cancers-du-sein-et-de-l-ovaire>
- 113- Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics.* août 2008;9(8):619-31.
- 114- Hopkins TA, Shi Y, Rodriguez LE, Solomon LR, Donawho CK, DiGiammarino EL, et al. Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors. *Mol Cancer Res.* nov 2015;13(11):1465-77.
- 115- Murai J, Zhang Y, Morris J, Ji J, Takeda S, Doroshow JH, et al. Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* juin 2014;349(3):408-16.

- 116-McCormick A, Donoghue P, Dixon M, O'Sullivan R, O'Donnell RL, Murray J, et al. Ovarian Cancers Harbor Defects in Nonhomologous End Joining Resulting in Resistance to Rucaparib. *Clin Cancer Res.* 15 2017;23(8):2050-60.
- 117-Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 14 avr 2005;434(7035):917-21.
- 118-Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 14 avr 2005;434(7035):913-7.
- 119-Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA, Piccart M. An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol.* janv 2015;12(1):27-41.
- 120-Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 9 juill 2009;361(2):123-34.
- 121-Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 24 juill 2010;376(9737):245-51.
- 122-Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. 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.* juill 2014;15(8):852-61.
- 123-Pujade-Lauraine E. New treatments in ovarian cancer. *Ann Oncol.* 1 nov 2017;28(suppl_8):viii57-viii60.
- 124-Pan Z, Xie X. BRCA mutations in the manifestation and treatment of ovarian cancer. *Oncotarget.* 14 nov 2017;8(57):97657-70.
- 125-Morgan RD, Clamp AR, Evans DGR, Edmondson RJ, Jayson GC. PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* avr 2018;81(4):647-58.
- 126-Lheureux S, Karakasis K, Harter P, Scott C, Bacon M, Bryce J, et al. Germline BRCA1/2 testing practices in ovarian cancer: Current state and opportunities for new directions. *Gynecol Oncol.* janv 2016;140(1):90-4.
- 127-Lheureux S, Bruce JP, Burnier JV, Karakasis K, Shaw PA, Clarke BA, et al. Somatic BRCA1/2 Recovery as a Resistance Mechanism After Exceptional Response to Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibition. *J Clin Oncol.* 10 avr 2017;35(11):1240-9.
- 128-Chompret A, Noguès C, Stoppa-Lyonnet D. [Oncogenetic consultation for breast cancer]. *Presse Med.* févr 2007;36(2 Pt 2):357-63.
- 129-Arts-de Jong M, de Bock GH, van Asperen CJ, Mourits MJE, 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.* juill 2016;61:137-45. 1.
- 130-Vergote I, Banerjee S, Gerdes A-M, van Asperen C, Marth C, Vaz F, et al. Current perspectives on recommendations for BRCA genetic testing in ovarian cancer patients. *Eur J Cancer.* 2016;69:127-34.
- 131-Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel).* 2016;5(1).
- 132-Ibragimova I, Cairns P. Assays for hypermethylation of the BRCA1 gene promoter in tumor cells to predict sensitivity to PARP-inhibitor therapy. *Methods Mol Biol.* 2011;780:277-91.
- 133-Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *BioTechniques.* juill 2003;35(1):152-6.
- 134-Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2265-75.
- 135-Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 15 août 1997;57(16):3347-50.

- 136-Xu CF, Chambers JA, Solomon E. Complex regulation of the BRCA1 gene. *J Biol Chem.* 22 août 1997;272(34):20994-7.
- 137-Hansmann T, Pliushch G, Leubner M, Kroll P, Endt D, Gehrig A, et al. Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet.* 1 nov 2012;21(21):4669-79.
- 138-Daniels SL, Burghel GJ, Chambers P, Al-Baba S, Connley DD, Brock IW, et al. Levels of DNA Methylation Vary at CpG Sites across the BRCA1 Promoter, and Differ According to Triple Negative and « BRCA-Like » Status, in Both Blood and Tumour DNA. *PLoS ONE.* 2016;11(7):e0160174.
- 139-Cai F-F, Chen S, Wang M-H, Lin X-Y, Zhang L, Zhang J-X, et al. Pyrosequencing quantified methylation level of BRCA1 promoter as prognostic factor for survival in breast cancer patient. *Oncotarget.* 10 mai 2016;7(19):27499-510.
- 140-Cai F, Ge I, Wang M, Biskup E, Lin X, Zhong X. Pyrosequencing analysis of BRCA1 methylation level in breast cancer cells. *Tumour Biol.* avr 2014;35(4):3839-44.
- 141-Badoer C, Garrec C, Goossens D, Ellison G, Mills J, Dzial M, et al. Performance of multiplicom's BRCA MASTR Dx kit on the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fresh frozen ovarian and breast tumor samples. *Oncotarget.* 25 oct 2016;
- 142-Felicio PS, Melendez ME, Arantes LMRB, Kerr LM, Carraro DM, Grasel RS, et al. Genetic and epigenetic characterization of the BRCA1 gene in Brazilian women at-risk for hereditary breast cancer. *Oncotarget.* 1 déc 2016;8(2):2850-62.
- 143-Veeck J, Roperio S, Setien F, Gonzalez-Suarez E, Osorio A, Benitez J, et al. BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *J Clin Oncol.* 10 oct 2010;28(29):e563-564; author reply e565-566.
- 144-Xu X, Gammon MD, Zhang Y, Cho YH, Wetmur JG, Bradshaw PT, et al. Gene promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* juin 2010;121(3):685-92.
- 145-Moschetta M, George A, Kaye SB, Banerjee S. BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1449-55.
- 146-Chiang JW, Karlan BY, Cass L, Baldwin RL. BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecol Oncol.* juin 2006;101(3):403-10.
- 147-Meisel JL, Hyman DM, Garg K, Zhou Q, Dao F, Bisogna M, et al. The performance of BRCA1 immunohistochemistry for detecting germline, somatic, and epigenetic BRCA1 loss in high-grade serous ovarian cancer. *Ann Oncol.* déc 2014;25(12):2372-8.
- 148-Drew Y, Mulligan EA, Vong W-T, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, et al. Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst.* 16 févr 2011;103(4):334-46.
- 149-Norquist B, Wurz KA, Pennil CC, Garcia R, Gross J, Sakai W, et al. Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol.* 1 août 2011;29(22):3008-15.
- 150-Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* févr 2016;16(2):110-20.
- 151-Banerjee S, Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2013;19(5):961-8.

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Pr Marc DENIS

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Pr Stéphane BEZIEAU

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET

NOM : LE GALL

PRENOM : Jessica

Titre de Thèse : Etude de la méthylation du promoteur de *BRCA1* sur 126 tumeurs ovariennes au CHU de Nantes

RESUME

Le cancer de l'ovaire est le septième cancer le plus fréquent chez la femme avec une survie à cinq ans inférieure à 50%. Les femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* ont un risque élevé de développer un cancer de l'ovaire. Ce sont des gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la réparation des cassures doubles brins par recombinaison homologue. Le traitement par inhibiteur de PARP a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2014 pour les femmes présentant un cancer épithélial de haut grade de l'ovaire ou tubaire ou péritonéal primitif en rechute associés à une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* constitutionnelle et/ou tumorale. Ce qui concerne près de 20% des patientes. La méthylation du promoteur du gène de *BRCA1* au niveau tumoral est associée à une perte d'expression de la protéine BRCA1. Nous avons analysé au CHU de Nantes la méthylation par pyroséquençage du promoteur de *BRCA1* sur 126 tumeurs séreuses de haut grade, et avons retrouvé 15 tumeurs présentant une hyperméthylation (12%). Le traitement par inhibiteur de PARP pourrait être également efficace sur ces tumeurs et concernerait un nombre non négligeable de patientes.

MOTS-CLES

Cancer de l'ovaire
Syndrome héréditaire de prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire
Epigénétique
Méthylation
ADN tumoral