

Université de Montréal

**Mutations impliquées dans la progression du cancer épithélial de
l'ovaire**

par
Rayane El-Masri

Programme de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en Biologie moléculaire

Août 2012

© Rayane El-Masri, 2012

Résumé

Le cancer épithélial de l’ovaire (CEO) est le cancer gynécologique le plus létal. Plus de 70% des patientes diagnostiquées avec une tumeur de stade avancé rechutent suite aux traitements chimiothérapeutiques de première ligne, la survie à cinq ans étant ainsi très faible. Afin de mieux comprendre l’évolution de la maladie, nous avons recherché de nouveaux gènes, responsables de l’initiation et de la progression du CEO. Précédemment, des lignées cellulaires ont été dérivées à partir de la tumeur primaire et récurrente et/ou d’ascites de trois patientes. Le séquençage de l’ARN de ces lignées par la technologie de séquençage de nouvelle génération (TSNG) nous a permis d’identifier des mutations ponctuelles qui pourraient nous indiquer des gènes dérégulés dans le CEO. La TSNG est un bon outil qui permet d’identifier et de cribler à grande échelle des mutations. Nous avons sélectionné *PLEC1*, *SCRIB*, *NCOR2*, *SEMA6C*, *IKBKB*, *GLCE* et *ITGAE* comme gènes candidats présentant des mutations dans nos lignées et ayant une relation fonctionnelle avérée avec le cancer. Étant donné que la TSNG est une technique à taux de fiabilité limité, nous avons validé ces mutations par séquençage Sanger. Ensuite, nous avons étudié l’effet de ces mutations sur la structure protéique et l’expression de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C*. Seules certaines mutations dans les gènes *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* ont pu être confirmées. *PLEC1* et *SCRIB* sont deux protéines d’échafaudage dont la mutation, rapportée dans plusieurs cancers, pourrait induire des changements de leurs conformations et affecter leurs interactions et leurs fonctions. Les conséquences de ces mutations sur la tumorigenèse de l’ovaire devront être étudiées.

Mots-clés

Progression du cancer épithélial de l’ovaire

Lignées cellulaires

Mutations

Séquençage Sanger

Séquençage de nouvelle génération

Abstract

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecological cancer. Over 70% of the patients diagnosed with advanced stage of cancer relapse following first-line chemotherapy treatments; consequently the five-year survival is very low. To better understand the evolution of the disease, our aim was to identify new genes responsible for the initiation and progression of EOC. Previously, cell lines derived from solid tumors or ascites were developed from the primary and recurrent tumor or ascites of three patients. RNA sequencing of these cell lines by next-generation sequencing technology (NGST) allowed us to identify mutations that might point to genes whose deregulation is important in EOC. Mutations were detected in *PLEC1*, *SCRIB*, *NCOR2*, *SEMA6C*, *IKBKB*, *GLCE* and *ITGAE*. We selected these genes for further studies as they have previously been identified as being associated with cancer. First, we validated these mutations by Sanger sequencing in order to determine the concordance with NGST data. Secondly, we studied the impact of the validated mutations on protein structure and gene expression. Only certain mutations in *PLEC1*, *SCRIB* and *SEMA6C* were confirmed. Of interest, *PLEC1* and *SCRIB* are two scaffold proteins, where mutations have been reported in several cancers and, possibly leading to changes in their conformation and thereby affecting their interactions and functions. The consequences of these mutations on ovarian tumorigenesis remain to be determined.

Keywords

Epithelial ovarian cancer progression

Cell lines

Mutations

Sanger sequencing

Next-generation sequencing

Table des matières

Résumé.....	ii
Mots-clés.....	ii
Abstract.....	iii
Keywords.....	iii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xiv
Liste des sigles et abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xxii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer de l’ovaire.....	2
1.1.1 L’épidémiologie du cancer de l’ovaire.....	2
1.1.2 L’étiologie et les facteurs de risque du cancer épithélial de l’ovaire (CEO).....	3
1.1.3 Les différentes tumeurs de l’ovaire.....	6
1.1.3.1 Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels.....	6
1.1.3.2 Les tumeurs germinales.....	7
1.1.3.3 Les tumeurs épithéliales de l’ovaire.....	7
1.2 Le cancer épithélial de l’ovaire (CEO).....	7
1.2.1 Classification des tumeurs de l’ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique (FIGO).....	7
1.2.1.1 Les classes tumorales.....	8
1.2.1.1.1 Les tumeurs bénignes (BOV).....	8
1.2.1.1.2 Les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP).....	8

1.2.1.1.3 Les tumeurs invasives (TOV)	8
1.2.1.2 Les types histopathologiques	9
1.2.1.2.1 Les tumeurs séreuses.....	9
1.2.1.2.2 Les tumeurs endométrioïdes	9
1.2.1.2.3 Les tumeurs mucineuses	9
1.2.1.2.4 Les tumeurs à cellules claires.....	9
1.2.1.3 Les grades de différenciation du CEO	10
1.2.1.4 Les stades du CEO (SI-SIV).....	10
1.2.2 Les origines possibles du CEO	10
1.2.3 Présentation clinique du CEO	11
1.2.3.1 Les symptômes.....	11
1.2.3.2 Les techniques de dépistage et de diagnostic.....	11
1.2.3.3 Les traitements : chirurgie et chimiothérapie.....	12
1.2.3.4 Le suivi des patientes	13
1.2.3.5 La progression de la maladie et le développement de la chimiorésistance.....	14
1.2.3.5.1 Les mécanismes de résistance et les voies moléculaires impliquées	14
1.3 Les modèles d'étude	16
1.3.1 La banque de tumeurs	16
1.3.2 La culture primaire.....	16
1.3.3 Les lignées cellulaires	16
1.3.4 Les xénogreffes.....	17
1.4 L'instabilité génomique et le développement du CEO	17
1.4.1 Aperçu de la génomique du cancer	17
1.4.2 L'instabilité génomique (GIN).....	18
1.4.3 Les formes d'altérations.....	19
1.4.3.1 L'instabilité chromosomique (CIN).....	19
1.4.3.1.1 Les réarrangements chromosomiques.....	20
1.4.3.1.1.1 Les réarrangements équilibrés	20
1.4.3.1.1.2 Les réarrangements déséquilibrés	21

1.4.3.2 L'instabilité des micro- et minisatellites (MIN ou MSI)	21
1.4.3.3 Les mutations ponctuelles.....	22
1.4.3.3.1 Reclassification histopathologique des tumeurs selon leur patron de mutations (modèle dualiste).....	23
1.4.3.3.1.1 Tumeurs de bas grade	23
1.4.3.3.1.2 Tumeurs de haut grade.....	24
1.4.4 Les mécanismes de contrôle de la stabilité génomique	26
1.4.4.1 La réplication	26
1.4.4.2 La ségrégation chromosomique	27
1.4.4.3 La réparation	27
1.4.4.4 Les points de contrôle du cycle cellulaire.....	27
1.4.5 Les méthodes de détection	28
1.4.5.1 Cytogénétiques.....	28
1.4.5.1.1 Caryotypage	28
1.4.5.1.3 Caryotype spectral (SKY).....	29
1.4.5.1.2 Hybridation in situ en fluorescence (FISH).....	29
1.4.5.1.4 Cytométrie en flux	29
1.4.5.1.5 L'hybridation génomique comparative.....	30
1.4.5.2 Génétiques.....	30
1.4.5.2.1 Génotypage des SNP sur puce	30
1.4.5.2.2 Séquençage Sanger	30
1.4.5.2.3 Séquençage à haut débit ou séquençage de nouvelle génération (SNG)	33
1.4.5.2.3.1 Étude des mutations à l'échelle du génome par la TSNG.....	35
1.4.5.2.3.2 Le modèle d'étude.....	35
1.4.5.2.3.3 L'analyse des mutations.....	36
1.5 Les objectifs de mon projet de maîtrise	37

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
2.1 Échantillons et données cliniques	39
2.2 Lignées cellulaires et conditions de culture	40
2.3 Extraction d'ADN et d'ARN	41
2.4 Synthèse de l'ADN complémentaire.....	41
2.5 Séquençage de l'ADN et de l'ARN par TSNG	42
2.6 Analyse des résultats de séquençage et choix des gènes candidats	42
2.7 PCR et séquençage Sanger.....	43
2.8 Calcul du pourcentage de validation des mutations.....	45
2.9 Analyses bioinformatiques.....	46
 CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	 48
3.1 Qualité de l'ARN des tumeurs solides et des lignées cellulaires	49
3.2 Qualité de l'ADNc synthétisé	49
3.3 Résultats du séquençage par TSNG	50
3.4 Choix des gènes candidats	54
3.4.1 Gènes mutés dans plusieurs lignées cellulaires.....	54

3.4.2 Gènes mutés dans les lignées établies après la récurrence de la maladie	55
3.5 Validation des mutations dans l'ADNg et l'ADNc	56
3.6 Analyse des résultats de séquençage Sanger.....	56
3.6.1 <i>PLEC1</i>	56
3.6.2 <i>SCRIB</i>	63
3.6.3 <i>NCOR2</i>	70
3.6.4 <i>IKBKB</i>	75
3.6.5 <i>ITGAE</i>	79
3.6.6 <i>SEMA6C</i>	83
3.6.7 <i>GLCE</i>	87
3.7 Comparaison entre les pourcentages de précision pour détecter les mutations de chaque algorithme.....	90
3.8 Analyses bioinformatiques.....	91
3.8.1 Analyse des données brutes	91
3.8.2 Comparaison des mutations de <i>PLEC1</i> , <i>SCRIB</i> et <i>SEMA6C</i> avec celles de la base de données COSMIC et avec les résultats de TCGA.....	94
3.9 Effet des mutations sur la structure protéique.....	96
3.9.1 Effet sur la charge et la polarité	96
3.9.2 Effet sur la structure protéique.....	97
3.9.2.1 <i>PLEC1</i>	97
3.9.2.2 <i>SEMA6C</i>	99
3.10 Effet de la mutation sur l'expression des gènes.....	104

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	107
4.1 L'importance de notre modèle cellulaire dans l'étude de l'évolution du CEO	108
4.2 Analyse des algorithmes A et B.....	109
4.3 Choix des gènes candidats	110
4.4 Sensibilité de chaque algorithme pour détecter les mutations	111
4.5 Analyse des données brutes, des mutations dans COSMIC et TCGA, de la structure protéique et des niveaux d'expression de <i>PLEC1</i> , de <i>SCRIB</i> et de <i>SEMA6C</i>	112
Conclusions.....	115
Perspectives.....	116
CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE	117
CHAPITRE 6: ANNEXE	xxiii

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 :

Tableau I : Facteurs de risque du cancer de l’ovaire.....	4
---	---

CHAPITRE 2 :

Tableau II : Données cliniques des patientes 1369, 2295 et 3133	39
---	----

Tableau III : Drogues chimiothérapeutiques auxquelles ont été exposées les lignées cellulaires.	40
--	----

Tableau IV : Amorces 5’ et 3’ et conditions de PCR pour les ADNg des 7 gènes candidats.....	44
---	----

Tableau V : Amorces 5’ et 3’ et conditions de PCR pour les ADNc des 5 gènes candidats.	45
---	----

CHAPITRE 3:

Tableau VI : RIN des tumeurs solides d’origine et des lignées cellulaires dérivées	49
--	----

Tableau VII : Nombre de mutations de type substitutions et insertions/délétions (indels) détectées par l’algorithme A dans l’ADNc des lignées des patientes 1369 et 3133	51
--	----

Tableau VIII : Nombre de mutations de type substitutions et insertions/délétions (indels) détectées par l’algorithme B dans l’ADNc des lignées des patientes 1369, 2295 et 3133.....	51
--	----

Tableau IX : Nombre de mutations détectées par l’algorithme A dans les lignées établies de la tumeur primaire des patientes 1369 et 3133	52
Tableau X : Nombre de mutations détectées par l’algorithme A dans les lignées établies de la tumeur récurrente des patientes 1369 et 3133	53
Tableau XI : Nombre de mutations détectées par l’algorithme B dans les lignées établies de la tumeur primaire des patientes 1369, 2295 et 3133	53
Tableau XII : Nombre de mutations détectées par l’algorithme B dans les lignées établies de la tumeur récurrente des patientes 1369, 2295 et 3133	54
Tableau XIII : Nombre de gènes correspondant à chaque valeur du score.....	55
Tableau XIV : Tableau comparatif des mutations détectées dans <i>PLEC1</i> par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire.....	57
Tableau XV : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de <i>PLEC1</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B.	62
Tableau XVI : Comparaison entre les mutations de <i>SCRIB</i> détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire.....	64
Tableau XVII : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de <i>SCRIB</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B.	69
Tableau XVIII : Comparaison entre les mutations de <i>NCOR2</i> détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire.....	71
Tableau XIX : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de <i>NCOR2</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B.	74

Tableau XX : Comparaison entre les mutations de <i>IKBKB</i> détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire.....	75
Tableau XXI : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations d’ <i>IKBKB</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B.	78
Tableau XXII : Comparaison entre les mutations d’ <i>ITGAE</i> détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire.....	79
Tableau XXIII : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations d’ <i>ITGAE</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B.	82
Tableau XXIV : Comparaison entre les mutations de <i>SEMA6C</i> détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires du cancer de l’ovaire.	83
Tableau XXV : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de <i>SEMA6C</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B..	86
Tableau XXVI : Comparaison entre les mutations de <i>GLCE</i> détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire.....	87
Tableau XXVII : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de <i>GLCE</i> issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B.	89
Tableau XXVIII : Comparaison des pourcentages de précision de détection de mutations des deux algorithmes A et B.....	91
Tableau XXIX : Fréquence des bases azotées aux sites de mutations de <i>PLEC1</i> , de <i>SCRIB</i> et de <i>SEMA6C</i> dans le sang des patientes 2295 et 3133.....	92

Tableau XXX : Fréquences brutes des mutations de *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* dans les neuf lignées cellulaires.
N.D : non disponible 94

Tableau XXXI : Tableau comparatif entre les positions de mutations de *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* qui sont rapportés par TSNG et ceux qui sont rapportés par la base de donnée COSMIC dans les carcinomes de l’ovaire... 95

Tableau XXXII : Effet de la mutation sur la charge et la polarité et les domaines protéiques mutés. 97

Liste des figures

CHAPITRE 1 :

Figure 1: Répartition en pourcentage du nombre estimé de nouveaux cas (A) et de décès (B) pour les cancers les plus fréquents chez la femme en 2011 au Canada 3

Figure 2 : Origines des trois principaux types de tumeurs ovariennes 6

Figure 3 : Mécanisme de résistance aux agents à base de platine dans les cellules cancéreuses 15

Figure 4 : Représentation schématique du modèle dualiste consacré au développement des carcinomes ovariens séreux..... 25

Figure 5 : Prévalence des types histologiques de CEO et les évènements moléculaires les plus représentatifs 26

Figure 6 : Schéma explicatif des étapes du séquençage par la technique de Sanger.. 32

Figure 7 : Schéma explicatif du séquençage à haut débit de l'exome, du transcriptome, et du génome..... 34

CHAPITRE 3 :

Figure 8 : Produits d'amplification du gène *ERK* dans les neuf lignées cellulaires. 50

Figure 9 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *PLEC1*.. 60

Figure 10 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *SCRIB*. 67

Figure 11 : Séquence d'ADNg humain de référence de *SCRIB* à la position 144946796..... 67

Figure 12 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de <i>NCOR2</i>	73
Figure 13 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg d' <i>IKBKB</i>	76
Figure 14 : Séquence d' <i>IKBKB</i> de référence à la position 42296133.....	76
Figure 15 : Séquence d' <i>ITGAE</i> de référence à la position 3575965.....	80
Figure 16 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc d' <i>ITGAE</i>	80
Figure 17 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de <i>SEMA6C</i>	85
Figure 18 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de <i>GLCE</i>	88
Figure 19 : Superposition des structures tridimensionnelles sauvage et mutée du domaine répété Plectine 30 de <i>PLEC1</i>	99
Figure 20 : Superposition du domaine Sema sauvage et muté de <i>SEMA6C</i>	101
Figure 21 : Superposition des domaines Sema de <i>SEMA6C</i> sauvage et muté au niveau de la séquence <i>LKVLTPGGRSGGPEPILL</i>	102
Figure 22 : Superposition des domaines Sema de <i>SEMA6C</i> sauvage et muté au niveau de la séquence <i>AELGLDFQRFLTLNRT</i>	102
Figure 23 : Superposition des domaines PSI sauvage et muté de <i>SEMA6C</i>	103
Figure 24 : Niveaux d'expressions de <i>PLEC1</i> dans les neuf lignées cellulaires.....	105
Figure 25 : Niveaux d'expressions de <i>SCRIB</i> dans les neuf lignées cellulaires.....	106

Figure 26 : Niveaux d'expressions de *SEMA6C* dans les neuf lignées cellulaires. 106

CHAPITRE 4:

Figure 27 : Publications sur le séquençage de nouvelle génération parus dans NCBI durant la dernière décennie (jusqu'à juin 2012). 109

Annexe :

Figure supplémentaire 1 : Variation du taux de CA125 au cours du traitement des patientes 1369 (A), 2295 (B), et 3133 (C) et moment clinique du prélèvement de tissus mis en culture xxiv

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
Bard1	BRCA1 associated RING domain 1
Bcr-abl	Breakpoint cluster region- Abelson
BER	Base excision repair
BOV	Benign ovarian tumor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	Breast cancer 1 gene
BRCA2	Breast cancer 2 gene
BUB1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1
BUB1B	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 beta
CA125	Ovarian carcinoma antigen; mucine 16 : MUC16
CCNE1	Cycline E1
CDDP	Cisplatin
CDKN2A/2B	Cyclin-dependant kinase inhibitor 1A/2B
CEO	Cancer épithélial de l'ovaire (epithelial ovarian cancer, EOC)
CGH	Comparative genomic hybridization
CIN	Instabilité chromosomique
CML	Chronic myelogenous (or myeloid) leukemia
CT	Tomodensitométrie (computed/computerized tomography)

CTNNB1	Gène codant pour la β -caténine
Ctrl	Copper transporter protein 1
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
ddATP	Dideoxyadenosine triphosphate
ddCTP	Dideoxycytosine triphosphate
ddGTP	Dideoxyguanosine triphosphate
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphates
ddTTP	Dideoxythymidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DSB	Double strand break
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
EBV	Epstein-Barr virus
ER+	estrogen receptors positive
ERBB2	v-erb-b avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ET	Élément transposable
FA	Fanconi anemia
FFPE	Formalin fixed, paraffin embedded tissue
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FSH	Follicule-stimulating hormone
G	Grade tumoral
GIN	Genomic instability
GLCE	Glucuronic acid epimerase
GST	Gène suppresseur de tumeur
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGSC	High-grade serous carcinoma
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase

	beta
Indels	Insertions-délétions
ITGAE	Integrin, alpha E ou CD103 (Cluster of Differentiation 103)
KRAS	v-ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LGSC	Low-grade serous carcinoma
LH	Luteinizing hormone
LMP	Low malignant potential tumor; borderline tumor
LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIN	Microsatellite instability
MLH1	MutL E. coli homolog 1
MMR	Mismatch repair
MPSC	Micropapillary serous carcinoma
MRI	Magnetic resonance imaging
MSH2	MutS E. coli homolog 2
MSI	Microsatellite instability
MSI	Microsatellite instability
NCOR2	Nuclear receptor co-repressor 2
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non-homologous end-joining
NOTCH3	Neurogenic locus notch homolog 3
OCT	Optimal cutting temperature
ORF	Open reading frame
OSE	Ovarian surface epithelium
OV	Ovarian
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
PET	positron emission tomography
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase

PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PLEC1	Plectine
PMS1	Postmeiotic segregation increased <i>S. cerevisiae</i> 1
PMS2	Postmeiotic segregation increased <i>S. cerevisiae</i> 2
PPP2R1A	Protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Rad50	Homolog of <i>S.Cerevisiae</i> RAD50
Rad51	Homolog of <i>S.Cerevisiae</i> RAD51
RIN	RNA integrity number
RNAseq	RNA sequencing
RSF1	Remodeling and spacing factor 1
RT	Reverse transcription
S	Stade de la maladie
SAC	Spindle assembly checkpoint
SBT	Serous borderline tumor
SCID	Severe combined immunodeficiency
Score P	Score primaire
Score R	Score récurrence
SCRIB	Scribbled homolog
SEMA6C	Semaphorin-6C
siARN	Small interfering RNA
SNG	Séquençage de nouvelle génération
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SNV	Single-nucleotide variation
TOV	Invasive ovarian tumor
TP53	Tumor protein 53
TSNG	Technologie de séquençage de nouvelle génération
Wnt	Wingless integration site
ZNF217	Zinc finger protein 217

*À mes parents,
À mon amour et ma petite Dahlia pour avoir illuminé ma vie*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directrices de recherche, les Dres Anne-Marie Mes-Masson et Diane Provencher, pour m'avoir accueillies dans leur laboratoire et m'avoir confiées ce projet de maîtrise si enrichissant. Je les remercie pour leur support et leur générosité.

I am sincerely thankful to my mentor Dr Michael Quinn who followed me step by step during my master's project. I want to thank you for teaching me the basics of lab work, for answering my questions and for helping me to improve my english.

Merci également à tous les membres du laboratoire pour leurs conseils et leur aide. Plus particulièrement, je remercie Véronique Barrès, Katia Caceres, Liliane Meunier, Ingrid Labouba, Hubert Fleury et Yannick Huon. Vous m'avez toujours été d'une aide précieuse! Vos sourires, votre support et nos discussions m'ont énormément aidé à faire avancer ce projet. Merci aussi au Dr Benjamin Péant et au Dre Guergana Tchakarska pour la correction et la révision de ce manuscrit. Je remercie Dre Euridice Carmona qui avait toujours des réponses à mes questions scientifiques et techniques.

J'adresse un remerciement particulier à Manon de Ladurantaye, à Lise Portelance et à Louis Cyr pour leurs conseils et leur soutien technique. J'aimerais remercier également Louise Champoux et Vivianne Jodoin pour leur assistance administrative.

J'en profite également pour remercier tous les membres de l'ICM, notamment Kathleen Spring et Christine Caron du laboratoire de Dre Isabelle Royal et Antonio Layoun du laboratoire de Dre Manuella Santos.

Je suis également reconnaissante envers mes directrices de recherche, l'Institut du cancer de Montréal et Canderel pour le soutien financier offert lors de mes études.

Enfin, un merci particulier à mes parents et ma famille pour leur confiance en moi et leurs innombrables encouragements. Et le dernier, mais non le moindre, un grand merci à mon amoureux, Rabih qui a toujours su m'encourager, m'écouter et me reconforter. Je n'ai même pas les mots pour te dire à quel point je te remercie de m'avoir comprise avec une patience et une sérénité à toute épreuve. Merci pour ton amour et tes câlins et merci d'être là.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Le cancer de l’ovaire

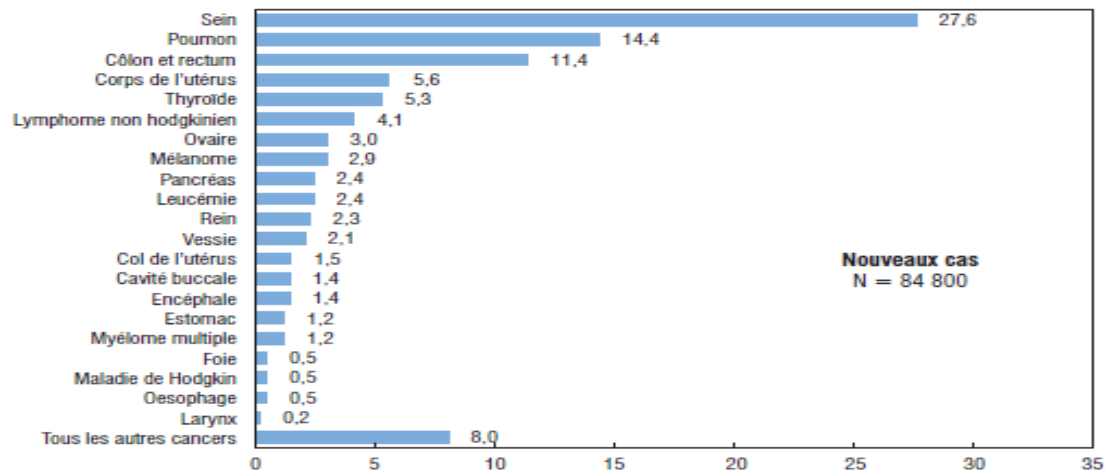
Le cancer a tout d’abord été défini comme étant un état pathologique caractérisé par la prolifération dérégulée des cellules au sein d’un tissu normal. Aujourd’hui il est connu que les tumeurs apparaissent suite à diverses transformations génétiques et épigénétiques. Des altérations dans les mécanismes de prolifération, de croissance, d’apoptose, d’invasion et de migration, d’angiogenèse et l’acquisition d’un potentiel de réplication illimité confèrent aux cellules normales plusieurs caractéristiques qui leur permettent de survivre et de se transformer en cellules cancéreuses. Durant la dernière décennie, la reprogrammation du métabolisme cellulaire et l’échappement au système immunitaire ont été également proposés comme étant des mécanismes contribuant à la carcinogenèse [1, 2].

Le cancer épithélial de l’ovaire est une maladie complexe qui peut toucher soit un soit les deux ovaires. Souvent, ce cancer est qualifié de tueur silencieux du fait que les symptômes sont difficiles à déceler à des stades précoces de la maladie [3]. Ainsi, plus de 70% des femmes sont diagnostiquées à des stades avancés, où les cellules cancéreuses ont déjà envahi la cavité péritonéale. Malgré l’avancement des traitements, le taux de mortalité lié à ce cancer n’a pas changé dans les 30 dernières années. Le caractère asymptomatique de cette maladie, l’absence de marqueurs de dépistage et de suivi de sa progression ainsi que le développement fréquent de résistances à la chimiothérapie constituent les obstacles responsables du faible taux de survie des patientes atteintes.

1.1.1 L’épidémiologie du cancer de l’ovaire

Au Canada, le nombre de personnes diagnostiquées avec un cancer augmente chaque année, avec 177 800 nouveaux cas pour l’an 2011, dont 84 800 femmes [4]. Parmi ces femmes, 2 600 ont été diagnostiquées avec un cancer de l’ovaire et 1 750 sont mortes de ce cancer. Le cancer de l’ovaire représente environ 3% des nouveaux cas de cancers féminins diagnostiqués au Canada en 2011, ce qui en fait le 7^e cancer en incidence (figure 1A). Contrairement au faible taux d’incidence, le taux de mortalité, estimé à 4.9%, le place au rang du plus meurtrier cancer gynécologique et le 5^e cancer le plus léthal chez les canadiennes (figure 1B). Pour le cancer de l’ovaire, la survie dépend de plusieurs déterminants dont les plus importants sont l’âge de la patiente, le stade de la maladie et l’histotype de la tumeur. Le taux de survie des patientes cinq ans après le diagnostic est évalué à 40% pour les patientes d’âge moyen (41-44) et 20% pour les plus âgées [4, 5].

A)



B)

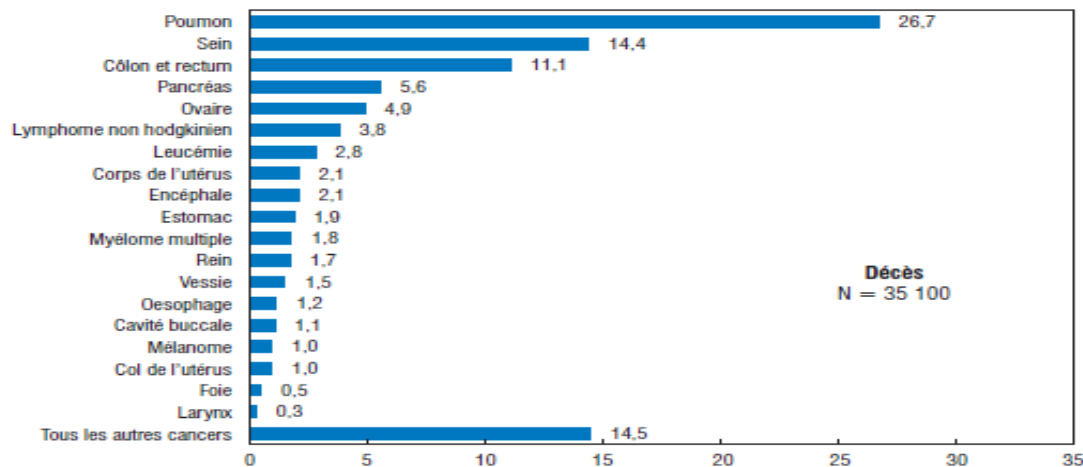


Figure 1: Répartition en pourcentage du nombre estimé de nouveaux cas (A) et de décès (B) pour les cancers les plus fréquents chez la femme en 2011 au Canada (tirée de [4])

1.1.2 L'étiologie et les facteurs de risque du cancer épithélial de l'ovaire (CEO)

Bien que les événements moléculaires impliqués dans l'initiation et la progression de la carcinogenèse des cellules ovariennes soient mal connus, quelques facteurs sont susceptibles de contribuer à la tumorigenèse [6]. Le

tableau suivant récapitule les différents facteurs environnementaux et comportementaux qui pourront augmenter l'incidence du cancer de l'ovaire (tableau I).

Facteurs de risque	
Âge	Le taux d'incidence augmente à chaque tranche de 10 ans et atteint un maximum vers 75 à 80 ans [7].
Alimentation	Les acides gras saturés, incluant le lait et ses dérivés, l'amidon, et la viande rouge augmentent le risque du cancer de l'ovaire. Ce risque diminue avec la consommation de poisson, d'huiles végétales, de haricots, de lentilles et de pois [6].
Habitudes de vie	L'obésité est associée à un arrêt de l'ovulation et à une diminution des niveaux de progestérones chez les femmes en pré-ménopause ainsi qu'à une augmentation du niveau d'œstrogène chez les post-ménopausées. Ces événements pourront contribuer à la tumorigenèse des cellules de l'ovaire. Les cigarettes contiennent plus de 60 carcinogènes qui peuvent altérer le fonctionnement de l'ovaire, affecter les concentrations des hormones stéroïdiennes et engendrer des problèmes de fertilité en causant des adduits à l'ADN des ovocytes et des cellules de la granulosa [8, 9].
Facteurs environnementaux	Le talc, les pesticides, l'amiante, les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, les fibres synthétiques, le diesel et les polluants industriels contribuent à l'étiologie du cancer de l'ovaire [6, 10, 11].
Ovulation et gonadotrophines	Les grossesses multiples, l'allaitement et la prise de contraceptifs oraux sont associés à une diminution du risque du cancer de l'ovaire puisqu'ils inhibent l'ovulation. Inversement, la ménarche précoce, la ménopause tardive, la nulliparité, l'infertilité et la prise d'hormones à la ménopause augmentent les risques de développement du cancer de l'ovaire [12]. Les niveaux élevés de la gonadotrophine stimulent l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) augmentant ainsi la production d'œstrogène. L'œstrogène stimule la prolifération des cellules épithéliales de l'ovaire, pouvant mener ainsi au développement des tumeurs ovariennes [13].
Facteurs génétiques	10% des cas de cancer de l'ovaire sont dus à des facteurs héréditaires, tels que les mutations de BRCA1/2 et les mutations des gènes de réparation de l'ADN [5].

Tableau I : Facteurs de risque du cancer de l'ovaire

Tous ces facteurs pourront contribuer directement ou indirectement au développement des cancers ovariens sporadiques ou héréditaires. L'ovulation, l'inflammation et les dommages à l'ADN sont les principaux mécanismes qui conduisent à la formation des tumeurs ovariennes. Dans le cas des cancers héréditaires, trois facteurs contribuent à la tumorigenèse de l'ovaire. D'abord, le fait qu'un parent direct (mère, sœur ou fille) soit affecté par le cancer de l'ovaire augmente le risque de développer un cancer spécifique de l'ovaire de 5 à 7 % et de 7 à 15% si deux parents au premier degré ou plus sont atteints.

De plus, les cancers sein-ovaire sont causés par la mutation des gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1/2* dans 90% des cas. Ces deux gènes sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la transcription, le remodelage de la chromatine, la signalisation des dommages à l'ADN par la voie ATM/ATR et l'apoptose. Les femmes porteuses de la mutation *BRCA1/2* ont 10 fois (35-60% pour *BRCA1* et 12-25% pour *BRCA2*) plus de risque de développer un cancer de l'ovaire que les femmes non-porteuses (1.6%) [14]. Ceci est dû au fait que les cellules porteuses de ces mutations sont incapables de réparer les cassures double brins de l'ADN d'une façon fidèle et ont plutôt recours à la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) menant ainsi à l'instabilité génomique et au cancer [15].

Enfin, le syndrome de Lynch ou HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) prédispose aux cancers colorectaux, endométriaux, ovariens et urinaires. Ce syndrome est associé à des mutations des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (*DNA mismatch repair genes*) [14].

1.1.3 Les différentes tumeurs de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est une maladie complexe qui présente une grande diversité de malignité. Les tumeurs ovariennes sont classées selon l'histologie de la cellule à l'origine de la pathologie (figure 2).

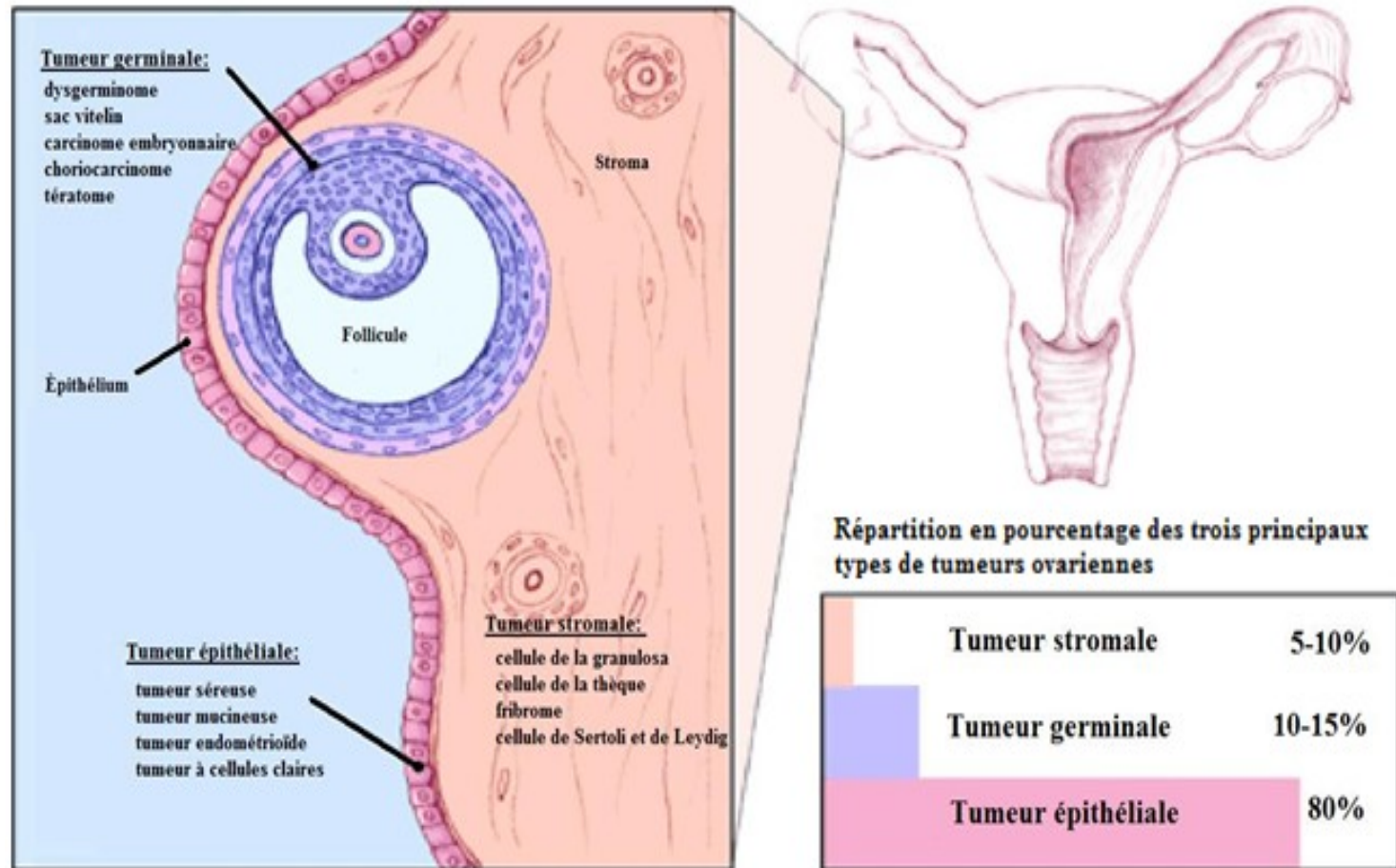


Figure 2 : Origines des trois principaux types de tumeurs ovariennes (modifiée de [16])

1.1.3.1 Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels

Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels, sont des tumeurs de bon pronostic qui ont pour origine les cellules de la thèque, les cellules de la granulosa, ou les cellules de Sertoli et de Leydig. Ces tumeurs sont souvent associées à une activité endocrinienne et peuvent produire des hormones menant au développement de traits

masculins ou féminins chez les patientes. Les tumeurs stromales représentent 5 à 10% des tumeurs de l'ovaire et sont majoritairement (70%) dérivées des cellules de la granulosa [16].

1.1.3.2 Les tumeurs germinales

Les tumeurs germinales se développent à partir des cellules productrices d'ovocytes. Ces tumeurs se forment plus souvent chez les jeunes filles et moins fréquemment à l'âge adulte. Un tiers des tumeurs germinales diagnostiquées chez les enfants et les adolescentes sont malignes. Lorsqu'elles sont diagnostiquées à l'âge adulte, ces tumeurs sont plus souvent bénignes [17]. Elles représentent 1-2% des tumeurs de l'ovaire. Les dysgerminomes sont des tumeurs composées des cellules germinales non différenciées et représentent la forme la plus fréquente des tumeurs germinales soit 30 à 40%.

1.1.3.3 Les tumeurs épithéliales de l'ovaire

Les tumeurs épithéliales représentent environ 80% des tumeurs de l'ovaire. Auparavant, il a été considéré que ces tumeurs dérivent de la surface épithéliale de l'ovaire (OSE ou *ovarian surface epithelium*). Des études récentes montrent que les tumeurs épithéliales proviennent des différentes cellules épithéliales du tractus génital [18]. La section suivante traitera de ces tumeurs d'une façon plus détaillée.

1.2 Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO)

1.2.1 Classification des tumeurs de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)

La complexité et l'hétérogénéité du CEO ont poussé la FIGO à établir quatre critères afin de bien définir ces tumeurs, soit la classe tumorale, le type histopathologique, le grade et le stade. Un autre critère pronostic se rapporte à la maladie résiduelle lors de chirurgie dite de cytoréduction. Une masse tumorale résiduelle de un centimètre ou moins est décrite comme une cytoréduction optimale, alors que lors d'une chirurgie complète, il ne reste aucune maladie macroscopique visuelle

1.2.1.1 Les classes tumorales

Les tumeurs sont différenciées selon le degré de malignité de leurs cellules selon trois classes : les tumeurs bénignes (BOV), à faible potentiel de malignité (borderline ou LMP) et invasives (TOV).

1.2.1.1.1 Les tumeurs bénignes (BOV)

Les tumeurs BOV comptent pour 50% des tumeurs ovariennes diagnostiquées. Au niveau histologique, les BOV ne présentent pas d'atypie cellulaire mais plutôt une prolifération de l'OSE sans stratification [19]. Au niveau cytologique, quelques aberrations chromosomiques ont été rapportées dans les BOV telles que la trisomie du chromosome 12 [20, 21]. Les BOV sont des tumeurs non invasives diagnostiquées souvent chez les jeunes femmes. Elles se trouvent généralement sous forme de kyste et ne présentent pas de risque pour la patiente.

1.2.1.1.2 Les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP)

Les LMP comptent pour 15 % des tumeurs ovariennes. Elles sont associées à un meilleur pronostic par rapport aux tumeurs invasives, 90 à 95% des femmes atteintes survivent à cinq ans. Les LMP ou borderlines sont nommées ainsi car elles ont des caractéristiques qui se situent entre les BOV et les TOV. En effet, 25% à 50% des LMP sont bilatérales, un taux qui les situe entre celui des classes bénignes et malignes. De plus, les LMP présentent une prolifération épithéliale avec stratification mais moins importante que celle des tumeurs invasives. Ces tumeurs présentent certaines atypies cellulaires, un faible index mitotique et de rares invasions stromales [22]. Une faible proportion des LMP peuvent récidiver et présenter de l'aneuploïdie, un index mitotique élevé et de la microinvasion [23]. Ces tumeurs sont souvent confinées aux ovaires mais peuvent se répandre à distance sous forme d'implants péritonéaux qui, la majorité du temps présentent également une histologie à faible potentiel de malignité

1.2.1.1.3 Les tumeurs invasives (TOV)

Les tumeurs invasives (TOV) se caractérisent par une prolifération épithéliale avec stratification, un index mitotique élevé et beaucoup d'atypies cellulaires. Elles montrent souvent des zones de nécrose, d'hémorragie et d'inflammation [24]. Les TOV sont rarement diagnostiquées chez les femmes âgées de moins de 40 ans et sont souvent détectées à des stades avancés de la maladie. Ce sont des tumeurs agressives qui peuvent s'étendre au-delà des ovaires et métastaser à plusieurs organes. Moins de 30% des patientes diagnostiquées avec des tumeurs TOV survivent cinq ans après leur diagnostic [25].

1.2.1.2 Les types histopathologiques

Selon le type de cellules épithéliales constituant la tumeur, les tumeurs épithéliales de l'ovaire sont classifiées en tumeurs séreuses, mucineuses, endométrioïdes, à cellules claires, à cellules transitionnelles (ou de Brenner), mixtes et indifférenciées. Les quatre histotypes les plus fréquents sont décrits ci-dessous.

1.2.1.2.1 Les tumeurs séreuses

L'histotype séreux est le plus commun et compte pour plus de 80% de tous les cas de cancer ovarien [17]. Les cellules d'histotype séreux sont similaires à celles qui tapissent la paroi interne des trompes de Fallope [26]. Ces tumeurs peuvent être bénignes (70%), borderlines (10%) ou invasives (20%). Les tumeurs séreuses bénignes et borderlines sont traitées par chirurgie. Les tumeurs séreuses malignes sont traitées par chirurgie et chimiothérapie car elles sont souvent diagnostiquées à un stade avancé de la maladie. La survie à cinq ans des femmes atteintes d'une tumeur séreuse borderline est de 70-95% alors qu'elle est de 9% pour les femmes diagnostiquées avec une tumeur invasive de stade IV [17].

1.2.1.2.2 Les tumeurs endométrioïdes

Les tumeurs endométrioïdes sont composées de cellules qui ressemblent à celles de la paroi interne de l'utérus, l'endomètre. Ces tumeurs constituent environ 10-25% des cancers ovariens [17]. Elles sont surtout malignes et unilatérales et ont un meilleur pronostic que les tumeurs séreuses et mucineuses.

1.2.1.2.3 Les tumeurs mucineuses

Les tumeurs mucineuses sont caractérisées par une prolifération de cellules mucosécrétantes qui ressemblent aux cellules des épithélia endocervical ou intestinal. Ces tumeurs comptent pour environ 10% des tumeurs de l'ovaire. Plus de 80% des tumeurs mucineuses sont bénignes dont la majorité est unilatérale [17].

1.2.1.2.4 Les tumeurs à cellules claires

Les tumeurs à cellules claires sont constituées de cellules polygonales ayant un cytoplasme riche en glycogène. Ces tumeurs représentent seulement 4-5% des tumeurs malignes de l'ovaire. Elles ont un mauvais pronostic et le taux de survie à cinq ans est de 4% pour les patientes diagnostiquées avec une tumeur de stade IV [17].

1.2.1.3 Les grades de différenciation du CEO

Le grade représente le degré de différenciation cellulaire de la tumeur. La FIGO a adopté une échelle universelle afin d'établir le grade en se basant sur les critères suivants : l'activité mitotique, le polymorphisme nucléaire et l'architecture histologique. L'activité mitotique varie de 1 à 3 selon le nombre de mitoses constatées par champs d'observation. Le polymorphisme nucléaire est évalué selon l'importance de l'atypie nucléaire, correspondant également à un score variant de 1 à 3. Finalement, l'architecture histologique est notée de 1 à 3 selon la morphologie prédominante rencontrée (1= glandulaire, 2= papillaire ou 3= solide). Ensuite, les scores sont additionnés et classés afin d'assigner à la tumeur un grade. Une tumeur de grade 1, ou bas grade, contient des cellules différenciées, progresse lentement et se dissémine peu. Les tumeurs de grade 3, ou haut grade, sont des tumeurs invasives peu différenciées qui prolifèrent et se disséminent rapidement. Le grade 2 correspond à la situation intermédiaire [27].

1.2.1.4 Les stades du CEO (SI-SIV)

Le stade de la maladie est déterminé suite à une chirurgie effectuée par un gynécologue oncologue. Lors de la résection de la tumeur ovarienne, il est indispensable d'inspecter toutes les surfaces péritonéales. Le FIGO a établi 4 stades (I à IV) afin de mieux caractériser l'étendue et la sévérité de l'atteinte tumorale. Brièvement, une tumeur de stade I est limitée aux ovaires. Les tumeurs de stade II sont unilatérales ou bilatérales avec des extensions dans l'utérus, les trompes de Fallope ou dans d'autres tissus pelviens.

Le stade III est attribué lorsque les cellules tumorales sont disséminées aux ganglions lymphatiques ou sur les surfaces péritonéales. Enfin, le stade IV correspond aux tumeurs unilatérales ou bilatérales avec des métastases à distance [5].

1.2.2 Les origines possibles du CEO

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer les mécanismes de développement du cancer épithélial de l'ovaire. L'hypothèse classique est que le CEO se développe par la transformation et la prolifération des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire, de ses invaginations ou kystes d'inclusion [28, 29]. En effet, les cellules de la surface épithéliale ovarienne possèdent un pouvoir prolifératif élevé afin de réparer les blessures post-ovulatoires [30]. Lors de la réparation et de la prolifération, les cellules épithéliales pourraient subir des altérations génétiques et procéder à une transition épithélio-mésenchymateuse causant ainsi la perte de l'intégrité de l'épithélium ovarien [30]. D'autres études spéculent que la trompe de Fallope serait à l'origine du CEO de sous type séreux [18]. Des

études, réalisées sur des organes retirés par chirurgie prophylactique (chirurgie de prévention), ont montré la présence de lésions précancéreuses au niveau des trompes de Fallope, plus précisément aux extrémités des trompes (fimbriae) en contact avec l'ovaire. Cette hypothèse est soutenue également par le fait que les tumeurs ovariennes séreuses s'apparentent aux tumeurs de la trompe aux niveaux histologique et pronostique. Cependant, elle n'explique pas l'origine des autres tumeurs ovariennes [29, 31, 32].

L'endométriose est une maladie caractérisée par la présence de tissu endométrioïde bénin sur les trompes de Fallope, au niveau des ovaires et des tissus pelviens. Elle augmenterait le risque de développer des tumeurs invasives endométrioïdes et à cellules claires [29]. Cette hypothèse est, néanmoins, de moins en moins acceptée avec l'apparition de la théorie du modèle dualistique. Ce modèle, basé sur des études génétiques et moléculaires, propose que les tumeurs MPSC (*micropapillary serous carcinoma*) évoluent à partir des tumeurs LMP qui ont émergé des tumeurs BOV, mais ne progressent jamais en TOV. Les lésions précurseurs menant au développement des TOV ne sont pas encore identifiées mais il a été proposé qu'elles se développent *de novo* à partir de la surface épithéliale ou des kystes d'inclusions de l'ovaire [33, 34]. Le modèle dualiste sera décrit en détail dans la section 1.4.3.3.1.

1.2.3 Présentation clinique du CEO

1.2.3.1 Les symptômes

Le cancer de l'ovaire se développe pendant une longue période de temps de manière asymptomatique. Les symptômes apparaissent une fois que la masse tumorale s'étend dans les tissus et organes voisins. Ils sont souvent vagues, légers et parfois confondus avec ceux de troubles plus courants. Inconfort, douleur ou pression à l'abdomen, selles inhabituelles, indigestion, flatulences, constipation, vomissements, anémie, malaises gastriques, perte de poids, nausées, fatigue constante, troubles de menstruation, présence d'ascite et une miction plus fréquente sont parmi les symptômes de la maladie. Le fait que les ovaires se trouvent dans la cavité péritonéale fait en sorte que la tumeur a suffisamment d'espace pour atteindre une taille importante avant qu'elle soit décelable et dérangeante pour les mouvements de la patiente. De ce fait, 70% des femmes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire sont diagnostiquées à un stade avancé (III ou IV) de la maladie [35].

1.2.3.2 Les techniques de dépistage et de diagnostic

La détection de la maladie à un stade précoce est l'élément le plus important afin de réduire le taux de mortalité. Actuellement, il n'existe pas de programme efficace de dépistage systématique applicable à l'ensemble

de la population car aucun marqueur ne s'est avéré à la fois sensible et spécifique pour prédire la maladie [36, 37]. Le plus souvent, le diagnostic s'effectue suite à l'apparition des symptômes de stade avancé ou lors d'un examen gynécologique routinier.

La première étape du dépistage inclue une palpation de l'abdomen afin de vérifier la présence de masses tumorales. Si le médecin soupçonne la présence d'une tumeur ovarienne, une échographie pelvienne et abdominale ou une échographie endovaginale est pratiquée. En plus des tests d'imagerie, une mesure du niveau de CA125 (*cancer antigen 125*) sanguin est effectuée. Le CA125 est une glycoprotéine transmembranaire codée par le gène *MUC16*. La mucine 16 est faiblement exprimée dans l'épithélium ovarien [28]. Bast *et al.* [38] ont démontré que le taux sérique de CA125 est plus élevé chez les femmes atteintes d'un CEO (82%) que chez les femmes dans la population générale (1%) ou celles atteintes d'un cancer bénin (6%) ou non- gynécologique (28.5%). Cependant, ce biomarqueur manque à la fois de spécificité et de sensibilité. Seulement 50% des patientes atteintes d'un CEO précoce présentent un fort taux de CA125 [39]. Des maladies non- gynécologiques telles que l'insuffisance rénale ou hépatique et les cancers gastrique et pulmonaire montrent un taux sérique élevé de CA125. Le niveau de CA125 varie avec le cycle menstruel, la grossesse et l'âge des femmes [40]. En raison de son manque de spécificité et de sensibilité, le CA125 est utilisé conjointement avec l'échographie afin de confirmer le diagnostic [36].[41].

D'autres examens, comme la tomographie par émissions de positrons (PET scan), une tomodensitométrie (CT scan) ou une imagerie par résonance magnétique (MRI scan) sont utiles pour déterminer l'étendue de la maladie [42]. Un échantillon de tissu sera cependant essentiel afin de confirmer le CEO et de déterminer le grade et le type histologique.

1.2.3.3 Les traitements : chirurgie et chimiothérapie

La suspicion d'un CEO invasif de stade précoce sur la base de l'examen physique et de l'imagerie, nécessite la mise en œuvre d'une laparotomie exploratrice pour confirmer le type histologique et le stade ainsi que pour réduire la tumeur. L'approche globale de stadification chirurgicale consiste en une hystérectomie abdominale totale (ablation de l'utérus), une salpingo-ovariectomie bilatérale, et une omentectomie (ablation du grand épiploon), ainsi que la prise de biopsie dans les ganglions pelviens et para-aortiques et le prélèvement de liquide péritonéal [43]. Cette stadification précise par échantillonnage systématique des tissus 'à risque' permet d'éviter le danger de laisser des métastases non traitées [43].

En ce qui concerne la chimiothérapie, la FIGO recommande que toutes les patientes atteintes d'un CEO de SII reçoivent un traitement de chimiothérapie en plus de la chirurgie. En effet, les patientes ayant un CEO de stade précoce (stades I ou II) sont divisées en deux catégories. Pour les patientes atteintes d'une tumeur bien différenciée

de SI et de G1, la chimiothérapie adjuvante n'est pas recommandée car plus de 90% de ces femmes auront une longue survie sans maladie (> 10 ans). Alors que les patients de SI et de SII mais de G3 aussi que celles de stades III et IV verront une amélioration de leur survie lorsqu'elles reçoivent des traitements de chimiothérapie à base de platine (cisplatine ou de carboplatine) après la chirurgie [44].

Dans les cas de tumeurs invasives de SIII et de SIV, le traitement adjuvant de chimiothérapie est administré suite aux chirurgies et est habituellement constitué de taxanes, tels que le paclitaxel et le docetaxel, en combinaison avec des platines, telles que le carboplatine et le cisplatine. Le paclitaxel (Taxol) et le docetaxel sont des agents anticancéreux qui agissent en stabilisant les microtubules, bloquant ainsi la mitose. Le carboplatine et le cisplatine sont des agents alkylants de l'ADN, qui préviennent la réplication de l'ADN en empêchant les deux brins de se séparer. Le carboplatine est une molécule plus grande que le cisplatine et sa demi-vie (30 heures) est dix fois plus longue que celle du cisplatine (3 heures). Par conséquent, moins de carboplatine est nécessaire lors du traitement ce qui réduit la quantité de sous-produits toxiques [45].

En présence d'ascites et de métastases importantes, deux ou trois cycles de chimiothérapie peuvent être administrés avant la chirurgie pour diminuer, le plus possible, le volume de la tumeur primaire et faciliter la résection [36, 46].

Les agents chimiothérapeutiques peuvent être administrés par voie intra-péritonéale. Comparée à l'administration intraveineuse, l'injection de la drogue par voie intra-péritonéale a démontré une amélioration de 20-30% de la durée de survie sans progression de la maladie et de la durée de survie globale des patientes. Cependant, son utilisation est toujours critiquée à cause de ses effets toxiques, des problèmes techniques et des infections qu'elle cause [43, 47].

Le cancer de l'ovaire est rarement traité par radiothérapie car les doses minimales sont toxiques pour l'intestin grêle [48].

1.2.3.4 Le suivi des patientes

Le suivi des patientes diagnostiquées et traitées pour un cancer de l'ovaire se fait par divers examens gynécologiques, par échographies et par le dosage sérique du marqueur CA125 [49]. L'analyse des concentrations sériques de CA125 sera informative seulement si les patientes avaient des niveaux élevés de CA125 lors du diagnostic [43]. L'augmentation des niveaux sériques de CA125 est souvent un signe de récurrence de la maladie ou d'un traitement inefficace. Des prises de sang et des tests par imagerie sont pratiqués si la réapparition d'une masse est suspectée [5, 41].

1.2.3.5 La progression de la maladie et le développement de la chimiorésistance

Plus que 70% des patientes diagnostiquées avec un cancer épithélial de stade avancé, répondent au traitement mais 90% d'elles vont subir une rechute principalement en raison du développement de résistance à la chimiothérapie [50]. La maladie récurrente est souvent localisée au niveau de la cavité péritonéale sous forme de métastases, dans des sites ganglionnaires et au niveau de l'apex vaginal sous forme de petites masses pelviennes [5].

La récurrence signifie la reprise de la maladie. Si la réapparition de la tumeur se produit en moins de six mois après le traitement, la maladie est dite résistante aux agents chimiothérapeutiques utilisés. Si elle survient après six mois suivant le traitement, elle est dite sensible. Enfin si la tumeur progresse lors de la phase initiale de la thérapie, la maladie est qualifiée de réfractaire [51]. Pour les patientes ayant une maladie sensible, un traitement de deuxième ligne est offert, il consiste en une combinaison de taxanes et de platines. Les patientes présentant une maladie réfractaire sont soumises à d'autres drogues comme le topotécan ou la gemcitabine, qui inhibent la réplication de l'ADN [5]. Les traitements de deuxième ligne ne sont pas curatifs mais aident à contrôler la maladie et à améliorer la qualité de vie des patientes. Éventuellement toutes les patientes développent une maladie résistante.

1.2.3.5.1 Les mécanismes de résistance et les voies moléculaires impliquées

La résistance aux agents chimiothérapeutiques constitue un problème majeur dans le traitement du CEO. Il existe deux types de résistance à la chimiothérapie : la résistance innée et la résistance acquise. Les deux types impliquent les mêmes voies de signalisation et les mêmes mécanismes, sauf que la chimiorésistance innée signifie qu'une cellule cancéreuse naïve pour la chimiothérapie possède intrinsèquement des mécanismes de protection contre certains agents chimiothérapeutiques. La chimiorésistance acquise se produit en réponse à l'exposition de la cellule cancéreuse à un agent chimiothérapeutique [52]. Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer les mécanismes cellulaires aboutissant à la chimiorésistance acquise. Les agents chimiothérapeutiques causent des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses afin d'induire l'apoptose. Certaines mutations se produisent dans des gènes régulant la survie cellulaire. Ces mutations, parfois favorables, peuvent entraîner l'émergence de clones cellulaires résistants à l'origine d'une tumeur chimiorésistante. L'analyse du profil d'expression génique de cellules chimiorésistantes a montré la surexpression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération, de la réparation des dommages à l'ADN, et dans plusieurs mécanismes de tumorigenèse. La sous-expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose et de l'adhésion à la matrice extracellulaire a été

également rapportée [53, 54]. La dérégulation de l'expression de ces gènes contribuerait à l'acquisition, par la cellule d'un caractère chimiorésistant.

D'autres mécanismes pourraient expliquer la chimiorésistance tels que la diminution de l'accumulation intracellulaire de la drogue, soit par sa mauvaise internalisation, soit par son élimination. La dégradation et l'inactivation de la drogue, par le protéasome ou par les molécules contenant un groupement thiol, pourraient être l'un des mécanismes qui contribue au développement de la chimiorésistance du CEO [53, 55] (figure 3).

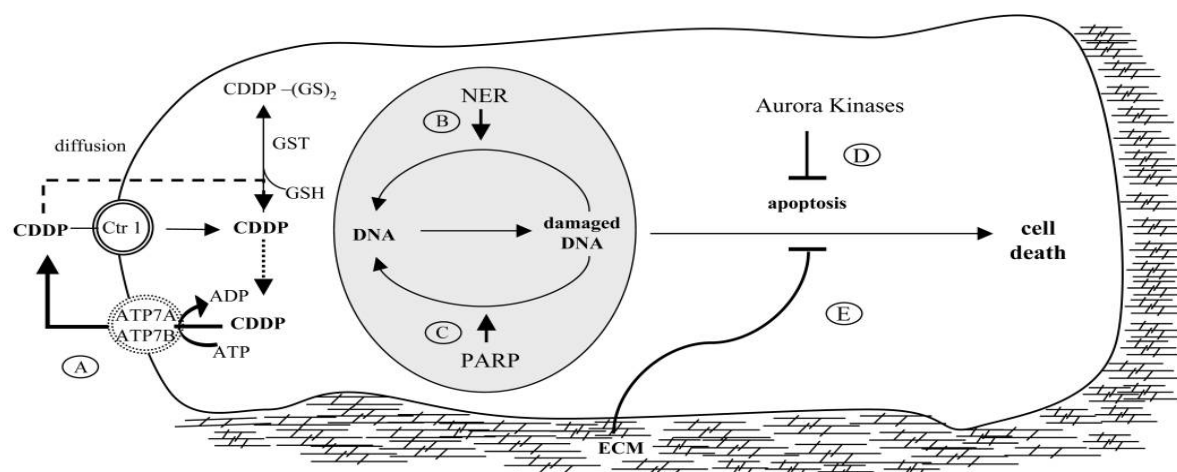


Figure 3 : Mécanisme de résistance aux agents à base de platine dans les cellules cancéreuses (Tirée de [56]).

Le cisplatine (CDDP) entre dans la cellule cancéreuse par Ctr1 (protéine d'internalisation du cuivre), ou par diffusion, et cause des dommages à l'ADN. La cellule chimiorésistante échappe à ce mécanisme par plusieurs voies: A) le cisplatine peut être éliminé de la cellule par ATP7B (protéine d'export du cuivre). B) La cellule peut réparer ses dommages par la voie de réparation par excision de nucléotide ou C) par la voie PARP. D) La kinase Aurora peut protéger la cellule contre la mort induite par la chimiothérapie en bloquant l'apoptose. E) Des changements dans la matrice extracellulaire, en faveur du microenvironnement tumoral peuvent inhiber l'apoptose induite par la chimiothérapie.

1.3 Les modèles d'étude

Différents modèles ont été développés afin d'étudier le cancer épithélial de l'ovaire. Ces modèles contribuent à l'amélioration du traitement, du dépistage et du diagnostic.

1.3.1 La banque de tumeurs

Le tissu ovarien sain ou tumoral constitue le modèle expérimental le plus représentatif de la maladie du fait qu'il subit le minimum de manipulations et d'altérations. L'ensemble des échantillons biologiques humains et de leurs données associées sont stockés dans une banque de tissus. Les échantillons de tissu original sont récoltés (tissu tumoral, ascite, sang), avec la permission des patientes, lors de la résection de la tumeur, et sont conservés dans la paraffine (*Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue* ou *FFPE*) ou dans l'OCT (*optimal cutting temperature*). Ces échantillons sont annotés par un pathologiste certifié et les données générées sont entreposées dans un dispositif informatique pour faciliter leur consultation et leur mise à jour [57]. Les échantillons peuvent servir, entre autres, à la création des puces de microétagés de tissus (*tissue microarray*, TMA) pour évaluer les niveaux d'expression de protéines d'intérêt et leur localisation cellulaire, par immunohistochimie.

1.3.2 La culture primaire

Les cellules des tissus ovariens récoltés ainsi que celles obtenues après centrifugation de l'ascite chez les patientes peuvent être mises en culture. Les cellules sont obtenues soit par grattage du tissu tumoral ou par dégradation du tissu par des collagénases [58]. La pression de sélection due à la mise en culture des cellules, induit la survie et la sélection de certaines cellules ce qui constitue un biais. Ces cultures primaires ne sont pas immortelles et ne sont utilisables que pour une courte période de temps.

1.3.3 Les lignées cellulaires

Après un certain nombre de passages (40-60), il arrive que certaines cultures primaires deviennent spontanément immortelles. Il est ainsi possible d'établir des lignées cellulaires dérivant soit des tumeurs solides, soit d'ascites. Les lignées cellulaires constituent un modèle important du fait qu'elles peuvent être modifiées génétiquement, utilisées sur une longue période de temps et amplifiées pour donner une très grande quantité d'extraits d'ADN, d'ARN et de protéines [59]. Malgré la similitude entre les caractéristiques *in vitro* des lignées cellulaires ovariennes et la tumeur d'origine, ce modèle de monocouche de cellules ne représente pas le microenvironnement tumoral [60, 61]. Pour cela, il a été développé un modèle plus représentatif de la tumeur

originale que la culture en monocouche. Il s'agit de déposer les cellules immortalisées sous forme de gouttelettes, les inverser dans un pétri puis les incuber pendant quelques jours. Ce modèle permet de développer des interactions cellule-cellule par la formation des structures tridimensionnelles plus complexes appelées sphéroïdes [62]. Le microenvironnement des sphéroïdes mime celui de la tumeur chez la femme, à l'exception de l'absence de cellules immunitaires.

1.3.4 Les xénogreffes

Des modèles *in vivo* du CEO sont obtenus par xénogreffe. La production de xénogreffes à partir de cellules tumorales humaines consiste à injecter des cellules d'une lignée dans des souris immunodéficientes comme les souris SCID (*severe combined immunodeficiency*). Ces souris ont un dysfonctionnement de leur système immunitaire permettant ainsi le développement d'une tumeur d'origine humaine [59, 63].

1.4 L'instabilité génomique et le développement du CEO

1.4.1 Aperçu de la génomique du cancer

En 1914, Theodor Boveri a formulé une hypothèse qui stipule que les altérations du nombre et du contenu des chromosomes d'une cellule contribuent à la tumorigenèse [64]. Au milieu des années 70, Nowell a proposé qu'après un évènement déclencheur transformant une cellule normale en une cellule cancéreuse, l'instabilité génomique cause des altérations génétiques qui contribuent à la progression tumorale et à la sélection des sous populations de cellules ayant un avantage prolifératif [65].

La première altération chromosomique fut découverte dans le contexte de la leucémie myéloïde chronique (CML). Il s'agit d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 aboutissant à la formation d'un gène de fusion *Bcr-Abl* sur le chromosome 22 qui sera appelé «chromosome de Philadelphie» [66]. Les premières tentatives pour identifier les gènes impliqués dans le cancer ont été entravées par la résolution limitée des techniques disponibles pour détecter les altérations génomiques et l'énorme complexité du génome tumoral [67]. Puis, le développement des techniques de coloration des bandes de haute résolution ont permis l'analyse détaillée des caryotypes des cellules tumorales et la détection des divers formes d'altérations chromosomiques. Les techniques de clonage de gènes et les essais fonctionnels ont mené à la découverte de plus de 100 oncogènes dont le premier fut le proto-oncogène *c-src* [67].

En 2001, IHGSC (*International Human Genome Sequencing Consortium*) et *Celera Genomics* ont divulgué la première analyse du «brouillon du génome humain» [68, 69]. Deux ans plus tard, la version complète de la séquence du génome humain fut publiée par IHGSC [70]. La disponibilité de la carte du génome et le développement des techniques de séquençage à haut débit ont permis de cartographier à grande échelle et plus rapidement les mutations somatiques dans les gènes impliqués dans le cancer. En conséquence, plusieurs approches thérapeutiques personnalisées ont été développées afin de cibler les cancers chez les patients qui partagent une dérégulation d'une même voie de signalisation [67].

En parallèle du projet «génome humain», plusieurs techniques ont été développées telles que les biopuces d'hybridation génomique comparative, les profils d'expression génétique et les méthodes statistiques. Ces outils ont permis d'analyser le nombre de copies d'un gène, son expression et la fréquence de sa mutation. Malgré qu'un bon nombre de mutations conductrices (contribuant au développement du cancer) trouvées ait été identifiées avant le séquençage du génome, ces techniques ont permis de découvrir plusieurs mutations passagères qui ne jouent aucun rôle dans la tumorigenèse [67].

En 2005, le NHGRI (*National Human Research Institute*) et le NCI (*National Cancer Institute*) ont lancé le projet TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) qui sert à cartographier les altérations génomiques présentes dans les formes majeures des cancers humains. Le projet pilote a recensé les mutations dans le glioblastome multiforme, le cancer du poumon et le cancer de l'ovaire [71].

1.4.2 L'instabilité génomique (GIN)

La division cellulaire implique plusieurs processus qui devront être bien coordonnés et surveillés afin d'assurer la préservation de l'intégrité du génome. Le bon fonctionnement des mécanismes de détection des dommages à l'ADN, de la réparation de ces dommages et de la progression du cycle cellulaire empêche toute forme d'altérations génétiques. Dans le cas où ces conditions ne seraient pas satisfaites, des mutations ponctuelles et des réarrangements chromosomiques peuvent se produire menant ainsi à l'instabilité génomique (GIN) [72]. La GIN est le résultat d'un échec de la cellule à transmettre une copie exacte de l'ensemble de son génome à ses deux cellules filles lors de la mitose. Cette instabilité mène à la polypléidie, une situation où la cellule présente un nombre anormal de chromosomes [72]. L'instabilité du génome est une propriété fréquente des cellules tumorales. [73].

Dans les cas de cancers héréditaires, l'instabilité génomique est la conséquence de mutations dans les gènes de réparation de l'ADN (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*) [74]. En ce qui concerne les cancers sporadiques, les bases moléculaires menant à l'instabilité génomique ne sont pas bien établies. Cependant, les études de séquençage à haut

débit suggèrent que les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *ATM*, *CDKN2A*) conduisent à un stress réplicatif et ainsi à l'instabilité génomique [74].

1.4.3 Les formes d'altérations

L'instabilité génomique fait référence à une série de modifications génétiques allant des mutations ponctuelles jusqu'aux mutations chromosomiques. Les mutations ponctuelles touchent un seul nucléotide à la fois et regroupent la substitution (le remplacement d'un nucléotide par un autre), l'insertion et la délétion d'un nucléotide. Les mutations chromosomiques touchent des fragments d'ADN de plusieurs nucléotides jusqu'à des chromosomes entiers. Elles regroupent les modifications du nombre et de la structure des chromosomes. Les anomalies du nombre sont de deux types; la polyploïdie où le génome entier se trouve en plusieurs copies et l'aneuploïdie où un ou plusieurs chromosomes se trouvent en plusieurs copies. Les anomalies de structure des chromosomes sont connues sous le terme de réarrangements chromosomiques et comportent les réarrangements équilibrés et déséquilibrés (détaillé dans 1.4.3.1.1) [75]. Une autre classe de mutations est celles qui touchent les séquences répétées telle que la perte ou le gain de motifs répétés (contraction et expansion) (voir 1.4.3.2) [76].

La section suivante traite en détails les différentes formes d'altérations qui sont soit la cause ou la conséquence de l'instabilité génomique.

1.4.3.1 L'instabilité chromosomique (CIN)

L'instabilité chromosomique représente la forme d'instabilité la plus répandue et prédispose à plusieurs cancers et syndromes caractérisés par des anomalies de croissance et des anomalies hématopoïétiques tels que l'anémie Fanconi, l'ataxie télangiectasie et le syndrome de Bloom. En 1966, le premier caryotype d'une cellule cancéreuse de l'ovaire a été réalisé par Yamada *et al.* [77]. Ce caryotype montrait la présence d'instabilité dans le nombre et la structure des chromosomes (55 à 69 chromosomes par cellule). Les études d'hybridation génomique comparative ont montré que les niveaux de CIN dans les tumeurs séreuses borderlines et de bas grade sont égaux entre eux mais sont plus faible que ceux des tumeurs séreuses de haut grade [34].

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer les mécanismes menant à l'instabilité des chromosomes. D'abord, les mutations de *BUB1* et *BUB1B*, gènes codants pour des protéines contrôlant le cycle cellulaire, sont suspectées de pouvoir causer cette instabilité. En outre, l'anomalie des centrosomes induite par l'amplification de la kinase Aurora A, est identifiée comme étant impliquée dans les altérations chromosomiques [78]. Thompson et Compton ont proposé que les cellules cancéreuses présentent initialement un défaut d'attachement des

chromosomes aux filaments du fuseau mitotique et sont capables d'entrer en anaphase tout en échappant au point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC). Cette mauvaise surveillance aboutit à deux cellules filles ayant chacune un nombre anormal de chromosomes [79].

1.4.3.1.1 Les réarrangements chromosomiques

Ce sont des modifications au niveau de la structure des chromosomes. Les réarrangements chromosomiques sont qualifiés de déséquilibrés ou d'équilibrés selon qu'ils entraînent ou non la perte de matériel génétique.

1.4.3.1.1.1 Les réarrangements équilibrés

Les réarrangements équilibrés préservent la quantité de l'ADN. Ils peuvent affecter un chromosome entier, par fusion ou fission, ou un segment chromosomique, par inversion, translocation et transposition. La fusion est la réunion de deux chromosomes en un seul, au niveau de leurs télomères. Tandis que la fission consiste à scinder un chromosome en deux. Ces deux types de réarrangements aboutissent à une modification du nombre de chromosomes du génome sans modifier la quantité d'ADN d'une cellule [80]. Un troisième type de réarrangement impliquant un chromosome entier est la formation de chromosome en anneau. Ce dernier est un chromosome dont les deux extrémités sont reliées. Ce type de réarrangement ne modifie pas le nombre de chromosomes d'une cellule [81].

L'inversion est un réarrangement intra-chromosomique, c'est-à-dire qu'il affecte un seul chromosome. Elle consiste à inverser un segment sur un chromosome. L'inversion existe en deux types, péricentrique et paracentrique. L'inversion est péricentrique si le segment inversé contient le centromère du chromosome, sinon elle est paracentrique [80, 82].

La translocation est un réarrangement inter-chromosomique, impliquant deux chromosomes non homologues. Il s'agit d'un échange de deux extrémités entre ces chromosomes. La translocation survient dans les cellules qui entrent en mitose ou en méiose avant de réparer leurs cassures double brin (DSB) [80, 82]. Les translocations équilibrées pourront ou non avoir des conséquences cliniques sur le sujet porteur. La leucémie myéloïde chronique (CML) est le résultat d'une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 [t(9;22)(q34;q11)] aboutissant à la formation du gène de fusion *Bcr-Abl*. Dans les cas de lymphome de Burkitt, la translocation du gène *c-myc* [t(8;14), t(8;2) ou t(8;22)] induite par l'oncogène viral EBV (*Epstein-Barr virus*), entraînera une activation de ce gène et la transformation cancéreuse des lymphocytes [80, 83, 84].

Il existe deux types de translocations équilibrées. La translocation réciproque qui correspond à un échange entre deux chromosomes non homologues et la translocation robertsonienne qui est une translocation impliquant deux chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) dont le bras court de très petite taille ne contient que des séquences microsatellites. La translocation robertsonienne peut être équilibrée ou déséquilibrée. La translocation robertsonienne équilibrée n'entraîne pas la perte du matériel génétique et n'a pas de conséquence clinique connue pour le sujet porteur [80, 85].

La transposition désigne le déplacement d'une séquence d'ADN au sein du génome. Ces séquences sont appelées éléments transposables (ET) [86]. La transposition peut se produire par excision et réinsertion (réarrangement équilibré) ou duplication et réinsertion (réarrangement déséquilibré) de l'ET [86]. Selon la position d'insertion, la transposition peut être intra- ou inter-chromosomique [87].

1.4.3.1.1.2 Les réarrangements déséquilibrés

Les réarrangements déséquilibrés modifient la quantité d'ADN par délétion ou par duplication. La délétion entraîne une perte d'un segment chromosomique. La duplication augmente la quantité de matériel génétique. Les séquences d'ADN dupliquées sont souvent situées côte à côte sur le chromosome, dans la même orientation ou bien inversées [80]. Un des mécanismes de duplication est la transposition de séquences d'ADN par duplication et réinsertion (transposition duplicative).

La translocation robertsonienne déséquilibrée entraîne une modification de la quantité de l'ADN soit par délétion ou par addition. Elle consiste en une fusion de deux bras longs de deux chromosomes acrocentriques avec, souvent, la perte des bras courts [80, 85].

1.4.3.2 L'instabilité des micro- et minisatellites (MIN ou MSI)

L'ADN satellite est un type de séquence répétée, non-codante qui représente 7% du génome humain. En fonction de la longueur de ces séquences, elles sont classées en minisatellites et microsatellites. Les minisatellites (VNTR ou *Variable Number of Tandem Repeats*) sont des petites répétitions de 10 à 100 pb (paire de base). Le nombre de loci contenant ces séquences est estimé à 1500 par génome haploïde. Les microsatellites (*SSR ou Simple Sequence Repeats*) sont de séquences répétées beaucoup plus courtes, de 2 à 4 nucléotides. La séquence microsatellite la plus commune dans le génome humain est le motif CA qui est répété des centaines de milliers de fois à travers le génome [78].

Le rôle des mini- et des microsatellites n'est pas bien élucidé mais des études ont montré leurs implications dans plusieurs pathologies génétiques [88, 89]. Des cancers colorectaux, endométriaux, ovariens et urinaires se caractérisent par une instabilité des microsatellites (MSI) dans les cellules tumorales. La cause principale de la MSI est l'altération des systèmes de réparation de l'ADN. De ce fait, la MSI est une marque d'une altération du système de réparation [78]. Durant la réplication de l'ADN, des mutations de type insertion ou délétion peuvent se produire et sont réparées par les gènes du MMR (*mismatch repair*) comme *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* et *PMS2*. L'inactivation de ces gènes par mutation ou par méthylation de leurs promoteurs engendre un défaut dans le système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN. Ce défaut est un événement déclencheur dans le développement de tumeur dans plusieurs organes dont l'ovaire et l'utérus [90]. Des erreurs dans la réplication des séquences microsatellites provoquent leur allongement ou raccourcissement. Ce changement dans la taille des microsatellites peut provoquer un changement du cadre de lecture lors de la traduction des protéines et provoquer ainsi la dérégulation de l'expression génique aboutissant potentiellement à la tumorigenèse [90].

La MSI est une forme d'instabilité très fréquente dans les carcinomes endométrioïdes (19%) et mucineux (17%) et moins fréquente dans les carcinomes séreux et à cellules claires de l'ovaire [34].

1.4.3.3 Les mutations ponctuelles

La mutation ponctuelle est une modification permanente de la séquence d'ADN d'un gène. Elle est principalement impliquée dans l'évolution des espèces, la diversification des phénotypes, les maladies génétiques et le cancer. Lorsqu'une mutation se produit lors de la réplication, elle est dite spontanée. Lorsqu'elle est causée par des agents mutagènes physiques et chimiques, la mutation est dite induite. Une mutation ne sera transmise que si elle affecte les gamètes (cellules germinales). Par contre, la mutation qui touche les cellules somatiques peut affecter la personne porteuse mais pas sa descendance [91].

Les mutations ponctuelles comprennent les substitutions, les insertions et les délétions. Une mutation de type substitution se traduit par un remplacement d'un nucléotide par un autre. La substitution peut engendrer une mutation silencieuse, non-sens ou faux-sens. La mutation silencieuse consiste à substituer un nucléotide par un autre, donnant un codon qui désigne le même acide aminé ou un acide aminé différent de même groupe [91]. Si la substitution donne un codon désignant un autre acide aminé, la mutation est dite faux-sens. Dans le cas de l'obtention d'un codon stop, elle est dite non-sens et elle aboutit à une protéine tronquée. Si la substitution touche un codon stop et le remplace par un autre acide aminé alors elle aboutit à une protéine plus longue (éventuellement, protéine chimère) [91]. L'insertion et la délétion correspondent à l'addition ou la suppression d'un ou de plusieurs

nucléotides. Ces mutations peuvent perturber le cadre de lecture. Lorsque le nombre de bases ajoutées ou supprimées n'est pas un multiple de trois, il y aura ainsi un décalage du cadre de lecture. L'insertion ou la délétion aboutissent souvent à un codon stop prématuré et celles qui touchent la région 3' d'un gène entraînent un allongement de la chaîne polypeptidique jusqu'à un nouveau codon stop [91].

Plusieurs études ont mis en évidence la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes dans les cellules tumorales. Les mutations dans des gènes suppresseurs de tumeur peuvent entraîner la perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity, LOH). La LOH se traduit par la perte de fonction d'un allèle d'un gène suppresseur de tumeur dont le deuxième allèle est déjà inactivé. En effet, c'est en étudiant les rétinoblastomes (tumeurs de la rétine) héréditaires et sporadiques, chez les enfants que Knudson a formulé la théorie sur les deux étapes de la tumorigenèse (*Knudson two-hit hypothesis of tumorigenesis*) [92, 93]. Le premier évènement de tumorigenèse ou '*hit*', qui pourrait être hérité ou acquis *de novo*, permet de distinguer les rétinoblastomes héréditaires des rétinoblastomes sporadiques. Il s'agit d'une mutation ou d'un grand réarrangement qui se produit dans un gène suppresseur de tumeur (GST). L'individu ne développe pas de cancer tant que la deuxième copie du gène (allèle) est toujours fonctionnelle. Le deuxième évènement serait causé soit par mutation, par perte de la bande chromosomique où est situé le gène, par délétion du chromosome entier emportant l'allèle sauvage, ou enfin par recombinaison somatique avec réplication de l'allèle muté [92, 93]. Ces évènements entraîneraient la perte de l'expression du gène muté ou l'expression d'une protéine non fonctionnelle favorisant ainsi l'initiation de la carcinogenèse [92-95]. Les gènes *BRCA1/2* et *TP53* montrent une perte d'hétérozygotie dans les tumeurs des patientes atteintes de cancers du sein ou de l'ovaire [96-98].

1.4.3.3.1 *Reclassification histopathologique des tumeurs selon leur patron de mutations (modèle dualiste)*

Les études génétiques, immunohistochimiques et morphologiques de tumeurs de l'ovaire, ont permis à l'équipe de Shih d'établir le modèle dualiste qui reclassifie les tumeurs de l'ovaire en deux types [33, 34, 99].

Le modèle dualiste stipule que les carcinomes de bas grade (type I) progressent à partir des tumeurs borderlines et que les tumeurs de haut grade (type II) se développent *de novo* à partir de la surface de l'épithélium ovarien ou de l'épithélium de la trompe [100] (figure 4). Ce modèle prend en considération l'hétérogénéité du CEO et lie les tumeurs de sous-types spécifiques avec leurs précurseurs potentiels.

1.4.3.3.1.1 Tumeurs de bas grade

Les tumeurs de type I comprennent les carcinomes séreux de bas grade, endométrioïdes de bas grade, à cellules claires, mucineux et les tumeurs de Brenner. Le type I regroupe les tumeurs indolentes de stade I et de bon

pronostic. Ce sont des tumeurs qui sont génétiquement stables et qui présentent des mutations typiques des gènes *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *ARID1A* et *PPP2RIA* mais rarement des mutations de *TP53* [33, 34, 99, 101, 102].

- Les tumeurs séreuses de bas grade

Les tumeurs séreuses de bas grade (LGSC) se développent à partir des tumeurs borderlines (SBT) qui évoluent en carcinomes séreux micropapillaires (MPSC) puis en LGSC mais ne progressent pas en HGSC [29]. Les tumeurs MPSC et LGSC se caractérisent par des altérations de la voie de signalisation *MAPK* telles que des mutations activatrices de *KRAS* et *BRAF* ou une insertion de nucléotides dans *ERBB2*, un gène codant pour HER2 [101]. Étant donné que les SBT ne présentent pas de mutations de *BRAF* et *KRAS*, l'acquisition de ces mutations semble une étape cruciale de l'évolution des tumeurs de SBT en MPSC et enfin en LGSC.

- Les tumeurs endométrioïdes de bas grade

Les carcinomes endométrioïdes de bas grade se caractérisent par les mutations qui dérégulent la voie PI3K/PTEN. Les mutations activatrices de *PIK3CA* et *PTEN* sont rapportées dans 20% des carcinomes endométrioïdes de bas grade [103-105]. Les mutations activatrices de *CTNNB1* se produisent dans 40% des cancers ovariens endométrioïdes et ont pour effet de déréguler la voie de signalisation WNT/ β -caténine impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, dans la motilité et dans la survie cellulaire [106] (figure 5).

- Les tumeurs mucineuses

Elles sont caractérisées par la présence des mutations *KRAS* dans les carcinomes mucineux [107] (figure 5).

- Les tumeurs à cellules claires

Elles présentent des mutations inactivatrices d'*ARID1A* et de *PIK3CA*, la délétion des loci de *PTEN* et de *CDKN2A/2B* ou l'amplification du locus de *ZNF217* (figure 5). Malgré le fait que les tumeurs à cellules claires et les tumeurs endométrioïdes dérivent des lésions d'endométriose et qu'elles partagent plusieurs mutations des mêmes gènes, ce sont deux histotypes qui se comportent différemment autant au niveau morphologique que clinique [102].

1.4.3.3.1.2 Tumeurs de haut grade

Les tumeurs de type II comprennent les tumeurs séreuses de haut grade, endométrioïdes de haut grade, mésodermiques malignes mixtes et indifférenciées. Ce sont des tumeurs agressives de stade avancé qui présentent à haute fréquence des mutations de *TP53* et beaucoup d'instabilité génomique. Les mutations caractéristiques des

tumeurs de type I sont rarement observées dans les tumeurs de type II. En outre, l'inactivation des gènes *BRCA1/2* est rencontrée dans 40 à 50 % des tumeurs séreuses de haut grade de type II mais aucune inactivation de *BRCA1/2* n'a été rapportée dans les tumeurs de type I [33, 34, 99, 101] (figure 4).

- Les tumeurs séreuses de haut grade

95% des HGSC portent des mutations inactivatrices du gène *TP53* ou accumulent p53 [29]. Les tumeurs HGSC sporadiques présentent très rarement des mutations de *BRCA1* et *BRCA2* qui sont surtout caractéristiques des tumeurs ovariennes familiales. Les HGSC se distinguent des autres histopathologies par le niveau élevé de perte ou de gain du nombre de copies des loci de plusieurs gènes tels que *CCNE1*, *NOTCH3*, *AKT2*, *RSF1* et *PIK3CA* [108] (figure 4 et 5).

- Les tumeurs endométrioïdes de haut grade

Elles se distinguent de celles de bas grade par la présence de mutations dans *TP53* et par l'absence de mutations dérégulant les voies PI3K/PTEN et Wnt/ β -caténine (figure 5) [109].

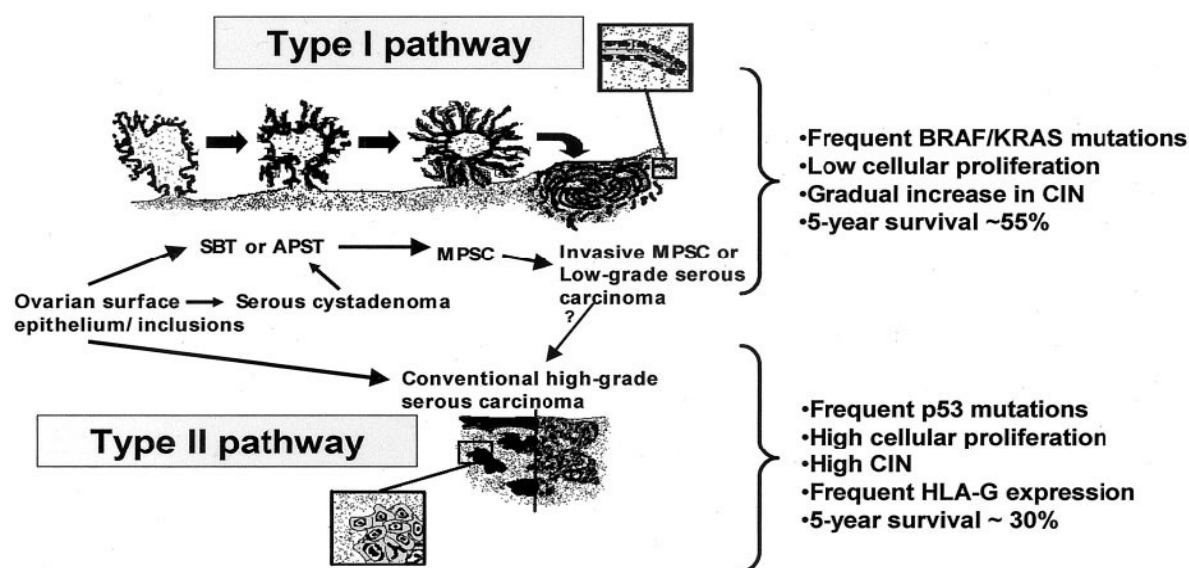


Figure 4 : Représentation schématique du modèle dualiste consacré au développement des carcinomes ovariens séreux (tirée de [33, 99])

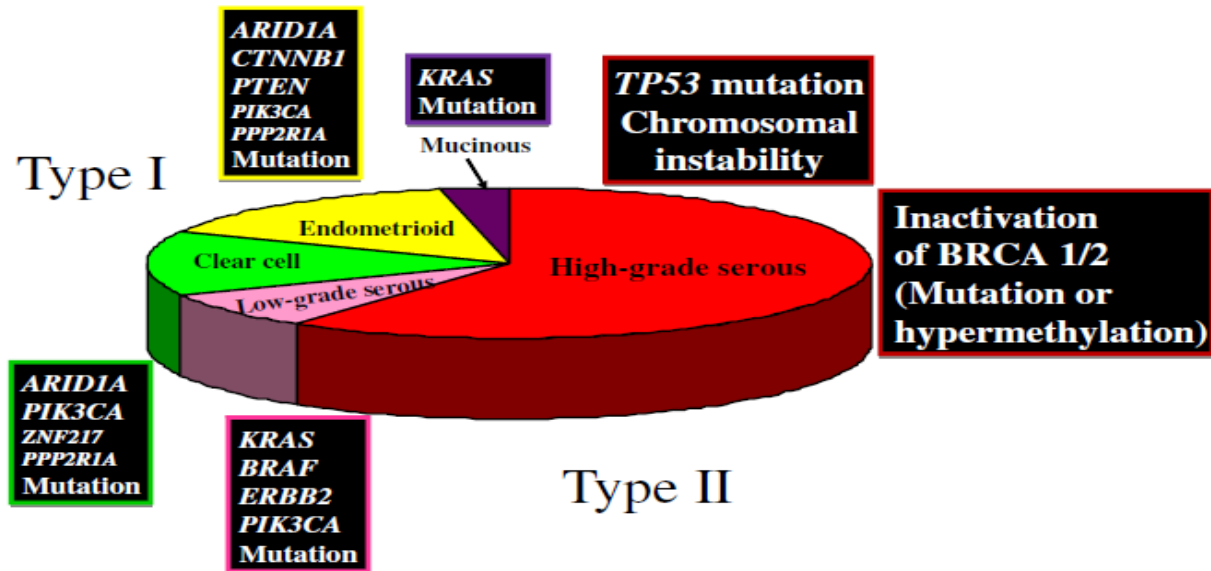


Figure 5 : Prévalence des types histologiques de CEO et les événements moléculaires les plus représentatifs (tirée de [101])

1.4.4 Les mécanismes de contrôle de la stabilité génomique

Les cellules normales ont principalement recours à quatre mécanismes pour maintenir leur stabilité génomique pendant la division cellulaire. Ces mécanismes sont : la haute fidélité de la réplication de l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire, la distribution égale des chromosomes entre les cellules filles lors de la mitose, la réparation des dommages à l'ADN, et les 'points de contrôle' du cycle cellulaire [110, 111].

1.4.4.1 La réplication

Durant la phase S, la totalité de l'ADN est fidèlement reproduite, une seule fois par cycle cellulaire. Une seule erreur dans ce processus constituerait une instabilité génomique. Plusieurs mécanismes liés à la réplication de l'ADN sont chargés de empêcher et/ou réparer les altérations génomiques tels que le contrôle de l'appariement des bases, la relecture (correction) par les ADN polymérases, la réparation des mésappariements, la remise en marche à temps des fourches de réplication bloquées, afin d'assurer la duplication complète du génome, la maturation des fragments d'Okazaki par élimination des fragments d'ARN à leur extrémité 5', le maintien des télomères et la duplication des signatures épigénétiques sur l'ADN et sur la chromatine néo-synthétisée [110].

1.4.4.2 La ségrégation chromosomique

Une fois l'ADN et les chromosomes dupliqués durant la phase S, la prochaine phase critique de la division cellulaire est la mitose. Au cours de la mitose, les chromatides sœurs sont réparties dans les cellules filles. Cela est assurée par plusieurs processus tels que la condensation des chromosomes, la connexion des chromatides sœurs, la duplication et la séparation des centrosomes, l'assemblage et la liaison des kinétochores, la formation du fuseau mitotique et les points de contrôle du cycle cellulaire, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. La dérégulation d'un de ces processus causera une instabilité chromosomique aboutissant ainsi à l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosome) et par la suite potentiellement au cancer [110].

1.4.4.3 La réparation

Durant le cycle cellulaire, le génome est sujet à diverses formes de dommages qui doivent être réparés afin d'assurer un bon déroulement de la réplication et de la ségrégation des chromosomes afin de préserver l'intégrité du génome. Les dommages à l'ADN sont réparés par plusieurs voies bien définies : la réparation par excision de base (*base excision repair*, BER), la réparation par excision de nucléotide (*nucleotide excision repair* NER), la réparation des cassures double brin (*double strand brake*, DSB). La réparation des mésappariements est un type particulier de NER qui permet la réparation des nucléotides liés inadéquatement durant la réplication.

Certains processus de réparation des dommages à l'ADN induits par des agents chimiques, peuvent provoquer des altérations de la séquence d'ADN ou des réarrangements génomiques comme la ligature des bouts non homologues (*non-homologous end joining*, NHEJ). Ce type de réparation prédispose à l'instabilité génomique.

Ces activités de réparation ainsi que leurs coordinations avec d'autres fonctions cellulaires (telles que la progression du cycle cellulaire et la mort cellulaire) sont réglementées par un réseau de signalisation des dommages à l'ADN. Toute dérégulation de ce réseau nuit à la réparation de l'ADN endommagé et contribue à l'instabilité génomique [110].

1.4.4.4 Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le déroulement et la progression du cycle cellulaire sont hautement coordonnés. L'entrée prématurée de la cellule dans la phase suivante du cycle cellulaire la prédispose à des altérations génomiques. Les points de contrôle du cycle cellulaire assurent que la progression du cycle cellulaire d'une phase à l'autre s'effectue adéquatement. Une autre fonction importante de ces points de contrôle est de déclencher certains processus comme l'apoptose, la catastrophe mitotique, et la sénescence afin d'éliminer les cellules endommagées [110].

Le point de contrôle G1/S sert à empêcher les cellules dont l'ADN est endommagé d'entrer dans la phase S, jusqu'à ce qu'elles réparent leurs dommages. Si la réparation n'aboutit pas, elles seront éliminées par apoptose ou par sénescence. Le point de contrôle G2/M empêche les cellules d'entrer précocement en mitose afin de minimiser les erreurs de ségrégation des chromosomes. Le point de contrôle intra-S permet de ralentir la duplication de l'ADN au cours de la phase S pour minimiser les erreurs de réplication [110]. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique assure la ségrégation des chromosomes. Enfin, le point de contrôle post-mitotique peut empêcher les cellules filles issues d'une mitose anormale d'entrer dans un nouveau cycle. Tous ces points de contrôle sont indispensables pour réduire l'instabilité génomique lors de la progression du cycle cellulaire [110].

1.4.5 Les méthodes de détection

L'étude des différentes formes d'instabilité nécessite l'étude du génome à différentes échelles. La détection des différentes formes d'altérations est une étape très importante car elle influence la suite des analyses. Dans cette section, nous discutons les différentes méthodes expérimentales utilisées.

1.4.5.1 Cytogénétiques

Plusieurs techniques expérimentales permettent d'analyser le génome à l'échelle des chromosomes. Ces techniques sont regroupées sous le nom d'approches cytogénétiques et servent à détecter les anomalies chromosomiques.

1.4.5.1.1 Caryotypage

Le caryotype désigne le nombre et l'apparence des chromosomes d'une cellule. En cytogénétique, le caryotypage consiste à visualiser les chromosomes, les identifier selon leur taille leur structure et les dénombrer.

La technique la plus simple est l'étalement chromosomique. Après avoir bloqué les cellules en métaphase, soit, le moment où l'ADN est le plus condensé, la membrane cellulaire est détruite dans une solution hypotonique, les chromosomes sont fixés et étalés sur lame, puis observés au microscope. Cette préparation permet uniquement la détection d'anomalies de ploïdie.

La technique de *chromosome banding*, développée dans les années 70, a permis d'avoir une meilleure résolution de la structure des chromosomes. Grâce à l'utilisation de différentes colorations sur la préparation par étalement chromosomique, il est possible de distinguer différentes parties du chromosome sous forme de succession de bandes claires et sombres [112]. La taille d'une bande étant approximativement de 4 Mb, seuls les grands

réarrangements, tels que les inversions, les translocations de grands segments chromosomiques, ainsi que les fusions et les fissions des chromosomes et l'aneuploïdie peuvent être identifiés [112].

1.4.5.1.3 Caryotype spectral (SKY)

Cette technique permet de visualiser simultanément toutes les paires de chromosomes d'une cellule en différentes couleurs. Cette technique consiste à utiliser différentes sondes spécifiques chacune à un seul chromosome. Chaque sonde est marquée avec un fluorochrome différent. Cette technique est utilisée pour identifier des aberrations chromosomiques dans les cellules cancéreuses où la coloration par Giemsa ou d'autres techniques ne sont pas suffisamment précises [113].

1.4.5.1.2 Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Cette technique est basée sur le principe d'hybridation. L'hybridation est un processus moléculaire qui joint deux séquences nucléotidiques simple brin complémentaires. La technique de FISH utilise ce processus pour repérer les anomalies chromosomiques par des sondes. Les sondes sont des petites molécules d'ADN simple brin, marquées par un fluorochrome et spécifiques à une ou plusieurs séquences d'intérêt. L'observation au microscope à fluorescence permet de visualiser la présence ou non de la séquence cible. [114].

La technique de FISH permet de détecter plusieurs formes de réarrangements chromosomiques ainsi que les anomalies liées au nombre de copies des chromosomes et à l'amplification des gènes dans les cellules cancéreuses [115]. En outre, cette technique est utilisée pour déterminer le diagnostic et le pronostic de plusieurs cancers (cancer du sein, cancer de la vessie, leucémie) [116].

1.4.5.1.4 Cytométrie en flux

Cette technique permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres défilent à grande vitesse devant le faisceau d'un laser (argon, krypton) ou d'une lampe (mercure) afin de les compter et de caractériser leur taille et leur structure. Ceci se fait en marquant les cellules avant leur passage dans le cytomètre avec des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire. Après leur illumination, ces molécules émettent des signaux de fluorescence qui seront captés par des détecteurs et transformés en signaux électriques. Ces signaux sont traités par un système informatique et chaque cellule est caractérisée par plusieurs coordonnées (taille, structure, fluorescence) qui forment des nuages de points sur un cytogramme [117].

En cancérologie, cette technique permet la détection des cellules malignes. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale [118].

1.4.5.1.5 L'hybridation génomique comparative

L'hybridation génomique comparative (comparative genomic hybridization, CGH) consiste à hybrider deux solutions d'ADN, une de référence et l'autre d'intérêt, marquées avec des fluorochromes différents, sur une préparation de chromosomes en métaphase, sur une puce microscopique contenant des milliers de clones ou encore sur des sondes d'ADN couvrant tout le génome de référence. La CGH permet d'identifier les variations du nombre de copies de l'ADN causées par les duplications et les délétions. Cette technique n'est pas capable de déceler les réarrangements équilibrés tels que les inversions et translocations. La comparaison des niveaux relatifs de fluorescence permet d'identifier les gains et les pertes de matériel génétique [119].

Les puces d'hybridation génomique comparative sont très utilisées actuellement, notamment pour l'analyse du génome des cellules cancéreuses [120].

1.4.5.2 Génétiques

Les mutations ponctuelles ne sont pas décelables par les techniques cytogénétiques. L'identification de ces mutations nécessite de nouvelles méthodes plus précises et plus sensibles. Le génotypage des SNPs sur puces et le séquençage conventionnel et à haut débit sont parmi les approches les plus sensibles, utilisées pour détecter les variations génétiques.

1.4.5.2.1 Génotypage des SNP sur puce

Les micropuces de polymorphismes nucléotidiques (*SNP array*) permettent d'étudier à l'échelle du génome les anomalies de nombre de copies (délétion, gain de copies et amplification) et de repérer les régions de perte d'hétérozygotie (LOH) et les disomies uniparentales. La disomie uniparentale se produit quand une personne possède deux copies d'un même chromosome ou d'un gène d'un parent et aucune copie de l'autre parent. Dans la majorité des cas, la disomie uniparentale n'a pas d'effet sur l'individu, mais lorsque le chromosome ou le gène dupliqué est porteur d'une altération génomique, elle est la cause de maladies génétiques. La technique de génotypage des SNP ne peut pas détecter les translocations équilibrées et les inversions. Elle permet de confirmer la présence des délétions homozygotes et hétérozygotes.

1.4.5.2.2 Séquençage Sanger

Le séquençage consiste à déterminer la séquence primaire d'un fragment d'ADN c'est-à-dire l'ordre d'enchaînement de ses nucléotides. La technique de séquençage a été développée pendant les années 70, par l'équipe de Walter Gilbert aux États-Unis et par Frédéric Sanger au Royaume-Uni selon deux approches indépendantes. La méthode de Sanger ou séquençage par terminaison de chaîne, consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une petite amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase thermostable, quatre désoxyribonucléotides (dNTPs : dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxyribonucléotides ou terminateurs de chaîne (ddNTPs : ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Les ddNTPs sont des dNTPs qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose. Une fois intégrés dans la séquence, ces nucléotides modifiés bloquent l'addition de nucléotides supplémentaires car la liaison covalente entre le ddNTPs et le nucléotide suivant ne peut se former [121, 122] (figure 6).

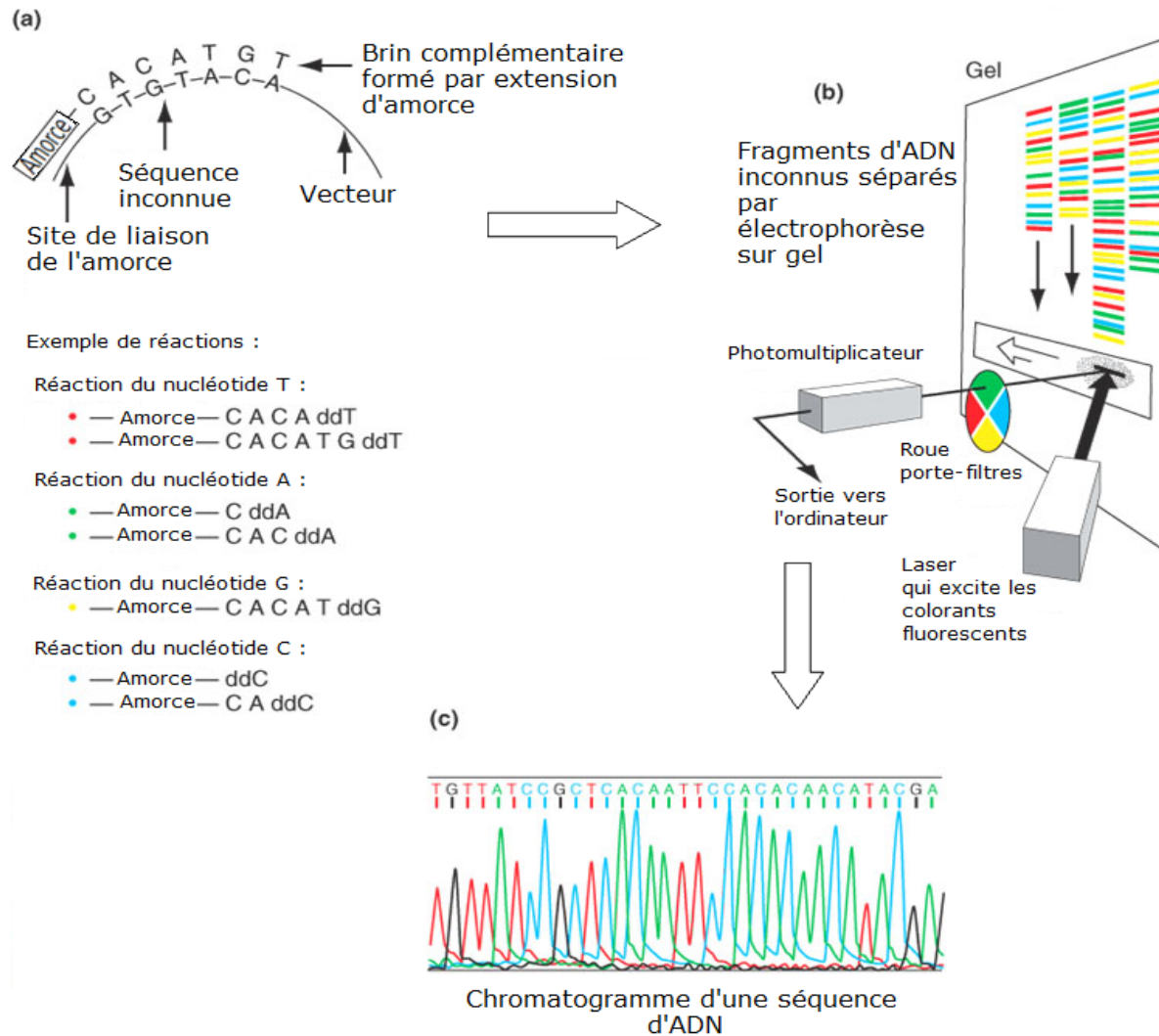


Figure 6 : Schéma explicatif des étapes du séquençage par la technique de Sanger. L'ADN polymérase se lie à la molécule d'ADN et synthétise un nouveau brin complémentaire à partir des dNTPs. L'incorporation d'un ddNTP à la chaîne à la place d'un dNTP engendre ainsi un arrêt de la synthèse du brin complémentaire par terminaison de chaîne. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles différentes qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel. Le gel est ensuite exposé à la lumière UV ou aux rayons-X, en fonction de la méthode utilisée pour le marquage de l'ADN.

Le séquençage Sanger permet de mettre en évidence des mutations ponctuelles mais ne permet pas de détecter les grands réarrangements car la longueur maximale d'un fragment d'ADN 'séquençable' est de moins de mille bases.

1.4.5.2.3 Séquençage à haut débit ou séquençage de nouvelle génération (SNG)

Le projet de séquençage du génome humain a été réalisé par séquençage Sanger. Ce projet a requis cinq ans et 300 millions de dollars pour séquencer un génome unique. Il a fallu développer une approche de séquençage plus économique [123]. En 2005, deux publications ont fourni un premier aperçu des progrès et des technologies à venir dans le domaine du séquençage [124-126]. Ces nouvelles approches sont basées sur des principes différents de ceux de la méthode classique de Sanger [121]. Elles sont collectivement nommées le séquençage de nouvelle génération (SNG) ou le séquençage massif en parallèle. La technologie de SNG (TSNG) permet le séquençage de centaines de milliers de fragments simultanément. Le SNG permet le séquençage du génome entier, de l'exome et des régions codantes (*whole transcriptome shotgun sequencing*)[127] (figure 7). Depuis son lancement en 2007, le SNG n'a cessé d'être amélioré de sorte qu'il existe plusieurs plateformes commerciales de séquençage telles que *Roche 454*, *genome analyser* d'*Illumina/ Solexa* et *ABI-solid* d'*Applied Biosystems*, ainsi que plusieurs approches de séquençage utilisées par chacune de ces compagnies [127].

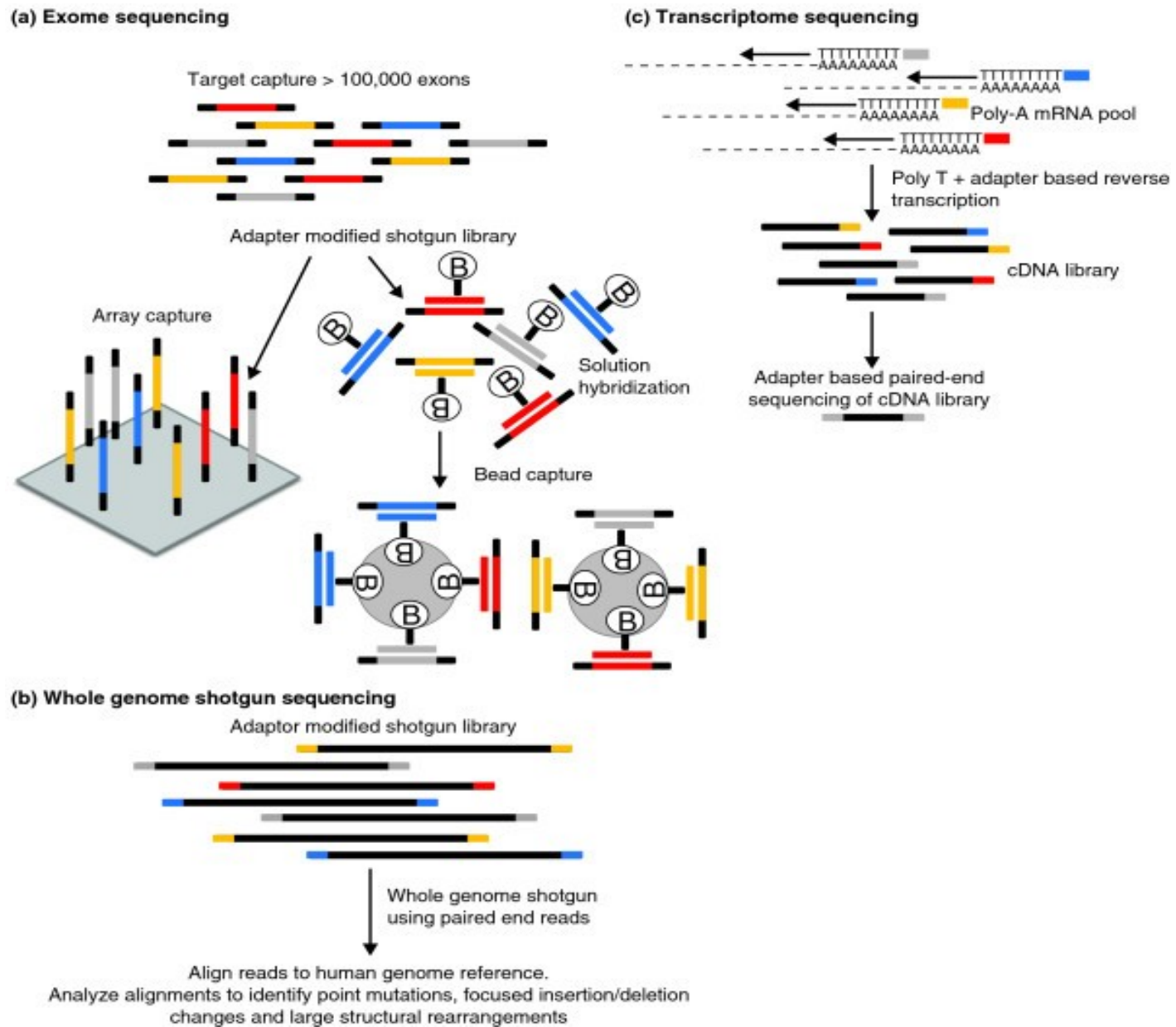


Figure 7 : Schéma explicatif du séquençage à haut débit de l'exome, du transcriptome, et du génome (tiré de [128]). a) Séquençage de l'exome : une banque de fragments génomiques aléatoires, contenant chacun des amorces spécifiques sur chaque extrémité, est associée à un ensemble de sondes de l'exome humain. Après l'hybridation, les fragments hybridés sont capturés en utilisant des billes magnétiques et isolés de la solution par l'intermédiaire d'un aimant, ou par capture en phase solide. Des conditions dénaturantes sont utilisées pour éluer les fragments génomiques capturées qui seront préparés pour le séquençage. b) Séquençage du génome entier : la préparation de la banque de fragments génomiques est identique à celle en a), mais les fragments résultants sont séquencés directement sans l'étape de capture. c) Séquençage du transcriptome : l'ARN est transformé en ADN

complémentaire (ADNc) par transcription inverse. Les ADNc obtenus sont fragmentés et les fragments résultants sont ligaturés à des amorces spécifiques pour les préparer au séquençage.

La technologie de SNG permet d'abord une annotation ou une ré-annotation plus précise et exhaustive d'un génome. De plus, elle permet d'étudier le polymorphisme nucléotidique et la susceptibilité aux maladies génétiques ainsi que la pharmacogénomique pour anticiper la réponse aux traitements [123, 129, 130].

1.4.5.2.3.1 Étude des mutations à l'échelle du génome par la TSNG

La disponibilité de la séquence du génome humain et l'amélioration des techniques de séquençage et de bioinformatiques ont permis l'identification de mutations somatiques impliquées dans le cancer à l'échelle du génome [131, 132]. La découverte de gènes mutés dans les cancers humains a permis de mieux comprendre les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la tumorigenèse ce qui a permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques. L'analyse consiste en la comparaison des séquences provenant d'échantillons tumoraux et celles provenant de tissus sains. Cette comparaison sert à identifier les variations à l'échelle nucléotidique et permet de mener des études plus approfondies sur les mécanismes causaux [127, 130, 133].

1.4.5.2.3.2 Le modèle d'étude

L'analyse des mutations par la TSNG comporte deux étapes : la phase de découverte et la phase de validation. La phase de découverte consiste à sélectionner les mutations somatiques par des algorithmes statistiques qui se basent sur la fréquence de ces mutations. Deux étapes particulièrement importantes doivent être prises en considération lors de cette phase. D'abord, il est important d'être capable de fournir des mesures quantitatives utiles afin de trier les meilleurs gènes qui seront étudiés de manière approfondie, et ensuite pointer vers des voies ou des gènes dont l'analyse peut mener à de nouvelles approches thérapeutiques [127, 133]. Selon le but de chaque étude, une stratégie de sélection est utilisée afin de choisir les mutations les plus importantes. Par exemple, afin de déterminer l'évolution d'une population tumorale, Shah *et al.*, ont séquencé le génome de cellules de cancer du sein lobulaire ER+ correspondant à plusieurs stades de la maladie [130]. Durant l'analyse des séquences, ont été éliminées les mutations présentes dans le génome humain de référence (polymorphismes) et les mutations germinales. Ainsi, 30 mutations considérées comme conductrices ont été sélectionnées [123]. Le séquençage de la tumeur primaire, prélevée 9 ans avant la tumeur métastatique, a montré qu'elle présente 11 des 30 mutations conductrices [123, 130].

La deuxième étape d'analyse est la validation des mutations choisies du fait de la fiabilité limitée de la TSNG et de ses algorithmes d'analyse. La validation des mutations se fait par séquençage Sanger sur des amplicons de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire des cellules cancéreuses [133].

1.4.5.2.3.3 L'analyse des mutations

L'évaluation de la fréquence de mutations n'est pas le seul moyen pour déterminer si un gène est important à étudier. L'analyse des effets prévus sur la fonction des protéines aide à prioriser les mutations et les gènes dans l'étude [132]. Par exemple, les mutations non-sens, les insertions ou les délétions produisant un décalage du cadre de lecture et les anomalies du site d'épissage sont particulièrement susceptibles d'altérer la protéine produite. Plusieurs logiciels et services sont actuellement disponibles pour évaluer et prédire l'effet de mutations sur la fonction des protéines au niveau conformationnel, tels que LS-SNP, Phyre et HHpred [132, 134].

1.5 Les objectifs de mon projet de maîtrise

La plupart des tumeurs du cancer épithélial de l'ovaire sont diagnostiquées à un stade avancé de la maladie. La majorité des patientes traitées par chimiothérapie rechutent suite au traitement et développent une tumeur plus résistante aux traitements actuels. Plusieurs études ont montré une augmentation du nombre de mutations dans la tumeur récurrente et dans les métastases. Cependant, il n'est toujours pas connu si cette augmentation contribuerait à l'évolution tumorale et/ou si c'est une conséquence des traitements chimiothérapeutiques.

Précédemment, dans notre laboratoire des lignées cellulaires de CEO ont été développées, à partir de la tumeur primaire et de la tumeur récurrente ou de l'ascite de trois patientes. Ces lignées constituent un modèle puissant pour révéler les modifications subies par les cellules du CEO au cours de la progression tumorale et suite aux traitements de chimiothérapie. Une caractérisation physiologique, moléculaire et génétique de neuf lignées cellulaires a été faite. L'exome (la partie codante du génome) et le transcriptome (ADNc) des lignées établies de la tumeur primaire et de la tumeur récurrente ont été séquencés par la technologie de séquençage de nouvelle génération (TSNG).

Le but de ce projet est d'analyser les variations génétiques entre les lignées établies à partir de la tumeur primaire et de la tumeur récurrente afin de rechercher des mutations dans des gènes clés qui sont dérégulés lors de l'initiation et de la progression tumorale et en réponse aux traitements.

Dans un premier temps, nous analyserons les résultats de séquençage afin d'identifier des gènes candidats selon leur patron de mutation. Ensuite, nous validerons ces mutations par séquençage Sanger et enfin nous étudierons l'effet de ces mutations sur l'expression des gènes candidats et sur la structure protéique.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Échantillons et données cliniques

Les échantillons de tissus tumoraux, d'ascites et de sang ont été collectés de trois patientes (1369, 2295, 3133) présentant un CEO, au cours des chirurgies effectuées au Département de gynécologie obstétrique au Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM- Hôpital Notre-Dame). L'étude a été approuvée par le Comité d'éthique institutionnel du CHUM et les patientes ont signé un formulaire de consentement au préalable. Le stade de la maladie a été déterminé au moment de la chirurgie par un gynéco-oncologue. L'histotype et le grade des tumeurs ont été déterminés selon les critères de la FIGO par un pathologiste certifié. Le tableau suivant récapitule les données cliniques des trois patientes (tableau II).

Patient	1369	2295	3133
Âge au diagnostic	58	59	52
Pathologie	Cystadénocarcinome séreux papillaire		
Stade, grade,	Stade III, grade 3,		
Survie (mois)	28	12	22
Chimiothérapie	Paclitaxel; Paclitaxel/Carboplatine; Doxorubicine liposomale; Topotécan	Cisplatine/Topotécan; Paclitaxel/Carboplatine; Doxorubicine liposomale	Paclitaxel/Carboplatine; Doxorubicine liposomale; Carboplatine/Gemcitabine

Tableau II : Données cliniques des patientes 1369, 2295 et 3133 (tiré de [135])

Les trois patientes ont suivi un traitement de chimiothérapie standard de première ligne. Les patientes 1369 et 2295 ont été sensibles au traitement, ce qui s'est traduit par la diminution du niveau sérique de CA125. Il est à noter que la patiente 1369 a été exposée à la chimiothérapie 14 mois avant son diagnostic du cancer de l'ovaire et ce, pour le traitement d'un cancer du sein. Pour la patiente 3133, la réponse à la chimiothérapie a été très modeste et il a été conclu que la tumeur est résistante au traitement de première ligne (figure supplémentaire 1). Les trois patientes ont subi un traitement de deuxième ligne suite à une réaugmentation de leurs niveaux sériques de CA125.

Des cellules cancéreuses ont été prélevées à différents moments de la maladie à partir des tumeurs solides et des ascites. Les lignées TOV1369TR, OV2295, TOV3133G, TOV3133D ont été établies au moment du diagnostic. Les lignées OV1369-2, OV2295-2, TOV2295, OV3133, OV3133-2 sont dérivées de tumeurs récurrentes qui ont été exposées à différents agents chimiothérapeutiques (tableau III).

2.2 Lignées cellulaires et conditions de culture

Des échantillons de tumeur solide ou d'ascite ont été prélevés au moment du diagnostic et au moment de la rechute des trois patients. À partir de ces cellules primaires neuf lignées cellulaires ont été dérivées par immortalisation spontanée des cultures primaires après 6 à 8 mois de culture.

Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues dans une atmosphère humide et hypoxique à 7% d'O₂ et 5% de CO₂ et cultivées dans un milieu OSE 1X (Wisent, Qc, Canada) complété avec 10% de FBS (sérum de veau fœtal), 0.5 µg/ml de l'antifongique amphotéricine B (Wisent, Qc, Canada) et 50 µg/ml de l'antibiotique gentamycine (Gibco, grand Island, NY) [136]. Les neuf lignées cellulaires ont été nommées par le code de chaque patiente. Les lignées TOV dérivées de tumeurs solides (TOV1369TR, TOV2295, TOV3133G, TOV3133D) ont été établies par la méthode de grattage cellulaire et celles dérivées d'ascites (OV) (OV 1369-2, OV2295, OV2295-2, OV3133, OV3133-2) ont été établies à partir des fractions cellulaires collectées par centrifugation d'ascites [136]. Les lettres «TR», «G » et «D» désignent respectivement la trompe de Fallope, l'ovaire gauche et l'ovaire droit.

Les lignées TOV1369TR, OV2295, TOV3133G, TOV3133D sont issues des prélèvements avant le traitement de première ligne. Les lignées OV1369-2, OV2295-2, TOV2295, OV3133, OV3133-2 sont dérivées à partir des échantillons récoltés après traitement chimiothérapeutique (tableau III).

Lignées	TOV1369TR	OV1369-2	OV2295	OV2295-2	TOV2295	TOV3133G	TOV3133D	OV3133	OV3133-2
Chimiothérapie	Ø* Doxorubicin, docetaxel, Cyclophosphamide, Radiothérapie	Ø *, Taxol/ Carboplatine Paclitaxel Doxorubicine liposomale	Ø	Cisplatine/ Topotécan Paclitaxel/ Doxorubicine liposomale	Cisplatine/ Topotécan Paclitaxel/ Doxorubicine liposomale	Ø	Ø	Paclitaxel/ Carboplatine	Paclitaxel/ Carboplatine Doxorubicine liposomale Carboplatine/ Gemcitabine

Tableau III : Drogues chimiothérapeutiques auxquelles ont été exposées les lignées cellulaires. Ø : pas de traitement, Ø * : traitement cancer du sein

2.3 Extraction d'ADN et d'ARN

L'ADN a été extrait selon le protocole de phénol-chloroforme décrit par Lounis *et al.* [58]. Brièvement, les cellules en culture, le tissu ou le sang ont été incubés une nuit à 55°C dans une solution de lyse (1 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 20% SDS, 10 mg/ml Protéinase K). Afin d'éliminer la fraction protéique, 0.5 ml de phénol saturé ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 rpm pour séparer le mélange en phase aqueuse contenant l'ADN et en phase hydrophobe contenant les protéines. Après 3 cycles de séparation, la phase supérieure contenant l'ADN a été déposée dans un nouveau tube, puis 0.5 ml de chloroforme/Iso-Amyl ont été ajoutés et les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 13000 rpm. Afin de précipiter l'ADN, 1 ml d'éthanol glacé 95% a été ajouté à chaque tube. Enfin, l'ADN a été prélevé et les sels ont été retirés par un traitement à l'éthanol froid 70%. L'ADN a été resuspendu dans le tampon TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) et la concentration finale a été ajustée à 1 µg/µl.

Les ARNs totaux du sang, des tumeurs primaires et des tumeurs récurrentes ainsi que celui des lignées cellulaires qui en dérivent ont été extraits. Après avoir homogénéisé les tissus tumoraux, les ARNs ont été extraits par le réactif TRIzol (Invitrogen) et purifiés par la colonne de RNeasy (Qiagen). L'ARN a été extrait à partir de cellules en culture à 80% de confluence à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen). Le contrôle de la qualité de l'ARN a été effectué grâce à l'appareil « Agilent 2100 BioAnalyzer » via la « BioAnalyzer Nano chip » (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) selon les instructions du fabricant. La qualité de l'ARN est déterminée selon le RIN (*RNA Integrity Number*) qui est considéré acceptable lorsqu'il est supérieur à 6,5.

2.4 Synthèse de l'ADN complémentaire

L'ADNc a été synthétisé à partir d'ARN par transcription inverse (RT). Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir de 1 µg d'ARN total selon le protocole de QuantiTect® Reverse Transcription (QIAGEN, Mississauga, ON). La première étape consiste à éliminer toute contamination d'ADN génomique présente dans les échantillons d'ARN en incubant 2 µl du gDNA Wipeout Buffer 7X (QIAGEN) et 1 µg d'ARN dans un volume total de 14 µl à 42°C pendant 2 minutes. La deuxième étape consiste à ajouter aux 14 µl contenant les ARNs purifiés, un mélange de 6 µl contenant 1 µl de Quantiscript Reverse Transcriptase (QIAGEN) (contient des dNTPs), 4 µl de Quantiscript RT Buffer 5X (QIAGEN) et 1 µl de RT Primer Mix (QIAGEN) (contient des oligos-dT). Le mélange de 20 µl est incubé à 42°C pendant 15 minutes pour permettre à la réaction de se dérouler puis à 95°C

pendant 3 minutes pour inactiver la Quantiscript Reverse Transcriptase. En raison de la stabilité de l'expression du gène *ERK* dans le tissu ovarien tumoral, il a été choisi comme contrôle pour évaluer la réussite de la réaction de transcription inverse. La PCR sur le gène *ERK* a été réalisée à 58°C avec les amorces suivantes : 5' CGCTGGCTCACCCCTACCT 3' et 3' GCCCCAGGGTGCAGAGATGTC 5' [137].

2.5 Séquençage de l'ADN et de l'ARN par TSNG

L'ADN génomique des neuf lignées cellulaires et de cellules sanguines (tissu normal de référence) des patientes 2295 et 3133 ainsi que l'ADN complémentaire des neuf lignées ont été séquencés par le système *Genome Analyser* d'*Illumina* (Illumina Inc., Hayward, CA) sur la plateforme du BC Cancer Agency (Vancouver, BC) [130, 133]).

2.6 Analyse des résultats de séquençage et choix des gènes candidats

Les résultats bruts de séquençage ont été analysés en utilisant deux algorithmes probabilistes, appelés A et B dans ce manuscrit, conçus selon des paramètres statistiques différents (matériel supplémentaire de [102, 133]). La première analyse faite par l'algorithme A n'inclut que le séquençage de l'ADNc des patientes 1369 et 3133 car celui de la patiente 2295 n'était pas disponible au moment de l'analyse. Par contre, la deuxième analyse réalisée par l'algorithme B a été faite sur le séquençage de l'ADNc des trois patientes.

L'analyse des insertions et des délétions a été réalisée par le programme Maq's indelpe. Afin de réduire les faux positifs dus aux erreurs d'alignements, plusieurs filtres et paramètres ont été appliqués aux résultats de séquençage (revu dans matériel supplémentaire de [133]).

Les résultats de l'analyse de séquençage ont été présentés sous forme d'un fichier Excel (Microsoft Excel) contenant des informations sur la lignée cellulaire, le gène muté, la position de la mutation et le domaine protéique auquel cette position correspond.

À partir de cette liste de gènes mutés, deux groupes de gènes ont été sélectionnés pour mener cette étude. Le premier groupe comporte des gènes mutés dans la plupart des lignées cellulaires et le deuxième groupe, des gènes mutés dans les lignées cellulaires établies à partir de la tumeur récurrente. Pour faciliter le tri, chaque lignée cellulaire présentant une mutation a été assignée avec un score de 1 et celle qui ne présente pas la mutation avec un

0. Les scores sont additionnés pour chaque gène et ceux qui présentent le score le plus élevé (score ≥ 6) sont sélectionnés pour la deuxième étape qui consiste à choisir les gènes qui pourraient avoir une relation fonctionnelle avec le cancer.

Pour choisir les gènes mutés dans les lignées établies après la récurrence, nous avons additionné séparément les scores des lignées établies de la tumeur primaire et ceux des lignées établies de la tumeur récurrente pour chaque gène. Ensuite, nous avons sélectionné les gènes dont le score total est de 0 pour les lignées établies de la tumeur primaire (score $P=0$, pas de mutation) et est supérieur à 1 (score $R > 1$, gène muté dans plus qu'une lignée) pour les lignées établies à partir de la tumeur récurrente. Vu le nombre limité de gènes qui ne sont pas mutés dans les lignées établies de la tumeur primaire (score $P=0$) et qui sont mutés dans toutes les lignées établies de la tumeur récurrente (score $R=5$), nous avons choisi le score $R>1$ pour avoir un plus grand nombre de gènes à sélectionner. Ainsi, les gènes choisis sont mutés dans au moins deux lignées cellulaires établies de la tumeur récurrente et dans aucune des lignées cellulaires établies de la tumeur primaire.

2.7 PCR et séquençage Sanger

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été faite sur l'ADNg et l'ADNc des neuf lignées cellulaires. Des amorces sens et anti-sens ont été conçues autour de chaque position de mutation pour l'ADNg et l'ADNc en utilisant le programme Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) et la base de données UCSC Genome Browser In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) (tableaux IV et V). La concentration finale des amorces est 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Les PCRs ont été faites en utilisant le kit de HotStarTaq® PCR (QIAGEN, Mississauga, ON). Chaque réaction de 25 μl contient 2.5 μl de PCR Buffer 10X (contenant 15 mM de MgCl_2), 4 μl de dNTPs (1.25 mM), 1 μl de l'amorce sens, 1 μl de l'amorce anti-sens, 0.2 μl de la HotStartTaq DNA Polymerase (QIAGEN, Mississauga, ON) et 1 μg d'ADN ou d'ADNc. Certaines réactions de PCR ont été réalisées en utilisant la Q-Solution 5x (QIAGEN) qui facilite l'amplification de l'ADN (tableaux IV et V). Les PCRs ont été réalisées avec le MBS Satellite 0.2G thermal cycler (Thermo Electron Corporation; Gormley, ON). L'amplification de la région cible débute par un cycle de 15 minutes à 95°C pour dénaturer l'ADN. La deuxième étape comporte 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à la température optimale d'hybridation de chaque amorce (tableaux IV et V) durant lesquels les amorces s'hybrident spécifiquement à l'ADN simple brin et 1 minute à 72°C où la polymérase synthétise le brin complémentaire par élongation. La dernière étape consiste en un cycle d'extension finale de 10 minutes à 72°C. La

taille et la qualité du produit de PCR sont testées sur gel d'agarose 1% (UltraPure™, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Les amplicons ont été séquencés par la méthode Sanger sur la Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du Centre de Recherche du CHUL (CHUQ) (<http://www.sequences.crchul.ulaval.ca/>). Les résultats de séquençage ont été visualisés à l'aide du logiciel 4Peaks (Mekentosj, Amsterdam, Netherlands) (<http://www.mekentosj.com/science/4peaks>) et alignés avec les séquences de référence humaines de la base de données UCSC Human Genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (NCBI36/hg18).

Gènes	Position génomique de mutation	Amorce 5'	Amorce 3'	Température d'hybridation	Qsolution	Taille d'amplicon (pb)
<i>PLEC1</i>	145062985	GTACTGCACCTCCAGGAAGC	GTCAGACCCCACTGAGGAGA	60	Oui	367
	145070608	TCGATGTCAGCCTTGTGTTG	CGGAGCAGGAGTTGATCC	60	Oui	544
	145096618	TGACACCTCCTCAAGCTCCT	GGCCATCTATGAGGTGCTCTT	60	Non	409
	145121456	GCGGGAACCTCAGTCAACCT	AGAGCATGGGGTCAATATG	60	Non	440
<i>SCRIB</i>	144964972	GCTGTAGGCCCTGTTGTAGG	TGCTCACCTGCTACTTGCTG	60	Non	356
	144946796	TGCTCATCCTCCTGTTCCCT	CCAGTATCTCGGAGGAATGC	60	Non	400
<i>NCOR2</i>	123390674	TCCCATATACCTCCCACCAA	AAGTCCATCCTCACGTCCAC	60	Non	441
	123390672	TCCCATATACCTCCCACCAA	AAGTCCATCCTCACGTCCAC	60	Non	441
<i>IKBKB</i>	42302646	TGAAGCCAGATGTGAAGCA	TGATGGTCACACTTGCCACT	60	Non	339
	42296133	GAAGAATTCCATGGCTTCCA	AAAGCATGGTGAGGAACACC	60	Non	463
<i>ITGAE</i>	3575965	GCACTGTGTCCAGGGATCTT	TCACCGGTAAACAGGTCCTC	60	Non	456
<i>SEMA6C</i>	149376141	CCCAGTCAAGGCCTGTAAAA	GCCCGGCTAATTTGTTTGTA	60	Non	391
	149374290	GCCTATTCTCTCCTGTCCA	TCAGGGAAAAGGTAGCCTCA	60	Non	393
<i>GLCE</i>	67335348	TCTGAATATGCGTTGCTTGG	AGACTTCGTTCCCTCTCGT	60	Non	386
	67335353	TCTGAATATGCGTTGCTTGG	AGACTTCGTTCCCTCTCGT	60	Non	386

Tableau IV : Amorces 5' et 3' et conditions de PCR pour les ADN_g des 7 gènes candidats. 26 amorces 5' et 3' ont été utilisées pour amplifier les 15 régions cibles contenant les mutations.

Gènes	Position de mutation dans l'ADNc	Amorce 5'	Amorce 3'	Température d'hybridation	Qsolution	Taille d'amplicon (pb)
<i>PLEC1</i>	c.13573C>T	GTACTGCACCTCCAGGAAG	GAGACGCTGGAGAAGGTGT	60	Non	318
	c.6058G>A	CAGGATCTCCTCCTCCACC	AGCGAGAAGTCCAAGCAGA	55	Oui	441
	c.415T>C	TGACACCTCCTCAAGCTCC	GATGGTGGCCAAGAAGGAC	60	Non	376
	c.119A>C	AGCTGGGTCCAGGACACTC	GAGGTCCGGGCAGTCTCT	60	Non	150
<i>SCRIB</i>	c.1283G>A	AGCGTCCTCATCACCTATGG	ACTCAGCGTCTCTCCTTGA	60	Non	594
	c.4183+1C>A	TGCTCATCCTCCTGTTCCTC	TGACGACCTGCGGAAGAT	60	Non	200
<i>NCOR2</i>	c.5843G>A	GGCTCCATGAGGGTAGGGTA	CTTGACAAAACCAACCACCA	60	Non	444
	c.5843+2G>C	GGCTCCATGAGGGTAGGGTA	CTTGACAAAACCAACCACCA	60	Non	444
<i>ITGAE</i>	Mutation intronique	CAGCTCTTCATTGTGCTGGA	TCACCGGTAAACAGGTCCTC	60	Non	350
<i>GLCE</i>	c.377T>C	TCTGAATATGCGTTGCTTGG	ACTTCGTCCCCTCTCGTCT	58	Non	384
	c.382A>C	TCTGAATATGCGTTGCTTGG	ACTTCGTCCCCTCTCGTCT	58	Non	384

Tableau V : Amorces 5' et 3' et conditions de PCR pour les ADNc des 5 gènes candidats. 18 amorces 5' et 3' ont été composées pour les 15 régions d'intérêt de l'ADNc.

2.8 Calcul du pourcentage de validation des mutations

Suite à chaque validation d'une mutation, un tableau de comparaison a été généré dans le but de calculer le pourcentage de précision que chaque algorithme a pour détecter chacune des mutations. Ce pourcentage a été calculé en comptant le nombre de mutations validées par rapport au nombre total de mutations prédites par l'algorithme : (nombre de mutations validées/nombre total de mutations prédites) x 100. Ce pourcentage a été calculé pour l'algorithme A et pour l'algorithme B indépendamment dans le but de comparer l'efficacité de chacun pour la détection des mutations.

2.9 Analyses bioinformatiques

A- L'analyse des données brutes

Les séquences alignées sont sauvegardées en format BAM (.bam) qui est une version binaire compressée du format SAM (Sequence Alignment/Map). Le format SAM est un format générique pour stocker les grands alignements de séquences nucléotidiques. Nous avons tout d'abord examiné la fréquence de mutations des gènes candidats dans l'ADNg du sang afin de déterminer si ces mutations sont germinales ou somatiques. La comparaison s'est limitée aux sangs des patientes 2295 et 3133 car le sang de la patiente 1369 n'est pas disponible dans la bio-banque. Ensuite, nous avons évalué la fréquence des bases rapportées mutées dans le séquençage de l'ADNc des lignées cellulaires par TSNG pour la comparer aux résultats de séquençage par la technique de Sanger.

B- Catalogue des mutations somatiques dans le cancer « COSMIC »

COSMIC est une base de données des mutations somatiques dans le cancer (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). Cette base récapitule toutes les données de mutations rapportées par la littérature et les travaux de séquençage de l'Institut Sanger. Pour chaque mutation validée, nous avons examiné le nombre d'échantillons tumoraux présentant la même mutation.

C- Étude effectuée par le réseau de recherche « cancer genome Atlas »

Dans leur étude pilote, «*Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*», le réseau de recherche TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) a cartographié les altérations moléculaires présentes dans 316 tumeurs ovariennes séreuses de haut grade [138]. Nous avons recherché nos gènes mutés dans cette étude et nous avons comparé les positions de mutations pour les gènes en commun (matériel supplémentaire de [138]).

D- Niveau d'expression des gènes candidats

Les données de la micropuce MAS5 U133 Plus 2 d'Affymetrix ont été utilisées pour évaluer l'effet de la mutation sur l'expression des gènes candidats. Ceci a été fait en comparant les niveaux d'expression de chaque gène dans les lignées cellulaires mutées *versus* ceux du même gène dans les lignées cellulaires qui ne présentent pas la mutation.

E- Prédiction de l'effet de la mutation sur la structure protéique

La séquence protéique de chaque gène a été obtenue de la base de données Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). La mutation a été localisée dans la séquence protéique en alignant la séquence d'acides aminés autour de la mutation fournie par la base de données UCSC Genome Browser, à celle obtenue par Uniprot. Les domaines et les régions des protéines dont la mutation a été validée ont été cartographiés à l'aide de la base de données Uniprot. La cristallographie de certains domaines protéiques est disponible dans la base de données ExpASY (the Expert Protein Analysis System, Swiss Institute of Bioinformatics, <http://br.expasy.org>). Les structures secondaires et tertiaires des séquences protéiques normales et mutées ont été prédites par le service Phyre (Protein Homology/AnalogY Recognition Engine, Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) et visualisées par le logiciel PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC, <http://www.pymol.org/>).

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Qualité de l'ARN des tumeurs solides et des lignées cellulaires

Suite à l'extraction des ARNs des tumeurs solides et des lignées cellulaires dérivées, la qualité de l'ARN a été déterminée selon le RIN (RNA Integrity Number). Les ARN ayant un RIN supérieur ou égal à 9.7, sont jugés de très bonne qualité. Les ARN extraits à partir des tumeurs solides ont un RIN moins élevé (≥ 8.1) mais restent de bonne qualité (tableau VI).

Tumeurs	RIN	Lignées cellulaires	RIN
TOV1369TR	8.1	TOV1369TR	10
TOV3133D	8.5	OV1369-2	10
TOV3133G	9.4	OV2295	9.9
TOV2295	8.3	OV2295-2	10
		TOV2295	9.9
		TOV3133G	10
		TOV3133D	10
		OV3133	10
		OV3133-2	9.7

Tableau VI : RIN des tumeurs solides d'origine et des lignées cellulaires dérivées (tiré de [135])

3.2 Qualité de l'ADNc synthétisé

Suite à sa synthèse par transcription reverse à partir de l'ARN, la qualité de l'ADNc de chaque lignée cellulaire a été testée par amplification du gène *ERK*. La détection d'une bande à 200 pb sur gel d'agarose indique que la réaction de synthèse de l'ADNc a réussi (figure 8).

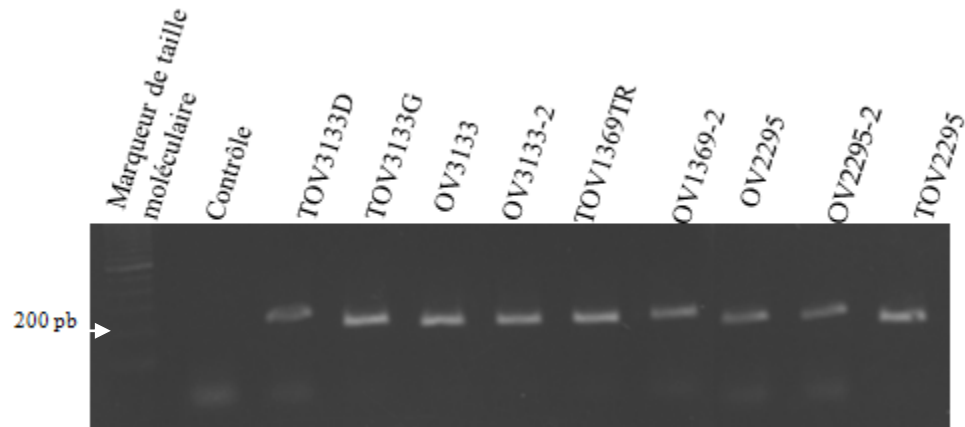


Figure 8 : Produits d’amplification du gène *ERK* dans les neuf lignées cellulaires. La bande de 200 pb correspond au produit d’amplification de l’ADNc du gène *ERK*. Dans le puits contrôle la réaction de PCR a été conduite en absence d’ADNc, ceci dans le but de contrôler l’absence d’ADN contaminant. Les faibles bandes qui apparaissent dans la partie inférieure du gel correspondent à la dimérisation des amorces 5’ et 3’ de *ERK*.

3.3 Résultats du séquençage par TSNG

Le séquençage de l’ADN génomique des neuf lignées cellulaires et de cellules sanguines des patientes 2295 et 3133 ainsi que le séquençage de tous les ADN complémentaires synthétisés à partir des ARNs de bonne qualité, ont été effectué par le système *Genome Analyser* d’*Illumina* au BCCA (*British Columbia Cancer Agency’s Genome Sciences Centre*). L’analyse du séquençage a montré la présence de plusieurs mutations dans l’ADNg des lignées et du sang et dans l’ADNc des lignées cellulaires des trois patientes.

Ces mutations ont été analysées par deux algorithmes probabilistes qui se distinguent par leurs paramètres statistiques. Selon l’algorithme A, l’analyse des résultats de séquençage des lignées 1369 et 3133 a montré la présence de 2213 substitutions et 639 insertions/délétions (indel) dans 1957 et 607 gènes, respectivement (tableau VII). Pour les mêmes lignées, l’analyse du séquençage effectuée par l’algorithme B a montré la présence de 3693 substitutions dans 3126 gènes et 69 indels dans 69 gènes (tableau VII). En incluant les résultats de séquençage des lignées de la patiente 2295, le nombre de mutations détectées par l’algorithme B a été de 4337 substitutions dans 3676 gènes et de 81 indels dans 81 gènes. Pour les deux algorithmes, le nombre de mutations détectées est plus grand que le nombre de gènes mutés, ce qui suggère que certains gènes pourraient être mutés plus d’une fois (tableaux VII et VIII).

Algorithme A

Lignées cellulaires	Substitutions		Indels	
	Nombre de mutations	Nombre de gènes	Nombre d'indels	Nombre de gènes
TOV1369TR	425	333	98	91
OV1369-2	393	352	145	140
TOV3133G	341	303	108	101
TOV3133D	371	346	89	84
OV3133	357	330	108	104
OV3133(2)	326	293	91	87
Total	2213	1957	639	607

Tableau VII : Nombre de mutations de type substitutions et insertions/délétions (indels) détectées par l'algorithme A dans l'ADNc des lignées des patientes 1369 et 3133

Algorithme B

Lignées cellulaires	Substitutions		Indels	
	Nombre de mutations	Nombre de gènes	Nombre d'indels	Nombre de gènes
TOV1369TR	593	494	9	9
OV1369-2	639	518	6	6
OV2295	261	214	6	6
OV2295-2	45	38	0	0
TOV2295	338	298	6	6
TOV3133G	596	515	13	13
TOV3133D	686	586	14	14
OV3133	591	499	14	14
OV3133(2)	588	514	13	13
Sans le RNAseq des lignées de la patiente 2295	3693	3126	69	69
Avec le RNAseq des lignées de la patiente 2295	4337	3676	81	81

Tableau VIII : Nombre de mutations de type substitutions et insertions/délétions (indels) détectées par l'algorithme B dans l'ADNc des lignées des patientes 1369, 2295 et 3133

Shah *et al.* ont montré que les tumeurs récurrentes présentent un plus grand nombre de mutations que les tumeurs primaires [130]. Ceci pourrait être le résultat d'une instabilité génétique innée des tumeurs ou la conséquence du traitement. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé le nombre de mutations (substitutions et insertions/délétions) dans les lignées établies après la récurrence à celui des lignées établies à partir de la tumeur primaire. Nous remarquons que, pour la patiente 1369, les analyses des résultats de séquençage réalisées par les algorithmes A et B montrent un plus grand nombre de mutations (substitutions et insertions/délétions) dans les lignées établies de la tumeur récurrente que celles établies de la tumeur primaire. Selon l'algorithme A, 523 mutations ont été détectées dans l'ADNc de la lignée TOV1369TR contre 538 mutations dans l'ADNc de la lignée OV1369-2 (tableau IX, tableau X). D'après les analyses de séquençage effectuées par l'algorithme B, 602 mutations ont été détectées dans l'ADNc de la lignée TOV1369TR contre 645 mutations détectées dans l'ADNc de la lignée OV1369-2 (tableau XI, tableau XII). De même, les lignées de la patiente 2295 montrent un plus grand nombre de mutations dans la tumeur récurrente. Selon l'algorithme B, 344 mutations ont été détectées dans la lignée TOV2295 contre 267 mutations dans la lignée OV2295 (tableau XI, tableau XII). Des problèmes techniques ont surgit lors du séquençage de la lignée OV2295-2, ce qui explique le très faible nombre de mutations détectées. Cependant, les lignées de la patiente 3133 montrent un plus grand nombre de mutations dans la tumeur primaire et ceci selon les deux algorithmes d'analyse A et B. Les analyses de séquençage effectuées par l'algorithme A montre la présence de 909 mutations dans l'ADNc des lignées TOV3133G et TOV3133D contre 882 mutations détectées dans l'ADNc des lignées OV3133 et OV3133-2 (tableau IX, tableau X). De même, l'algorithme B a permis la détection de 1309 mutations dans l'ADNc des lignées TOV3133G et TOV3133D contre 1206 mutations dans l'ADNc des lignées OV3133 et OV3133-2 (tableau XI, tableau XII).

Lignées cellulaires	Nombre de substitutions	Nombre d'indels	Nombre total de mutations	Nombre de mutations par patiente
TOV1369TR	425	98	523	523
TOV3133G	341	108	449	909
TOV3133D	371	89	460	
Nombre de mutations dans les lignées établies de la tumeur primaire	1137	295	1432	

Tableau IX : Nombre de mutations détectées par l'algorithme A dans les lignées établies de la tumeur primaire des patientes 1369 et 3133

Lignées cellulaires	Nombre de substitutions	Nombre d'indels	Nombre total de mutations	Nombre de mutations par patiente
OV1369-2	639	6	645	645
OV2295-2	45	0	45	389
TOV2295	338	6	344	
OV3133	591	14	605	1206
OV3133(2)	588	13	601	
Nombre de mutations dans les lignées établies de la tumeur récurrente	2201	39	2240	

Tableau X : Nombre de mutations détectées par l'algorithme A dans les lignées établies de la tumeur récurrente des patientes 1369 et 3133

Lignées cellulaires	Nombre de substitutions	Nombre d'indels	Nombre total de mutations	Nombre de mutations par patiente
TOV1369TR	593	9	602	602
OV2295	261	6	267	267
TOV3133G	596	13	609	1309
TOV3133D	686	14	700	
Nombre de mutations dans les lignées établies de la tumeur primaire	2136	42	2178	

Tableau XI : Nombre de mutations détectées par l'algorithme B dans les lignées établies de la tumeur primaire des patientes 1369, 2295 et 3133

Lignées cellulaires	Nombre de substitutions	Nombre d'indels	Nombre total de mutations	Nombre de mutations par patiente
OV1369-2	393	145	538	882
OV3133	357	108	465	
OV3133(2)	326	91	417	
Nombre de mutations dans les lignées établies de la tumeur récurrente	1076	344	1420	

Tableau XII : Nombre de mutations détectées par l'algorithme B dans les lignées établies de la tumeur récurrente des patientes 1369, 2295 et 3133

3.4 Choix des gènes candidats

L'analyse des résultats de séquençage nous a permis de générer la liste complète des gènes mutés dans nos lignées cellulaires. 2038 gènes différents ont été mutés au moins une fois dans une des neuf lignées. En triant les gènes mutés qui sont en commun entre la liste des gènes mutés d'une lignée cellulaire donnée et ceux de la liste complète décrits dans la section 2.6, nous avons produit deux groupes d'analyse en fonction de l'algorithme considéré.

3.4.1 Gènes mutés dans plusieurs lignées cellulaires

L'addition des scores attribués à chaque gène nous a permis d'identifier 26 gènes mutés dans toutes les lignées cellulaires, c'est-à-dire dont le score est égal à 9. Bien que ces gènes soient mutés dans toutes les lignées cellulaires, mais ils ne présentent pas des fonctions biologiques, structurales ou physiologiques importantes. Le tableau suivant montre le nombre de gènes mutés en commun entre les différentes lignées cellulaires (Tableau XIII).

score	nombre de gènes
9	26
8	123
7	114
6	167
5	59
4	10
3	12
2	6
1	64

Tableau XIII : Nombre de gènes correspondant à chaque valeur du score. Cette analyse a été effectuée pour les gènes dont la mutation a été rapportée par l’algorithme B.

À partir des analyses effectuées par l’algorithme A, nous avons sélectionné Plectine (*PLEC1*) et Scribble (*SCRIB*) comme gènes mutés dans les lignées cellulaires des patientes 1369 et 3133 (score = 6). De la deuxième série d’analyse issue de l’algorithme B, nous avons choisi le corépresseur 2 du récepteur nucléaire (*NCOR2*) (score = 9). *PLEC1* et *SCRIB* sont présents dans la deuxième analyse (algorithme B) mais avec quelques changements concernant les positions de mutations et les lignées cellulaires mutées (score de *PLEC1* = 6, score de *SCRIB* = 2). Ces variations sont détaillées dans les sections suivantes.

3.4.2 Gènes mutés dans les lignées établies après la récurrence de la maladie

Pour sélectionner les gènes qui présentent des mutations dans les lignées établies uniquement après la récurrence, nous avons suivi la stratégie décrite en 2.6. À partir de la liste issue de l’analyse par l’algorithme A, nous avons choisi la serine-kinase *IKBKB* (score P=0; score R=2). L’algorithme B nous a permis de sélectionner l’intégrine *ITGAE* (score P=0; score R=2), la sémaphorine *SEMA6C* (score P=0; score R=2) et l’épimérase *GLCE* (score P=0; score R=2). Le choix de ces gènes et leur relation fonctionnelle avec le cancer en général et le cancer de l’ovaire en particulier, ainsi que leur profil de mutation, sont détaillés dans les sections suivantes.

3.5 Validation des mutations dans l'ADNg et l'ADNc

Pour chaque mutation, des amorces 5' et 3' ont été dessinées afin d'amplifier par PCR environ 200 pb en amont et en aval de la mutation; ceci à partir de l'ADNc et l'ADNg (tableaux IV et V). Après avoir contrôlé la taille et la qualité des amplicons, ces derniers ont été séquencés par la méthode classique de Sanger. Les séquences ont été comparées au génome humain de référence (NCBI36/hg18). Dans la majorité des cas, les résultats de séquençage de l'ADNc ont été identiques à ceux de l'ADNg. Chacun des gènes candidats a été amplifié et séquencé dans les neuf lignées cellulaires. Quelques mutations non rapportées par TSNG ont ainsi été identifiées dans plusieurs lignées. Les résultats de validation des mutations sont exposés en détails dans la section suivante.

3.6 Analyse des résultats de séquençage Sanger

3.6.1 *PLEC1*

La plectine (*PLEC1*) est une protéine de 531 kDa présente dans la majorité des cellules humaines. Elle lie, aux jonctions de la membrane cytoplasmique, les 3 composants du cytosquelette : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. *PLEC1* joue donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Bausch *et al.* ont montré que la plectine peut être utilisée en tant que biomarqueur spécifique et sensible dans la détection des néoplasmes mucineux papillaires du pancréas et qu'elle est surexprimée dans les tumeurs pancréatiques de stade avancé [139, 140]. Puiffe *et al.* ont montré que l'exposition de la lignée du cancer de l'ovaire OV-90 à des ascites ovariennes entraîne la surexpression de plusieurs gènes, y compris *PLEC1*. De plus, cette étude a confirmé la corrélation entre la surexpression de *PLEC1* et le potentiel invasif des cellules cancéreuses ovariennes [141]. Des travaux de recherche ont montré que l'inhibition de l'expression de *PLEC1* par des siARNs entraîne un changement de la prolifération des lignées cellulaires ovariennes immortalisées [142].

La technologie de séquençage de nouvelle génération a rapporté la mutation de *PLEC1* dans nos lignées cellulaires. Le séquençage de l'ADNc (RNA seq) de *PLEC1* analysé par l'algorithme A, montre une substitution de G en A (G>A) à la position génomique 145062985 (position de mutation dans l'ADNc : c.13573C>T, NM_201380) dans les lignées TOV3133G, TOV3133D, OV3133, OV3133-2 et une substitution de C en T (C>T) à la position génomique 145070608 (c.6058G>A, NM_201380) dans les lignées TOV1369TR et OV1369-2. L'analyse faite par l'algorithme B montre deux mutations additionnelles de *PLEC1*, soit une mutation A>G à la position 145096618

(c.415T>C, NM_201380) dans la lignée OV3133-2 et une mutation T>G (c.119A>C, NM_000445) à la position 145121456 dans les lignées TOV1369TR et OV3133 (tableau XIV).

Gène	Algorithme A			Algorithme B		
	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Type de substitution	Position de mutation	Lignées cellulaires	Type de substitution
<i>PLECI</i>	145062985	TOV3133G	G>A	145062985	TOV3133G	G>A
		TOV3133D			TOV3133D	
		OV3133-2			OV3133-2	
		OV3133			OV3133	
	145070608	TOV1369TR	C>T	145070608	TOV1369TR	C>T
		OV1369-2			OV1369-2	
	∅			145096618	OV3133-2	A>G
	∅			145121456	OV3133	T>G
			TOV1369TR			

Tableau XIV : Tableau comparatif des mutations détectées dans *PLECI* par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire. ∅ : pas de mutation, G>A : remplacement d’une guanine par une adénine, C>T : remplacement d’une cytosine par une thymidine, A>G : remplacement d’une adénine par une guanine, T>G : remplacement d’une thymidine par une guanine.

Le séquençage de l’ADNg a démontré la présence de mutations hétérozygotes, c'est-à-dire la présence d’allèle sauvage G (courbe noire) et muté A (courbe verte). Cette hétérozygotie s’observe dans les lignées TOV3133D, TOV3133G, OV3133, OV3133-2 (figure 9A) avec une dominance de l’allèle sauvage (G).

D’après les résultats du séquençage de l’ADNc de *PLECI*, dans la lignée TOV3133D, l’allèle sauvage G et l’allèle muté A sont présents en proportion égale. Dans les lignées TOV3133G, OV3133 et OV3133-2 l’allèle muté A est majoritaire (figure 9B).

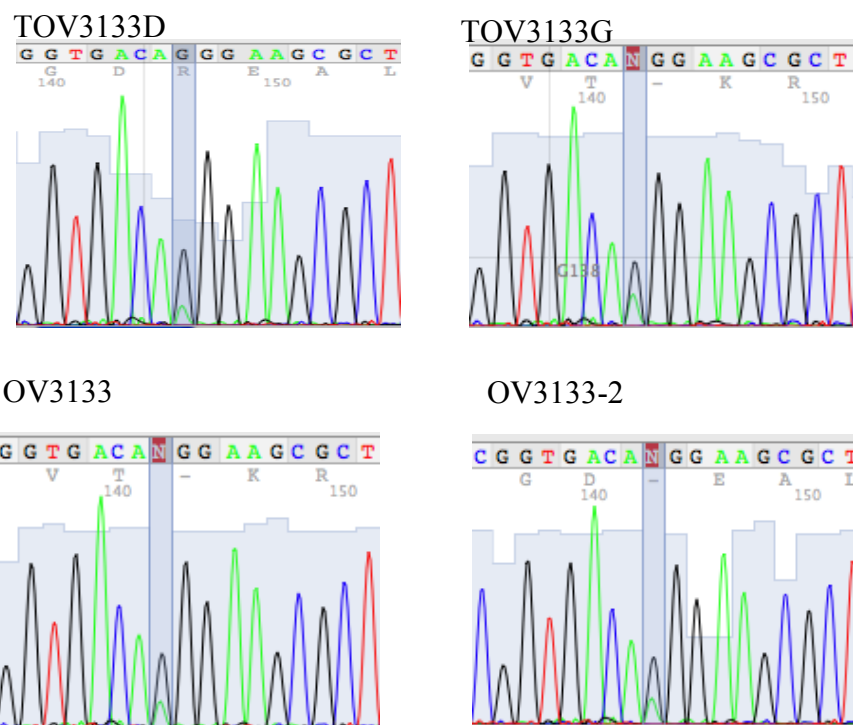
L’ensemble de ces données permet de confirmer la présence de la mutation 145062985, rapportée par les algorithmes A et B, dans les lignées de la patiente 3133.

La mutation C>T de *PLECI* à la position 145070608, rapportée par les algorithmes A et B, a été validée dans l’ADNg et l’ADNc des lignées TOV1369TR et OV1369-2 (figures 9C et 9D).

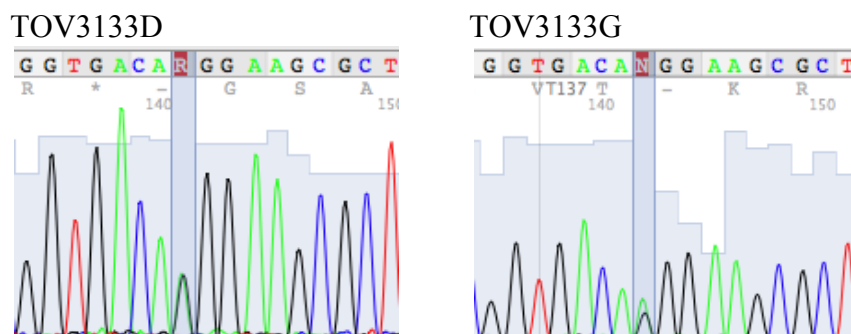
La mutation A>G (145096618) détectée seulement par l’algorithme B, n’a été validée ni dans l’ADNg ni dans l’ADNc de la lignée OV3133-2 (figure 9E). Le chromatogramme 9E montre la présence de l’allèle sauvage A (courbe verte).

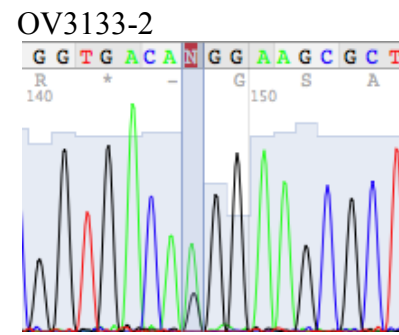
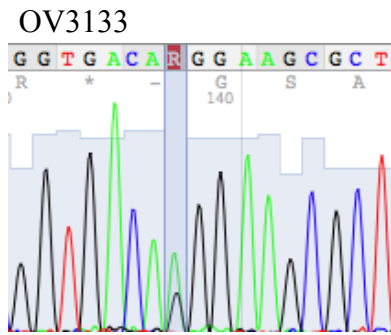
Le chromatogramme de *PLEC1* à la position 145121456 révèle la présence de l’allèle sauvage T (courbe rouge) (figures 9F et 9G). Ceci signifie qu’il n’y a pas une mutation T>G à la position 145121456 de *PLEC1*.

A) ADNg

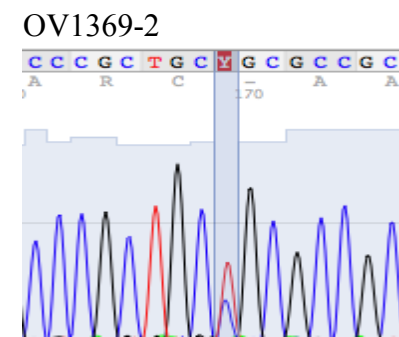
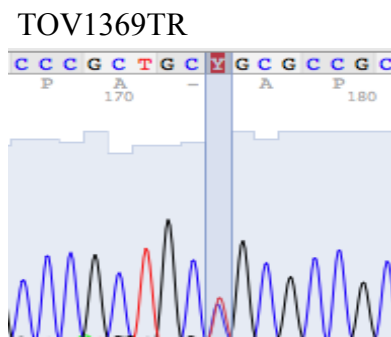


B) ADNc

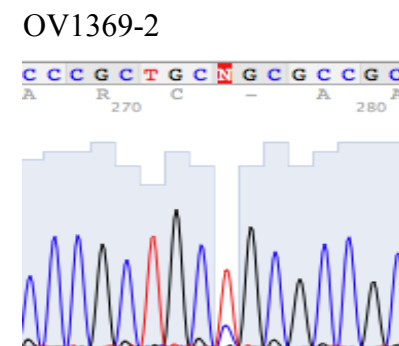
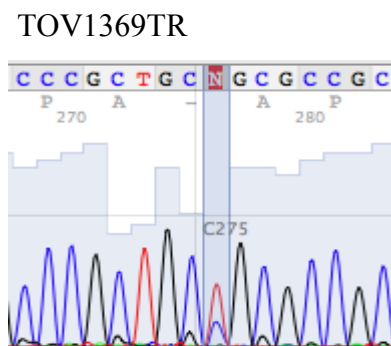




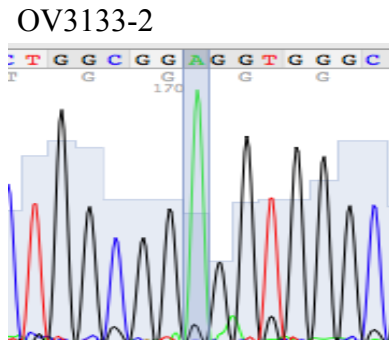
C) ADNg



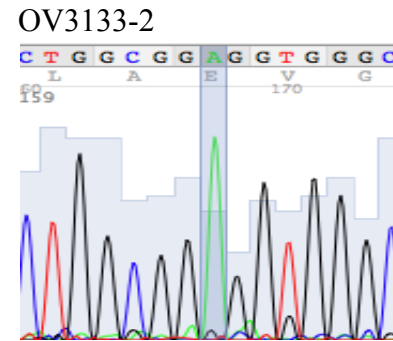
D) ADNc



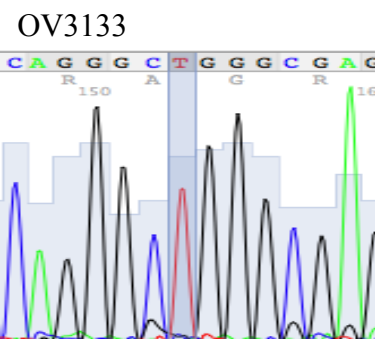
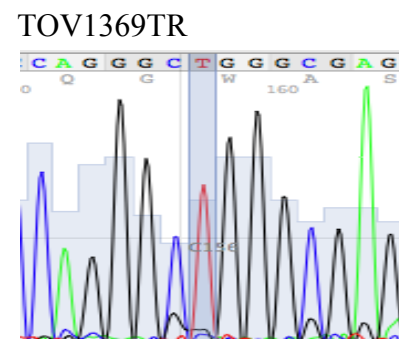
E) ADNg



ADNc



F) ADNg



G) ADNc

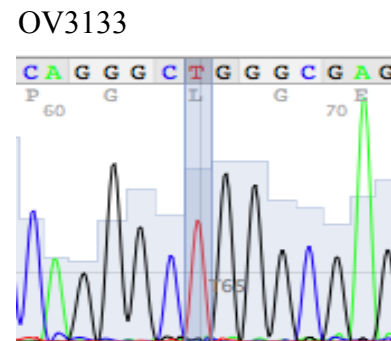
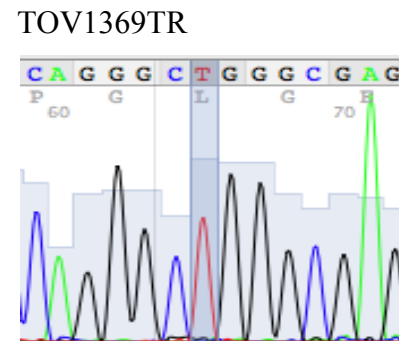


Figure 9 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *PLECI*. A) Séquençage de l'ADNg des lignées TOV3133D, TOV3133G, OV3133, OV3133-2 montrant la présence d'une hétérozygotie GA de *PLECI* à la position 145062985. B) Séquençage de l'ADNc des lignées TOV3133D, TOV3133G, OV3133, OV3133-2 montrant la présence d'une hétérozygotie GA de *PLECI* à la position 145062985 (c.13573C>T). C) Séquençage de l'ADNg des lignées TOV1369TR, OV1369-2 montrant la présence d'une hétérozygotie CT de *PLECI* à la position 145070608. D) Séquençage de l'ADNc des lignées TOV1369TR, OV1369-2 montrant la présence d'une hétérozygotie CT de *PLECI* à la position 145070608 (c.6058G>A). E) Séquençage de l'ADNg (à gauche) et de l'ADNc (à droite) de la lignée OV3133-2 montrant l'absence de la mutation A>G de *PLECI* à la position

145096618 (c.415T>C). F) Séquençage de l'ADNg des lignées TOV1369TR et OV3133 montrant l'absence de la mutation T>G de *PLECI* à la position 145121456. G) Séquençage de l'ADNc des lignées OV3133 et TOV1369TR montrant l'absence de la mutation T>G de *PLECI* à la position 145121456 (c.119A>C).

R : le code R signifie que la base à cette position pourrait être une adénine (A) ou une guanine (G). N : le code N signifie que la base à cette position pourrait être une adénine (A), une guanine (G), une thymidine (T) ou une cytosine (C). Y : le code Y signifie que la base à cette position pourrait être une thymidine (T) ou une cytosine (C).

Le pourcentage de précision de chaque algorithme à détecter chacune des mutations a été calculé selon la formule suivante : (nombre de mutations validées/nombre total de mutations prédites) x 100 (voir section 2.8).

Les deux positions de mutations de *PLECI* détectées par l'algorithme A (tableau XVA, case bleue) ont été validées par séquençage Sanger (tableau XVA, case verte) dans les lignées 1369 (C>T) et 3133 (G>A). Par conséquent, le pourcentage de précision de l'algorithme A est de 100%. À noter qu'au moment de la validation des mutations rapportées par l'algorithme A, les données de séquençage de l'ADNc des lignées 2295 n'étaient pas disponibles. Ainsi, le nombre de cas total est de 12 pour les deux positions de mutations.

Pour l'algorithme B, aucune des deux positions de mutation de *PLECI* spécifiques à cet algorithme (A>G et T>G) n'a été validée par séquençage Sanger (tableau XVB, case rouge). Le pourcentage de précision de l'algorithme B est de 91.7% (tableau XVB).

La validation des mutations par le séquençage Sanger n'a pas changé le score de *PLECI* qui est toujours de 6.

PLEC1

A) Algorithme A

Gène	Technique	TOV1369TR		OV1369-2		OV2295		OV2295-2		TOV2295		TOV3133D		TOV3133G		OV3133		OV3133-2		Précision de détection des mutations (%)
		G>A	C>T	G>A	C>T	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	
<i>PLEC1</i>	RNAseq	Case grise	Case bleue	Case grise	Case bleue	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case bleue	Case grise	Case bleue	Case grise	Case grise	Case bleue	Case grise	12/12= 100
	PCR	-	+	-	+	X	X	X	X	X	X	X	+	-	+	-	+	-	+	

B) Algorithme B

Gène	Technique	TOV1369TR				OV1369-2				OV2295				OV2295-2				TOV2295				TOV3133D				TOV3133G				OV3133				OV3133-2				Précision de détection des mutations (%)
		G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G	G>A	C>T	A>G	T>G					
<i>PLEC1</i>	RNAseq	Case grise	Case bleue	Case grise	Case grise	Case grise	Case bleue	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	33/36=91.7
	PCR	-	+	-	Case rouge	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Case rouge	+	-	Case rouge	

Tableau XV : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de *PLEC1* issues de l’analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Validation des mutations détectées par l’algorithme A. B) Validation des mutations détectées par l’algorithme B. N.A : non applicable : données de séquençage non-disponibles au moment de l’analyse. Case grise : mutation non rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, case bleue : mutation rapportée, + : mutation confirmée par séquençage Sanger, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger, X : pas de validation par séquençage Sanger.

3.6.2 *SCRIB*

SCRIB est une protéine d'échafaudage impliquée dans la polarisation apico-basale des cellules épithéliales. La déplétion de *SCRIB* dans les cellules épithéliales mammaires perturbe la polarité cellulaire, bloque la morphogénèse tridimensionnelle de la cellule, inhibe l'apoptose et induit une dysplasie qui peut progresser vers une tumeur [143]. Malgré son rôle supposé comme suppresseur de tumeur, plusieurs études ont rapporté l'implication de *SCRIB* dans des mécanismes oncogéniques. L'étude d'Anastas *et al.* montre que la surexpression de *SCRIB* corrèle avec un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer du sein et que l'inhibition de son expression par des shARNs réduit la croissance et la migration des cellules cancéreuses mammaires [144]. De plus, Vaira *et al.* ont montré que *SCRIB* est surexprimée dans la majorité des lignées cellulaires cancéreuses incluant celles du colon, de l'ovaire, de la prostate, de l'utérus et des poumons où elle est localisée au cytosol au lieu de la membrane cytoplasmique. En outre, des siARNs dirigés contre *SCRIB* inhibent la migration cellulaire, suppriment l'invasion et diminuent l'expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales de poumon [145]. La fonction de *SCRIB* dans les cellules cancéreuses ovariennes humaines est très peu connue. Quelques études ont été faites chez la drosophile pour mieux comprendre le rôle de *SCRIB* dans les cellules ovariennes [146-148]. Ces trois études soulignent l'implication de *SCRIB* dans la polarisation, l'inhibition de la migration et la suppression de la prolifération cellulaires.

L'analyse du séquençage faite par l'algorithme A montre la mutation de C>T et de G>T à la position 144964972 (c.1283G>A, NM_182706) dans la lignée TOV1369TR et à la position 144946796 (c.4183+1C>A, NM_182706) dans les lignées TOV1369TR, OV1369-2, TOV3133G, TOV3133D, OV3133, OV3133-2, respectivement. L'analyse faite par l'algorithme B prédit seulement la mutation de C>T à la position 144964972 (c.1283G>A) mais cette fois dans les deux lignées de la patientes 1369 (TOV1369TR et OV1369-2) (tableau XVI).

		Algorithme A		Algorithme B			
Gène	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Type de substitution	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Type de substitution	
<i>SCRIB</i>	144964972	TOV1369TR	C>T	144964972	TOV1369TR	C>T	
		Ø			OV1369-2	C>T	
	144946796	TOV3133G	G>T	Ø	Ø		
		TOV3133D					
		OV3133					
		OV3133-2					
		TOV1369TR					
	OV1369-2						

Tableau XVI : Comparaison entre les mutations de *SCRIB* détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire. Ø : pas de mutation, C>T : remplacement d'une cytosine par une thymidine, G>T : remplacement d'une guanine par une thymidine.

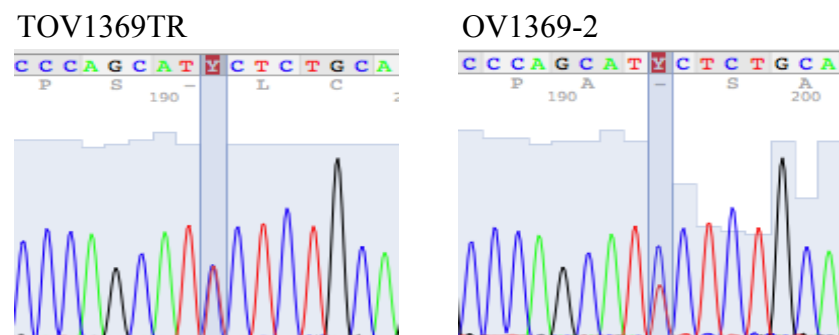
Les produits obtenus ont été séquencés selon la méthode de Sanger. L'analyse du chromatogramme de l'ADNg de *SCRIB* à la position 144964972 montre que la lignée TOV1369TR présente une hétérozygotie caractérisée par la présence des deux allèles, sauvage (bleue, C) et muté (rouge, T) (figure 10A). Le même profil a été observé dans l'ADNc de la même lignée où les deux allèles sont présents à des niveaux égaux (figure 10B).

Cependant, la lignée OV1369-2 dont la mutation est rapportée par l'algorithme B et non par A, présente une hétérozygotie avec dominance de l'allèle sauvage C sur l'allèle muté T. Ceci a été observé par le séquençage de l'ADNg et de l'ADNc (figures 10A et 10B).

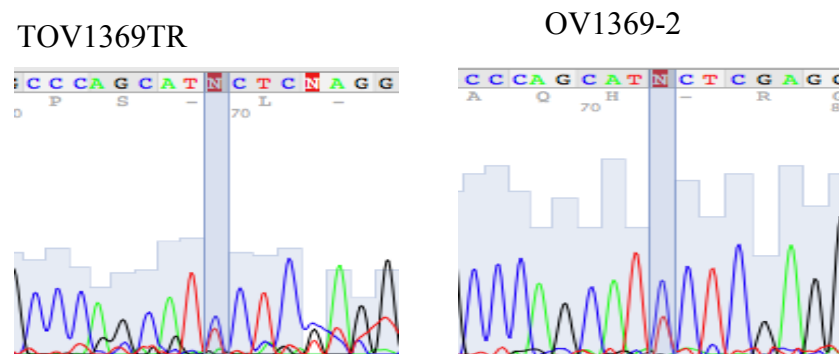
La mutation G>T de *SCRIB* à la position 144946796 identifiée par l'algorithme A et non par B n'a pas été validée dans l'ADNg de nos lignées cellulaires (figure 11). Les chromatogrammes de l'ADNg montrent tous une homozygotie de l'allèle sauvage G (une seule courbe noire). La base T présente dans les chromatogrammes de l'ADNc (courbe rouge, figure 10 D) ne correspond pas à la base mutée. En effet, la base G se situe au début d'un intron et la base T identifiée par le chromatogramme de l'ADNc correspond à la base qui se situe au début de l'exon en aval (Exon 8) (figures 11, 10 C et 10 D). La prédiction de cette mutation (G>T) est une erreur de l'algorithme d'alignement qui n'a pas pu prédire qu'il s'agit d'une région d'épissage (jonction intron/exon) et qui a confondu entre la similarité du début de la séquence intronique (CTGCC) et du début de la séquence exonique (CTICC).

Les chromatogrammes de l'ADNg et de l'ADNc montrent clairement qu'il s'agit d'une région d'épissage (figures 10C et 10D) car les régions situées en aval de la séquence CTGG sont différentes. Pour l'ADNg, cette région correspond à l'intron 7 et pour l'ADNc elle correspond à l'exon 8.

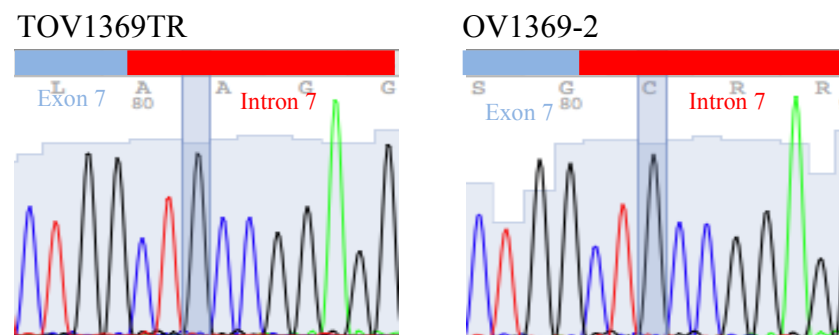
A) ADNg



B) ADNc



C) ADNg



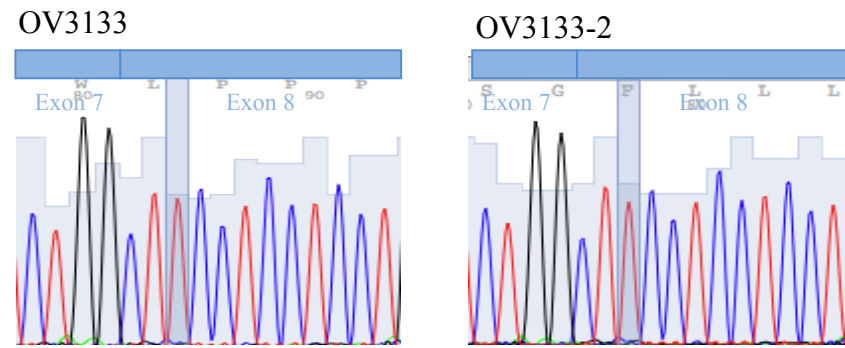


Figure 10 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *SCRIB*. A) Séquençage de l'ADNg des lignées TOV1369TR et OV1369-2 montrant la présence d'une hétérozygotie CT de *SCRIB* à la position 144964972. B) Séquençage de l'ADNc des lignées TOV1369TR et OV1369-2 montrant la présence d'une hétérozygotie CT de *SCRIB* à la position 144964972. C) Séquençage de l'ADNg des lignées TOV1369TR, OV1369-2, TOV3133D, TOV3133G, OV3133 et OV3133-2 montrant l'absence de la mutation G>T de *SCRIB* à la position 144946796. D) Séquençage de l'ADNc des lignées TOV1369TR, OV1369-2, TOV3133D, TOV3133G, OV3133 et OV3133-2 montrant l'absence de la mutation G>T de *SCRIB* à la position 144946796.

N : le code N signifie que la base à cette position pourrait être une adénine (A), une guanine (G), une thymidine (T) ou une cytosine (C). Y : le code Y signifie que la base à cette position pourrait être une thymidine (T) ou une cytosine (C).

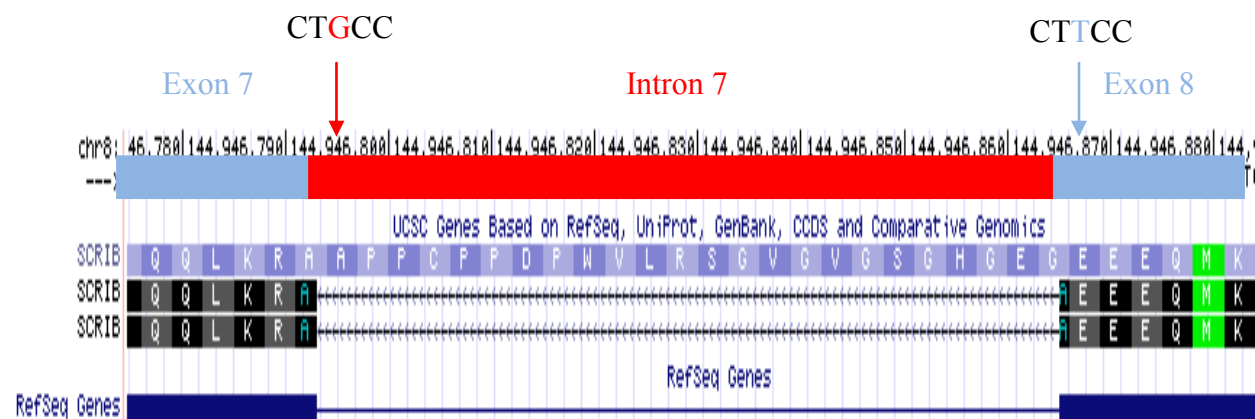


Figure 11 : Séquence d'ADNg humain de référence de *SCRIB* à la position 144946796 (Tirée d'UCSC genome browser)

Le pourcentage de précision de détection de mutations de *SCRIB* a été calculé pour chacun des deux algorithmes.

L'algorithme A a permis la détection de deux mutations, C>T dans la lignée TOV1369TR et G>T dans toutes les lignées des patientes 1369 et 3133. La validation des mutations par séquençage Sanger a permis de confirmer seulement la mutation C>T dans la lignée TOV1369TR ainsi que dans une autre lignée non rapportée par l'algorithme A, OV1369-2. Le pourcentage de consistance est de 41.7% (tableau XVIIIA).

L'algorithme B était plus précis à détecter les mutations avec un pourcentage de 100%. Il a permis la détection de la mutation C>T dans les lignées de la patiente 1369 (tableau XVIIIB).

Les résultats de validation des mutations par la méthode de Sanger ont apporté des changements sur le score de *SCRIB* qui est devenu 2 ($\text{Score}_{(\text{TSNG})} = 6; \text{score}_{(\text{validation})} = 2$).

SCRIB

A) Algorithme A

Gène	Technique	TOV1369TR		OV1369-2		OV2295		OV2295-2		TOV2295		TOV3133D		TOV3133G		OV3133		OV3133-2		Précision de détection des mutations (%)
		C>T	G>T	C>T	G>T	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	C>T	G>T	C>T	G>T	C>T	G>T	C>T	G>T	
<i>SCRIB</i>	RNAseq	C>T	G>T	C>T	G>T	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	C>T	G>T	C>T	G>T	C>T	G>T	C>T	G>T	5/12= 41.7
	PCR	+	-	+	-	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	

B) Algorithme B

Gène	Technique	TOV1369TR		OV1369-2		OV2295		OV2295-2		TOV2295		TOV3133D		TOV3133G		OV3133		OV3133-2		Précision de détection des mutations (%)
		C>T	G>T	C>T	G>T	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	C>T	G>T	C>T	G>T	C>T	G>T	C>T	G>T	
<i>SCRIB</i>	RNAseq	C>T		C>T		C>T		C>T		C>T		C>T		C>T		C>T		C>T		9/9=100
	PCR	+		+		-		-		-		-		-		-		-		

Tableau XVII : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de *SCRIB* issues de l'analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Validation des mutations détectées par l'algorithme A. B) Validation des mutations détectées par l'algorithme B. N.A : non applicable car les données de séquençage n'étaient pas disponible au moment de l'analyse. Case grise : mutation non rapportée, case bleue : mutation rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, + : mutation confirmée par séquençage Sanger, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger, X : pas de validation par séquençage Sanger.

3.6.3 *NCOR2*

NCOR2/SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors) est le corépresseur 2 du récepteur nucléaire *NURR1 (Nuclear receptor related 1 protein)* qui est une protéine impliquée dans plusieurs mécanismes neuronaux. *NCOR2* joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules souches neuronales par la répression spécifique des déméthylases d'histones [149]. De plus, *NCOR2* participe à un complexe nucléaire répresseur qui entraîne la condensation de la chromatine [150, 151]. Plusieurs groupes ont rapporté son rôle comme suppresseur de tumeur. Par exemple, sa régulation négative a été associée à la transformation des lymphomes non hodgkiniens [152]. De même, sa déplétion promeut la prolifération et l'inhibition de l'apoptose dans les cellules de myélome multiple [153]. Deux résultats contradictoires ont été obtenus en étudiant la fonction de *NCOR2* dans le cancer de sein. L'étude de Green *et al.* indique que l'expression élevée de *NCOR2* a été détectée dans 16.7% des tumeurs mammaires et que cette expression corrèle avec un mauvais pronostic pour les patientes présentant un cancer du sein [154]. *A contrario*, une étude menée par Agthoven *et al.* montre que cette expression élevée serait un indice de bon pronostic [155]. En ce qui concerne les tumeurs ovariennes, une étude a évalué la corrélation entre l'expression aberrante de *NCOR2* et la résistance à l'hormonothérapie chez les femmes atteintes de cancer de l'ovaire. Les résultats obtenus n'ont pas été concluants et aucune corrélation n'a pu être établie [156]. L'évaluation du niveau d'expression de quelques coactivateurs et corépresseurs dans les cellules épithéliales ovariennes normales et cancéreuses a montré que, pour *NCOR2*, il n'y a pas de différence significative d'expression entre les deux tissus [157].

Le gène *NCOR2* a été sélectionné à partir de la deuxième série d'analyses (algorithme B). La mutation C>T est rapportée dans les neuf lignées cellulaires à la position 123390674 (c.5843G>A, NM_006312) (tableau XVIII). Une deuxième mutation C>G de *NCOR2* est présente dans la lignée TOV3133G à la position 123390672 (c.5843+2G>C, NM_006312).

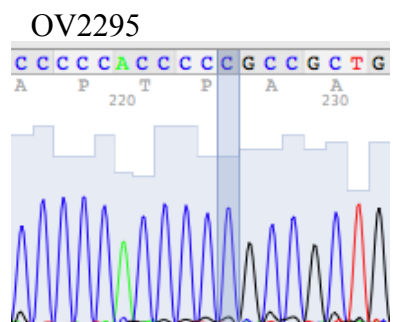
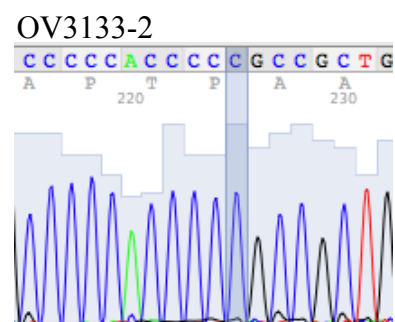
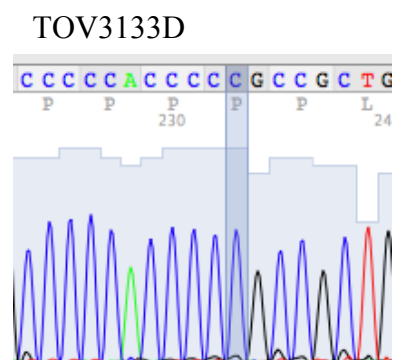
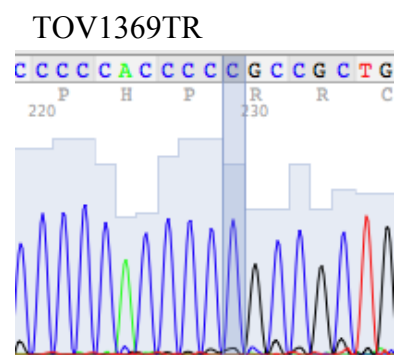
Algorithme A				Algorithme B		
Gène	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Type de substitution	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Type de substitution
<i>NCOR2</i>	∅			123390674	TOV3133G	C>T
					TOV3133D	
					OV3133	
					OV3133-2	
					TOV1369TR	
					OV1369-2	
					OV2295	
					OV2295-2	
					TOV2295	
				123390672	TOV3133G	C>G

Tableau XVIII : Comparaison entre les mutations de *NCOR2* détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l’ovaire. ∅ : pas de mutation, C>T : remplacement d’une cytosine par une thymidine, C>G : remplacement d’une cytosine par une guanine.

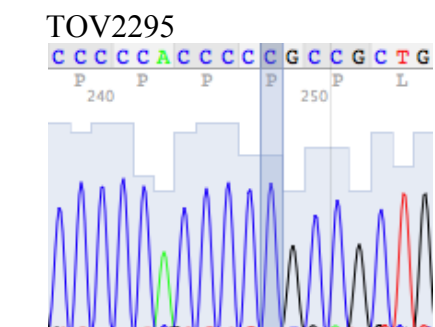
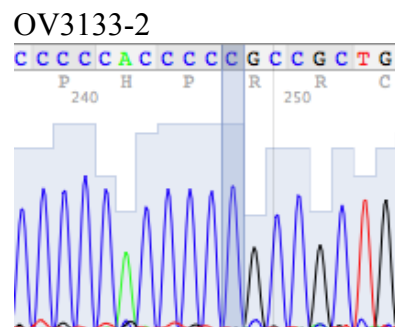
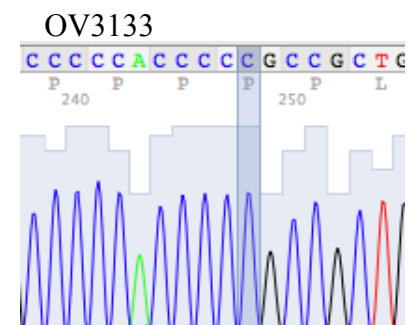
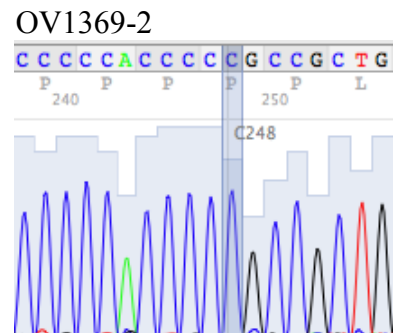
Les chromatogrammes de l’ADNg et de l’ADNc des neuf lignées cellulaires montrent la présence de la base sauvage C à la position 123390674 (c.5843G>A) et l’absence d’hétérozygotie. Ceci signifie qu’aucune copie de l’allèle muté n’est présente et donc la mutation n’existe dans aucune des lignées cellulaires (figures 12A et 12B).

De même, la mutation C>G de *NCOR2* à la position 123390672 n’est pas retrouvée dans la lignée TOV3133G ni dans les autres lignées (figure 12C) et cela est confirmé par la présence de l’allèle sauvage C à cette position.

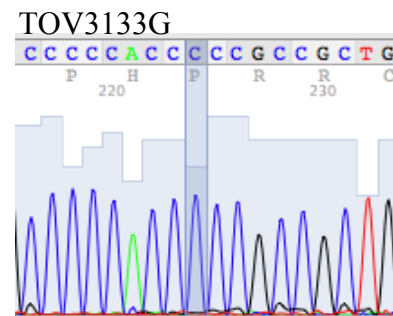
A) ADNg



B) ADNc



C) ADNg



ADNc

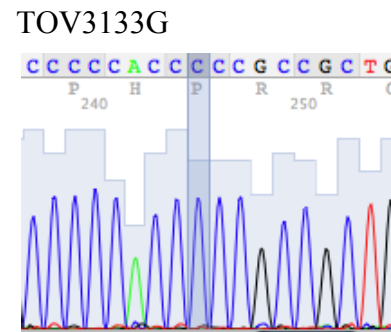


Figure 12 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *NCOR2*. A) Séquençage de l'ADNg de quatre lignées cellulaires montrant l'absence de la mutation C>T de *NCOR2* à la position 123390674. B) Séquençage de l'ADNc de quatre lignées cellulaires montrant l'absence de la mutation C>T de *NCOR2* à la position 123390674. C) Séquençage de l'ADNg (à gauche) et de l'ADNc (à droite) de la lignée TOV3133G montrant l'absence de la mutation C>G de *NCOR2* à la position 123390672.

Les mutations C>T et C>G de *NCOR2* ont été détectées par l'algorithme B seulement. Les résultats du séquençage Sanger montrent l'absence de ces deux mutations. Ainsi le pourcentage de précision de l'algorithme A est de 100% et celui de l'algorithme B, de 44.5% (tableau XIX).

Selon ces résultats, le score de *NCOR2* devient 0, sa mutation n'étant décelée dans aucune lignée cellulaire (Score_(TSNG) = 9; SCORE_(Validation) = 0).

NCOR2

A) Algorithme A

La mutation de *NCOR2* n'a pas été rapportée par l'algorithme A

Gène	Précision de détection des mutations (%)
<i>NCOR2</i>	100

B) Algorithme B

Gène	Technique	TOV1369TR		OV1369-2		OV2295		OV2295-2		TOV2295		TOV3133D		TOV3133G		OV3133		OV3133-2		Précision de détection des mutations (%)
		C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G			
<i>NCOR2</i>	RNAseq	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	C>T	C>G	8/18=44.5
	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau XIX : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de *NCOR2* issues de l'analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Validation des mutations détectées par l'algorithme A. B) Validation des mutations détectées par l'algorithme B. Case grise : mutation non rapportée, case bleue : mutation rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger.

3.6.4 *IKBKB*

IKBKB (*Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Beta*), est une serine-kinase qui joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation NF-Kappa-B (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). *IKBKB* phosphoryle l'inhibiteur de NF-Kappa-B sur deux résidus sérine entraînant ainsi sa polyubiquitination et subséquemment sa dégradation par le protéasome. NF-Kappa-B peut alors transloquer au noyau et activer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la prolifération, la migration, l'angiogenèse, la formation des métastases et la survie cellulaire. La dérégulation de l'activité de *IKBKB* par des shRNA bloque la prolifération des cellules cancéreuses de l'ovaire, l'invasion et l'adhésion [158, 159]. La déplétion de *IKBKB* inhibe le développement de mélanomes, sensibilise les cellules tumorales de poumon à l'apoptose, supprime l'activité de NF-Kappa-B dans les cellules de la prostate et diminue l'hépatocarcinogénèse chez la souris [160-163]. En outre, *IKBKB* agit comme oncogène dans les cellules ovariennes, la suppression de son expression inhibe la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes et les sensibilise à la chimiothérapie par le Paclitaxel et par le Cisplatine [164]. Ces résultats suggèrent qu'*IKBKB* est impliquée dans la progression du cancer de l'ovaire.

Selon l'algorithme A, *IKBKB* est muté à différentes positions dans deux lignées établies à partir de tumeurs récurrentes. La lignée OV3133 présente une mutation G>C de *IKBKB* à la position 42302646 (c.2174C>G, NM_001556). Alors que la lignée OV1369-2 présente une insertion de T à la position 42296133 (tableau XX). La deuxième série d'analyse (algorithme B) n'a pas identifié de mutation d'*IKBKB*.

Gène	Algorithme A			Algorithme B		
	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Mutation	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Mutation
<i>IKBKB</i>	42302646	OV3133	G>C	∅		
	42296133	OV1369-2	: T			

Tableau XX : Comparaison entre les mutations de *IKBKB* détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire. ∅ : pas de mutation, G>C : remplacement d'une guanine par une cytosine, T : insertion d'une thymidine.

Le chromatogramme de l'ADNg de la lignée OV3133 révèle la présence de l'allèle sauvage G (figure 13A). Des difficultés techniques n'ont pas permis la confirmation de ces résultats sur l'ADNc.

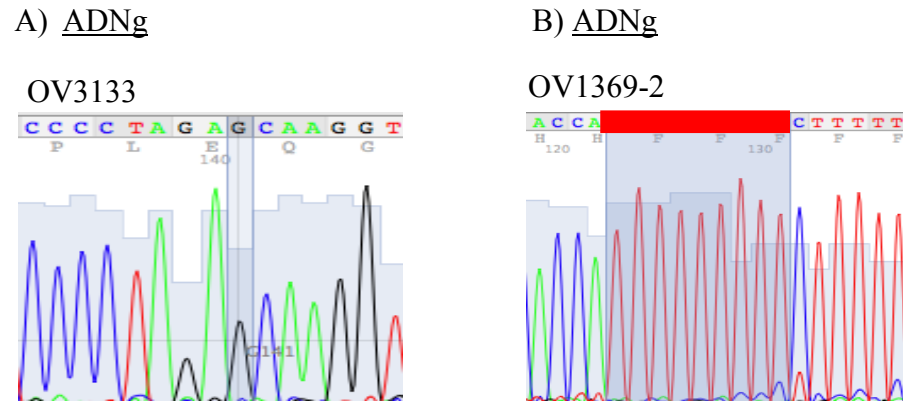


Figure 13 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg d'IKKBK. A) Séquence de l'ADNg de la lignée OV3133 montrant l'absence de la mutation G>C d'IKKBK à la position 42302646. B) Séquence de l'ADNg de la lignée OV1369-2 montrant l'absence de l'insertion de T dans IKKBK à la position 42296133.

La deuxième mutation rapportée par l'algorithme A est une insertion de T. En comparant, le nombre des bases T obtenues par séquençage Sanger à celui de la séquence de référence (NCBI36/hg18), nous remarquons qu'il n'y a pas de différence (9 bases T) (figures 13B et14). Comme précédemment, cette insertion n'a pas pu être confirmée dans l'ADNc.



Figure 14 : Séquence d'IKKBK de référence à la position 42296133 (Tirée d'UCSC genome browser).

L'algorithme A a permis la prédiction de deux mutations d'*IKBKB* qui n'ont pas été validées par séquençage Sanger. L'algorithme B n'a pas rapporté de mutation d'*IKBKB*, ce qui fait que son pourcentage de précision est de 100 %, alors que celui de l'algorithme A est de 83.4% (tableau XXI).

Ainsi, les scores d'*IKBKB* après la validation sont devenus $P = 0$ et $R = 0$.

IKBKB

A) Algorithme A

Gène	Technique	TOV1369TR		OV1369-2		OV2295		OV2295-2		TOV2295		TOV3133D		TOV3133G		OV3133		OV3133-2		Précision de détection des mutations (%)
		G>C	:T	G>C	:T	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	G>C	:T	G>C	:T	G>C	:T	G>C	:T	
<i>IKBKB</i>	RNAseq	Case grise	Case grise	Case grise	Case bleue	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case grise	Case bleue	Case grise	Case grise	10/12= 83.4
	PCR	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	

B) Algorithme B

La mutation d'*IKBKB* n'a pas été rapportée par l'algorithme B

Gène	Précision de détection des mutations (%)
<i>IKBKB</i>	100

Tableau XXI : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations d'*IKBKB* issues de l'analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Validation des mutations détectées par l'algorithme A. B) Pourcentage de précision de l'algorithme B. N.A : non applicable car les données de séquençage n'étaient pas disponible au moment de l'analyse. Case grise : mutation non rapportée, case bleue : mutation rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger, X : pas de validation par séquençage Sanger.

3.6.5 *ITGAE*

ITGAE (CD103 ou *Integrin alpha E*) est une intégrine composée de deux chaînes (alpha et beta). En combinaison avec l'intégrine beta 7, *ITGAE/beta7* forme le récepteur des E-cadhérines. Ce dernier permet l'adhésion des lymphocytes intra-épithéliaux à la monocouche des cellules de l'épithélium. De plus, ce complexe facilite l'infiltration des lymphocytes T dans l'épithélium de plusieurs tissus tels que l'intestin et les poumons ainsi que dans de nombreux tissus épithéliaux tumoraux [165]. Ainsi, le complexe *ITGAE/beta7* est essentiel à la réponse immunitaire et la lyse des cellules tumorales pancréatiques par les lymphocytes T (CD8+) [166]. En effet, l'expression des E-cadhérines est diminuée dans les tumeurs du pancréas, ce qui favorise le développement de ces tumeurs car les lymphocytes T activés ne peuvent alors adhérer et détruire les cellules du pancréas qui expriment peu de E-cadhérines [166]. Webb *et al.* ont montré qu'entre 20-70% des lymphocytes T CD8(+) contenus dans l'ascite des patientes ayant une tumeur ovarienne séreuse de haut-grade, expriment CD103 [165]. CD103(+) pourrait donc être un marqueur des lymphocytes T CD8(+) activés dans les tumeurs séreuses de haut grade [165]. L'étude du profil moléculaire des adénocarcinomes ovariens résistants au platine a permis d'identifier *ITGAE* ainsi que d'autres gènes comme étant impliqués dans cette chimiorésistance [167].

ITGAE est rapportée mutée par l'analyse des résultats de séquençage réalisée par l'algorithme B. Les deux lignées OV3133 et OV1369-2 présentent une insertion d'une adénosine à la position 3575965 (tableau XXII). L'analyse des résultats de séquençage par l'algorithme A n'a pas permis d'identifier de mutation d'*ITGAE*.

Gène	Algorithme A			Algorithme B		
	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Mutation	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Mutation
<i>ITGAE</i>	∅			3575965	OV3133 OV1369-2	: A

Tableau XXII : Comparaison entre les mutations d'*ITGAE* détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire. ∅ : pas de mutation, A : insertion d'une adénine.

L'insertion de A en 3575965 dans *ITGAE* des lignées OV1369-2 et OV3133 a été rapportée par l'analyse du séquençage effectuée par l'algorithme B et non par l'algorithme A. La comparaison du nombre de bases A

présentes dans les chromatogrammes de l'ADNg et l'ADNc d'*ITGAE* avec celui du génome humain de référence (NCBI36/hg18), montre l'absence de cette insertion (6 adénosines) (figures 15 et 16).

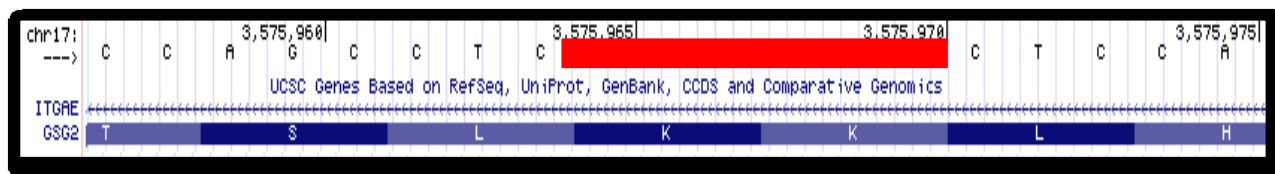
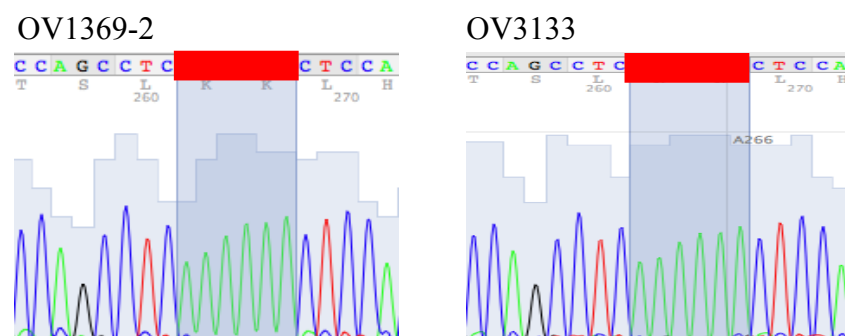


Figure 15 : Séquence d'*ITGAE* de référence à la position 3575965 (Tirée d'UCSC *genome browser*).

A) ADNg



B) ADNc

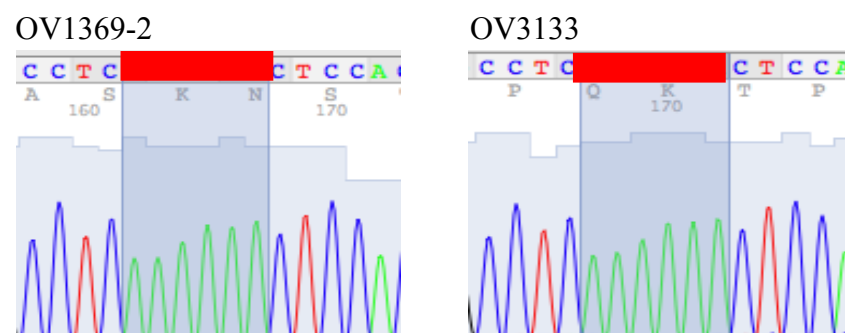


Figure 16 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc d'*ITGAE*. A) Séquences de l'ADNg des lignées OV1369-2 et OV3133 montrant l'absence de l'insertion de A dans *ITGAE* à la position 3575965. B) Séquences de l'ADNc des lignées OV1369-2 et OV3133 montrant l'absence de l'insertion de A dans *ITGAE* à la position 3575965.

L'absence de l'insertion de A dans *ITGAE* rend les score P et R nuls.

L'algorithme A n'a détecté aucune insertion dans *ITGAE*, donc il était 100% précis (tableau XXIIIA). Par contre, l'algorithme B a rapporté l'insertion de A dans le gène *ITGAE* de 2 lignées établies après la récurrence de la maladie, OV1369-2 et OV3133. Comme cette insertion n'a pas été validée dans les neuf lignées cellulaires, le pourcentage de précision de l'algorithme B est de 77.8% (tableau XXIIIB).

ITGAE

A) Algorithme A

La mutation d'*ITGAE* n'a pas été rapportée par l'algorithme A

Gène	Précision de détection des mutations (%)
<i>ITGAE</i>	100

B) Algorithme B

Gène	Technique	TOV1369TR	OV1369-2	OV2295	OV2295-2	TOV2295	TOV3133D	TOV3133G	OV3133	OV3133-2	Précision de détection des mutations (%)
<i>ITGAE</i>	RNAseq	.A	.A	.A	.A	.A	.A	.A	.A	.A	7/9=77.8
	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau XXIII : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations d'*ITGAE* issues de l'analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Pourcentage de précision de l'algorithme A. B) Validation des mutations détectées par l'algorithme B. Case grise : mutation non rapportée, case bleue : mutation rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger.

3.6.6 *SEMA6C*

SEMA6C ou Sema Y est un membre de la famille des sémaphorines et appartient à la classe des sémaphorines VI qui sont des protéines transmembranaires [168]. Les sémaphorines contrôlent plusieurs aspects de la régénération cellulaire neuronale et le guidage axonal. Quelques études indiquent leur rôle dans l'angiogenèse, la migration cellulaire et la réponse immunitaire [169, 170]. En effet les sémaphorines sont divisées entre pro- et anti-tumoraux [169]. *SEMA6C* est principalement impliquée dans le maintien et le remodelage des connections neuronales, très peu d'études ont analysé son rôle dans le cancer [171]. Néanmoins, son expression a été détectée dans plusieurs tissus normaux et tumoraux y compris l'ovaire et les tumeurs ovariennes [172].

Deux mutations distinctes de *SEMA6C* ont été détectées par l'algorithme B soit G>A à la position 149376141 (c.1026C>T, NM_030913) dans la lignée TOV2295 et C>T à la position 149374290 dans la lignée OV1369-2 (c.1889G>A, NM_030913) (tableau XXIV). Ces mutations n'ont pas été détectées par la première série d'analyse (Algorithme A).

Gène	Algorithme A			Algorithme B		
	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Substitution	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Substitution
<i>SEMA6C</i>	∅			149376141	TOV2295	G>A
				149374290	OV1369-2	C>T

Tableau XXIV : Comparaison entre les mutations de *SEMA6C* détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire. ∅ : pas de mutation, G>A : remplacement d'une guanine par une adénine, C>T : remplacement d'une cytosine par une thymidine

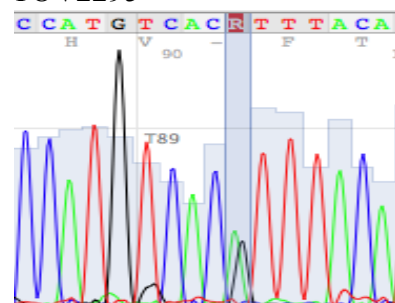
La mutation G>A de *SEMA6C* en 149376141 est rapportée dans la lignée TOV995 par l'algorithme B. De même, la mutation C>T en 149374290 a été identifiée dans la lignée OV1369-2. Les chromatogrammes de validation montrent une mutation hétérozygote caractérisée par la présence de l'allèle muté A et de l'allèle sauvage G (figure 17A, courbe verte) dans l'ADNg de la lignée TOV2295, ainsi que dans les deux autres lignées de la même patiente

soient OV2295 et OV2295-2. La présence des deux courbes noire (G) et verte (A) montre que les deux allèles du gène *SEMA6C* sont présents.

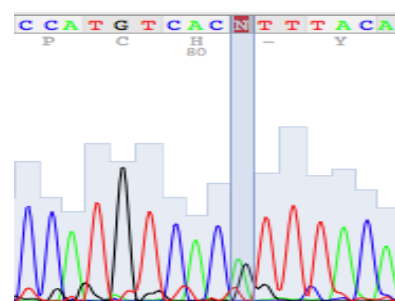
Le chromatogramme de la lignée établie après la récurrence de la maladie OV1369-2, montre qu'elle est hétérozygote pour *SEMA6C*. Ce gène présente un nombre égal de copies des deux allèles normal et muté (superposition parfaite des courbes bleue (C) et rouge (T)). Le même profil de courbe a été observé dans le chromatogramme de l'ADNg de la lignée établie après le diagnostique, TOV1369TR (figure 17B). La présence de l'allèle muté n'a pas été confirmée dans l'ADNc.

A) ADNg

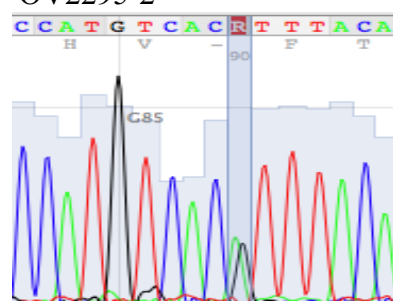
TOV2295



OV2295



OV2295-2



B) ADNg

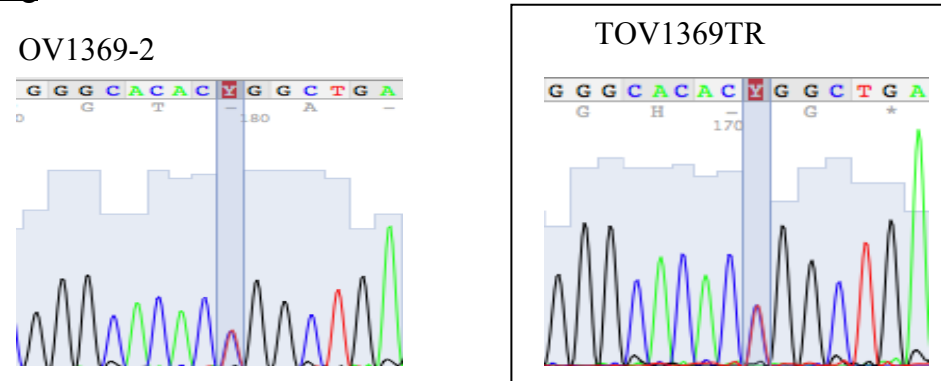


Figure 17 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *SEMA6C*. A) Séquences de l'ADNg des lignées TOV2295, OV2295 et OV2295-2 montrant la présence d'une hétérozygotie GA de *SEMA6C* à la position 149376141. B) Séquences de l'ADNg des lignées OV1369-2 et TOV1369TR montrant la présence d'une hétérozygotie CT de *SEMA6C* à la position 149374290.

R : le code R signifie que la base à cette position pourrait être une adénine (A) ou une guanine (G). N : le code N signifie que la base à cette position pourrait être une adénine (A), une guanine (G), une thymidine (T) ou une cytosine (C). Y : le code Y signifie que la base à cette position pourrait être une thymidine (T) ou une cytosine (C).

Ces résultats augmentent le score P de *SEMA6C* de 2 pour la première mutation (G>A) et de 1 pour la deuxième mutation (C>T), ainsi les deux scores après la validation sont P=3 et R=2.

L'algorithme A n'a pas détecté de mutation dans *SEMA6C*. Pourtant, le séquençage Sanger a montré la présence de mutations dans les lignées des patientes 1369 et 2295. Le séquençage des lignées 2295 n'était pas disponible au moment de l'analyse des résultats par l'algorithme A. Ce qui fait que l'algorithme A n'a pas détecté la mutation C>T présente dans les lignées TOV1369TR et OV1369-2. Ainsi le pourcentage de précision de cet algorithme est de 83.4% (tableau XXVA). L'algorithme B a permis la détection de la mutation C>T dans la lignée OV1369-2 et de la mutation G>A dans la lignée TOV2295. Par contre, cet algorithme n'a pas détecté la mutation C>T dans la lignée TOV1369TR et la mutation G>A dans les lignées OV2295 et OV2295-2 (tableau XXVB). Ce qui fait que le pourcentage de précision de l'algorithme B est de 83.4%.

SEMA6C

A) Algorithme A

La mutation de *SEMA6C* n'a pas été rapportée par l'algorithme A

Gène	Précision de détection des mutations (%)
<i>SEMA6C</i>	10/12=83.4

B) Algorithme B

Gène	Technique	TOV1369TR		OV1369-2		OV2295		OV2295-2		TOV2295		TOV3133D		TOV3133G		OV3133		OV3133-2		Précision de détection des mutations (%)
		G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	G>A	C>T	
<i>SEMA6C</i>	RNAseq																			15/18=83.4
	PCR	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau XXV : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de *SEMA6C* issues de l'analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Pourcentage de précision de l'algorithme A. B) Validation des mutations détectées par l'algorithme B. Case grise : mutation non rapportée, case bleue : mutation rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, + : mutation confirmée par séquençage Sanger, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger.

3.6.7 *GLCE*

GLCE (*glucuronic acid epimerase*) est responsable de l'épimérisation de l'acide D-glucuronique de l'héparan sulfate en acide L-iduronique. Ce dernier confère à une chaîne polysaccharidique l'aptitude à se lier à des facteurs de croissance et à des cytokines. *GLCE* pourrait être un suppresseur de tumeur car il supprime la prolifération des cellules du cancer du poumon à petites cellules *in vitro* et la croissance des tumeurs *in vivo* [173]. De plus, son expression est diminuée dans 82-84% des tumeurs du sein. La restauration de cette expression inhibe la prolifération de la lignée cellulaire MCF7 via l'atténuation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'angiogenèse et la formation de métastases [174, 175]. Aucune étude n'a montré l'association de *GLCE* avec le cancer de l'ovaire.

L'algorithme B a permis de détecter deux mutations de *GLCE* dans deux lignées cellulaires établies à partir des tumeurs récurrentes de deux patientes distinctes. La première mutation est une substitution de A>G à la position 67335348 (c.377T>C, NM_015554) dans la lignée OV3133-2 et la deuxième est une substitution de T>G à la position 67335353 (c.382A>C, NM_015554) dans la lignée TOV2295 (tableau XXVI). Comme pour *ITGAE* et *SEMA6C*, l'algorithme A n'a pas permis de détecter ces mutations.

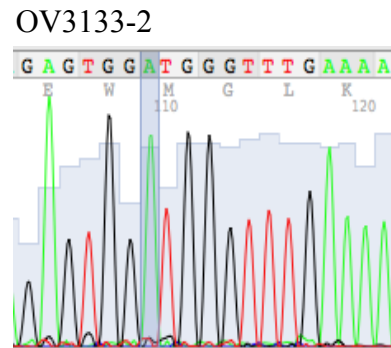
Gène	Algorithme A			Algorithme B		
	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Substitution	Position de la mutation	Lignées cellulaires	Substitution
<i>GLCE</i>	∅			67335348	OV3133-2	A>G
				67335353	TOV2295	T>G

Tableau XXVI : Comparaison entre les mutations de *GLCE* détectées par les algorithmes A et B, dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire. ∅ : pas de mutation, A>G : remplacement d'une adénine par une guanine, T>G : remplacement d'une thymidine par une guanine.

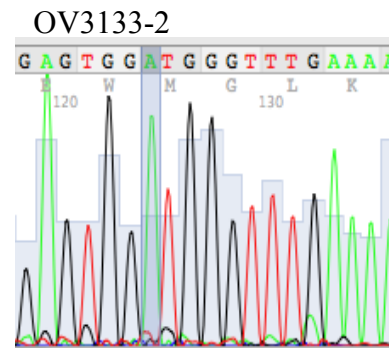
La lignée OV3133-2 présente une substitution de A>G à la position 67335348 et la lignée TOV2295 a une mutation de T>G en 67335353. Les chromatogrammes d'ADNg et d'ADNc montrent que la lignée OV3133-2 est homozygote pour *GLCE* à la position 67335348. Ceci signifie que seule la copie normale de l'allèle est présente (figure 18A).

De même, la lignée TOV2295 présente une homozygotie de l'allèle sauvage T à la position 67335353 (figure 18B). L'absence de l'allèle muté G signifie l'absence de la mutation rapportée par l'algorithme B.

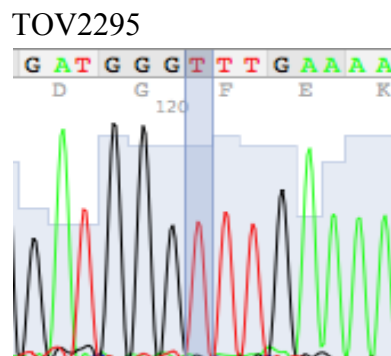
A) ADNg



ADNc



B) ADNg



ADNc

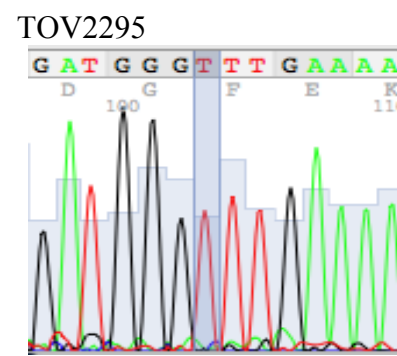


Figure 18 : Chromatogrammes de séquençage de l'ADNg et de l'ADNc de *GLCE*. A) Séquences de l'ADNg (à gauche) et de l'ADNc (à droite) de la lignée OV3133-2 montrant l'absence de la mutation A>G de *GLCE* à la position 67335348. B) Séquences de l'ADNg (à gauche) et de l'ADNc (à droite) de la lignée TOV2295 montrant l'absence de la mutation T>G de *GLCE* à la position 67335353.

Comme pour *NCOR2* et *ITGAE*, le pourcentage de précision de l'algorithme A est de 100% (tableau XXVIIA). L'algorithme B a détecté les mutations T>G et A>G dans les lignées TOV2295 et OV3133-2, respectivement. Comme ces mutations n'ont pas été validées dans aucune lignée, alors le pourcentage de précision de l'algorithme B est de 88.9% (tableau XXVIIB).

GLCE

A) Algorithme A

La mutation de *GLCE* n'a pas été rapportée par l'algorithme A.

Gène	Précision de détection des mutations (%)
<i>GLCE</i>	100

B) Algorithme B

Gène	Technique	TOV1369TR	OV1369-2	OV2295	OV2295-2	TOV2295	TOV3133D	TOV3133G	OV3133	OV3133-2	Précision de détection des mutations (%)	
<i>GLCE</i>	RNaseq	A>G	T>G	A>G	T>G	A>G	T>G	A>G	T>G	A>G	T>G	16/18=88.9
	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau XXVII : Sommaire des validations par séquençage Sanger des mutations de *GLCE* issues de l'analyse des résultats de TSNG par les algorithmes A et B. A) Validation des mutations détectées par l'algorithme A. B) Validation des mutations détectées par l'algorithme B. Case grise : mutation non rapportée, case bleue : mutation rapportée, case verte : cas consistant, case rouge : cas inconsistant, - : mutation non confirmée par séquençage Sanger.

En conclusion, les travaux de validations nous ont permis de confirmer la mutation C>T et G>A de *PLEC1* dans toutes les lignées des patientes 1369 et 3133, respectivement. La mutation C>T de *SCRIB* a été validée dans les lignées de la patiente 1369. Les mutations C>T et G>A de *SEMA6C* ont été confirmées dans les lignées OV1369-2 et TOV2295, respectivement.

3.7 Comparaison entre les pourcentages de précision pour détecter les mutations de chaque algorithme

Toutes les mutations de *PLEC1* détectées par l'algorithme A (tableau XVA, encadré bleu) ont été validées par séquençage Sanger (tableau XVA, encadré vert). Aucune des nouvelles positions de mutations de *PLEC1* détectées par l'algorithme B n'a été retrouvée par séquençage Sanger (tableau XVB, encadré rouge). La mutation C>T de *SCRIB* détectée par l'algorithme A dans TOV1369TR a été également retrouvée dans la lignée OV1369-2 (tableau XVIIIA, 2^{ème} encadré rouge). Cette mutation a été détectée par l'algorithme B (tableau XVIIIB, 2^{ème} encadré bleu). Les mutations G>T de *SCRIB* détectées par l'algorithme A n'ont pas été validées par séquençage Sanger ni détectées par l'algorithme B. Pour *SCRIB*, l'algorithme B a été plus sensible dans la détection des mutations avec un pourcentage de précision de 100% (tableau XVIIIB). Pour *NCOR2*, toutes les mutations détectées par l'algorithme B n'ont pas été validées par séquençage Sanger (tableau XIXB). Ce qui fait que l'algorithme A a un pourcentage de précision de 100% car il n'a pas détecté de mutation, ce qui est consistant avec nos résultats de séquençage (tableau XIXA). Les deux mutations de *IKBKB* détectées par l'algorithme A dans les lignées OV1369-2 et OV3133 n'ont pas été validées par séquençage Sanger. Le pourcentage est ainsi de 83.4% car ces mutations n'ont pas été retrouvées dans les autres lignées (tableau XXIA encadrés verts). L'algorithme B était plus sensible que l'algorithme A pour détecter la mutation d'*IKBKB* avec un pourcentage de précision de 100% (tableau XXIB). La validation des mutations d'*ITGAE* par séquençage Sanger a montré leur absence dans toutes les lignées cellulaires (77.8% de précision) (tableau XXIIIB). En effet, ces mutations ont été détectées par l'algorithme B seulement. Pour cela, l'algorithme A a un pourcentage de précision de 100% car il n'a pas permis une fausse prédiction de mutations (tableau XXIIIA). Les deux mutations de *SEMA6C* détectées par l'algorithme B dans les lignées établies après la récurrence ont été retrouvées dans les lignées établies après le diagnostique (tableau XXVB). Aucun des algorithmes n'a été 100% sensible pour détecter la mutation de *SEMA6C*. L'algorithme A a été peu efficace et peu sensible car il n'a pas permis de détecter ces mutations dans aucune des lignées qui ont subi le séquençage (lignées des patientes 1369 et 3133) (tableau XXVA encadrés rouges). L'algorithme B n'a pas permis la découverte de ces mutations dans les lignées établies après le diagnostique. Les deux algorithmes ont un

pourcentage de précision de 83.4% chacun (tableaux XXVA et B). Les mutations de *GLCE* détectées par l’algorithme B n’ont pas été validées (tableau XXVIIB). Ainsi, l’algorithme A a été 100% sensible (tableaux XXVIIA et XXVIII).

Gènes	Algorithme A	Algorithme B
<i>PLEC1</i>	100	91.7
<i>SCRIB</i>	41.7	100
<i>NCOR2</i>	100	44.5
<i>IKBKB</i>	83.4	100
<i>ITGAE</i>	100	77.8
<i>SEMA6C</i>	83.4	83.4
<i>GLCE</i>	100	88.9

Tableau XXVIII : Comparaison des pourcentages de précision de détection de mutations des deux algorithmes A et B

En conclusion, les analyses des résultats de séquençage réalisées par l’algorithme A (86.9%) ont un pourcentage de précision de détection de mutation plus élevé que celles réalisées par l’algorithme B (83.7%). Toutefois, l’algorithme B a permis de corriger les fausses prédictions de l’algorithme A. Une combinaison des analyses de résultats de séquençage faites par les deux algorithmes ainsi qu’une validation par séquençage Sanger sont nécessaires pour pouvoir confirmer la présence d’une mutation dans ces lignées.

3.8 Analyses bioinformatiques

3.8.1 Analyse des données brutes

D’abord, nous avons examiné la fréquence de mutations de *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* dans l’ADNg du sang des patientes 2295 et 3133 afin de déterminer si ces mutations sont germinales ou somatiques. Le sang de la patiente 1369 n’est pas disponible.

PLEC1 est muté dans les lignées des patientes 3133 (G>A) et 1369 (C>T). Par contre, le séquençage de l’ADNg de la patiente 3133 montre la présence d’une hétérozygotie de *PLEC1* à la position 145062985 où les deux allèles,

sauvage (G) et muté (A) sont présents. D'après le nombre de compte, l'allèle muté A (54%) est plus fréquent que l'allèle sauvage G (46%) (tableau XXIX). Ceci signifie que cette mutation pourrait être une mutation germinale ou un polymorphisme inconnu.

SEMA6C présente une mutation G>A dans les lignées TOV2295, OV2295 et OV2295-2 et une mutation C>T dans les lignées TOV1369TR et OV1369-2. Selon le séquençage de l'ADNg du sang de patiente 2295, l'allèle muté A apparait dans 28 % des comptes et l'allèle sauvage G dans 70%. La présence de l'allèle muté A dans l'ADNg du sang de la patiente 2295 signifie que la mutation pourrait être germinale ou correspondre à un polymorphisme inconnu (tableau XXI).

Les mutations C>T de *PLEC1*, C>T de *SCRIB* et C>T de *SEMA6C* sont présentes dans les lignées de la patiente 1369. La nature de ces mutations n'a pu être déterminée car le sang de la patiente 1369 n'est pas disponible.

Le fait que les mutations soient germinales c'est-à-dire présentes dans l'ADN de toutes les cellules de la patiente (ADN du sang) pourrait indiquer qu'il s'agit d'une mutation transmise par les gamètes ou d'un polymorphisme nucléotidique inconnu. Cependant, nous nous intéressons aux mutations somatiques car la majorité des mutations qui contribuent à la carcinogenèse sont des mutations somatiques.

Gène	<i>PLEC1</i> 145062985	<i>PLEC1</i> 145070608	<i>SCRIB</i> 144964972	<i>SEMA6C</i> 149376141	<i>SEMA6C</i> 149374290
Patiente/Mutation	G>A	C>T	C>T	G>A	C>T
2295	100% G	100% C	100% C	70% G : 28% A	100% C
3133	46% G : 54% A	67% C : 33% G	100% C	100% G	100% C

Tableau XXIX : Fréquence des bases azotées aux sites de mutations de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C* dans le sang des patientes 2295 et 3133.

Dans une deuxième étape, pour clarifier cet aspect, nous avons comparé la fréquence des mutations dans les données brutes du séquençage de l'ADNc des lignées cellulaires aux résultats de séquençage Sanger de l'ADNc.

Les données brutes de séquençage de l'ADNc des lignées TOV3133G et OV2295 ne sont pas disponibles. Pour *PLEC1*, les chromatogrammes de séquençage Sanger montrent une hétérozygotie des allèles G et A dans les lignées de la patiente 3133 et des allèles C et T dans les lignées de la patiente 1369. Cette hétérozygotie se voit encore dans

les données brutes de séquençage qui montrent des fréquences variables des deux allèles, sauvage et muté (tableau XXX, colonne 2 et 3, cases bleues). Les pourcentages de mutation dans les données brutes concordent avec les hauteurs des courbes des hétérozygotes dans les chromatogrammes de séquençage Sanger de l'ADNc. Par exemple, les données brutes de séquençage de l'ADNc de la lignée TOV3133D indiquent la présence de l'allèle sauvage G dans 51% des comptes et de l'allèle muté A dans 49%. De même, le chromatogramme de séquençage Sanger montre une superposition parfaite des deux courbes correspondantes aux allèles G et A (Voir figure 9B, chromatogramme TOV3133D). Le même profil est observé pour les autres mutations de *PLEC1* et de *SCRIB* (tableau XXX, figures 9B, 9D, 10B).

La convergence des données brutes de séquençage à haut débit de l'ADNc avec celles de séquençage Sanger montre le degré de précision et de fiabilité du séquençage à haut débit. Les lignées cellulaires dont les ADNc ont subi le séquençage ont été maintenues en culture longtemps, ainsi il ne reste que les cellules cancéreuses dans la pétrie. Ce qui écarte l'hypothèse de contamination par des cellules saines. Ainsi, les hétérozygoties G>A et C>T de *PLEC1* dans les lignées des patientes 3133 et 1369, C>T de *SCRIB* dans les lignées de la patiente 1369 et G>A et C>T de *SMEA6C* dans les lignées des patientes 2295 et 1369 indiquent qu'il s'agit probablement d'une mutation ou d'un polymorphisme inconnu.

Gène	<i>PLECI</i> 145062985	<i>PLECI</i> 145070608	<i>SCRIB</i> 144964972	<i>SEMA6C</i> 149376141	<i>SEMA6C</i> 149374290
Lignée cellulaire/ Mutation	G>A	C>T	C>T	G>A	C>T
TOV3133G	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
TOV3133D	51% G : 49% A				88% C : 13% T
OV3133	31% G : 68% A				
OV3133-2	37% G : 60% A				
TOV1369TR		35% C : 59% T	56% C : 44% T	50% G : 50% C	N.D
OV1369-2		28% C : 66% T	63% C : 37% T		57% C : 33% T
OV2295	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
OV2295-2	N.D	N.D	N.D	40 % G : 60% A	
TOV2295				36% G : 64% A	

Tableau XXX : Fréquences brutes des mutations de *PLECI*, *SCRIB* et *SEMA6C* dans les neuf lignées cellulaires. N.D : non disponible

3.8.2 Comparaison des mutations de *PLECI*, *SCRIB* et *SEMA6C* avec celles de la base de données COSMIC et avec les résultats de TCGA

L'analyse du profil de mutations de nos 3 gènes candidats, dont les mutations ont été validées par séquençage Sanger, dans la base de données COSMIC montre qu'ils sont mutés dans plusieurs tissus tumoraux incluant les carcinomes séreux ovariens.

Pour les trois gènes candidats, nous avons comparé les positions de mutations détectées par TSNG à celles rapportées par COSMIC dans le tissu tumoral ovarien. Pour *PLECI*, quatre mutations ont été identifiées dans les tumeurs ovariennes selon COSMIC, contre deux mutations validées dans les lignées des patientes 3133 et 1369TR par séquençage Sanger (tableau XXXI). Bien que les positions de mutations de *PLECI* ne soient pas identiques, la plupart se trouvent dans l'exon 1. La position 145062985 rapportées par TSNG ainsi que les positions 145066072,

145064522 et 145067627 mentionnées dans COSMIC sont présentes dans l'exon 1. Les positions 145070608 et 145078380 se trouvent respectivement dans l'exon 2 et l'exon 16. Pour *SCRIB*, les positions de mutation rapportées par COSMIC et TSNG ne sont ni identiques ni se trouvent dans les mêmes exons. La mutation 144964972 se trouve dans l'exon 25 et les mutations 144963074 et 144967875 sont dans l'exon 22 et 33. Les deux mutations de *SEMA6C* détectées par TSNG sont différentes de celle rapportée par COSMIC. Les positions 149374290 et 149376141 se trouvent dans l'exon 6 et dans l'exon 10 alors que la mutation 149377178, mentionnée dans COSMIC, se trouve dans l'exon 12.

En effet, les mutations présentes dans la base de données COSMIC proviennent de la liste de gènes mutés publiés par le réseau de recherche TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Ceci signifie que les positions de *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* détectées par TSNG et validées par séquençage Sanger n'ont pas été précédemment identifiées dans les tumeurs ovariennes ni par COSMIC ni par TCGA.

Gènes	COSMIC		TSNG	
	Position génomique de mutation	Changement d'acide aminé	Position génomique de mutation	Changement d'acide aminé
<i>PLEC1</i>	145066072	R3439M	145070608	R1963Q
	145064522	P3956S	145062985	P4468L
	145067627	Q2921E		
	145078380	R800Q		
<i>SCRIB</i>	144963074	I603N	144964972	D426N
	144967875	D122E		
<i>SEMA6C</i>	149377178	A192G	149376141	R264C
			149374290	R518Q

Tableau XXXI : Tableau comparatif entre les positions de mutations de *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* qui sont rapportés par TSNG et ceux qui sont rapportés par la base de donnée COSMIC dans les carcinomes de l'ovaire. R1963Q : mutation de l'arginine 1963 en glutamine, P : proline, L : leucine, M : méthionine, S : sérine, E : acide glutamique, D : acide aspartique, N : asparagine, I : isoleucine C : cystéine, A : alanine, G : glycine.

3.9 Effet des mutations sur la structure protéique

3.9.1 Effet sur la charge et la polarité

La mutation G>A de *PLEC1* à la position 145062985 est une mutation faux-sens qui entraîne un changement de la proline 4468 en leucine. Selon les données de séquençage TSNG, cette mutation n'affecte pas la charge de la protéine mais engendre un changement radical de la polarité. Ce changement de polarité pourrait entraîner une variation des interactions de PLEC1 avec d'autres molécules et avoir des conséquences sur la structure et la fonction de cette protéine. Un changement conservatif de la charge de PLEC1 signifie que l'acide aminé muté possède les mêmes caractéristiques de charge que l'acide aminé de référence (tableau XXXII).

La deuxième mutation validée dans *PLEC1* (145070608) est une mutation de l'arginine en glutamine et pourrait entraîner un changement radical de la charge et de la polarité de la protéine. D'après les données de séquençage, cette mutation pourrait rendre la protéine non fonctionnelle ou ne pas permettre au gène d'être transcrit (mutation nulle). Le domaine protéique contenant l'acide aminé muté n'est pas reconnu (tableau XXXII).

La seule mutation validée de *SCRIB* à la position 144964972 pourrait provoquer un changement radical de la charge de la protéine, la charge de l'acide aspartique étant négative et celle de l'asparagine nulle. La polarité de la protéine pourrait restée inchangée car l'asparagine a la même polarité que l'acide aspartique. Cette mutation pourrait éliminer complètement la fonction du gène ou de la protéine de SCRIB. Elle se trouve dans un domaine suffisant pour permettre la liaison de SCRIB aux jonctions adhérentes et d'inhiber la prolifération cellulaire (tableau XXXII).

Les deux mutations de *SEMA6C* pourront avoir des effets radicaux sur la charge et la polarité. Ce sont des mutations faux-sens c'est-à-dire que les codons substitués désignent d'autres acides aminés ayant des propriétés différentes. La mutation G>A change l'arginine en cystéine, deux acides aminés polaires. Étant l'acide aminé polaire le plus hydrophile, l'arginine est plus polaire que la cystéine. La charge de ces deux acides aminés est différente avec une charge positive pour l'arginine et nulle pour la cystéine. La mutation C>T de *SEMA6C* entraîne la substitution de l'arginine qui est un acide aminé polaire, hautement hydrophile et chargé positivement par la glutamine polaire, moins hydrophile et qui non chargée. Cette mutation pourrait avoir des effets radicaux sur la charge et la polarité (tableau XXXII).

Gènes	Position génomique de mutation	Mutation	Changement d'acide aminé	Changement de charge/polarité	Domaine protéique contenant la mutation	Effet sur la fonction
<i>PLEC1</i>	145062985	G->A	P4468L	Conservatif/ Radical	Répétition plakine ou plectine 30	Faux-sens
	145070608	C->T	R1963Q	Radical/ Radical	Non identifié	Nul
<i>SCRIB</i>	144964972	C->T	D426N	Radical/ Conservatif	Domaine de liaison aux jonctions adhérentes et impliqué dans l'inhibition de la prolifération cellulaire	Nul
<i>SEMA6C</i>	149376141	G->A	R264C	Radical/ Radical	Domaine Sema	Faux-sens
	149374290	C->T	R518Q	Radical/ Radical	Domaine PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin)	Faux-sens

Tableau XXXII : Effet de la mutation sur la charge et la polarité et les domaines protéiques mutés. G>A : Substitution de la guanine par une adénine, C>T : Substitution de la cystéine par une thymidine, P : Proline, L : Leucine, R : Arginine, Q : Glutamine, D : Acide aspartique, N : Asparagine, C : Cystéine.

3.9.2 Effet sur la structure protéique

Les cristaux du motif répété Plectine 30 de PLEC1 et des domaines Sema et PSI de SEMA6C sont disponibles dans la base de données ExPASy. En utilisant le serveur Phyre, les structures secondaires et tertiaires des séquences protéiques normales et mutées de PLEC1 (P4468L) et SEMA6C (R264C et R518Q) ont été prédites.

3.9.2.1 PLEC1

La mutation P4468L de PLEC1 se situe dans le motif répété plectine 30 (domaine C) (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q15149>) (tableau XXXII). PLEC1 appartient à la famille des Plakines. Les Plakines sont des protéines de structure qui lient les membranes cellulaires aux filaments intermédiaires du squelette des cellules, aux filaments d'actine et aux microtubules. PLEC1 contient 33 motifs répétés plectine (*Plectine repeat*) regroupés en 6 domaines (5 domaines B et 1 domaine C) [176]. Ces répétitions plectines ont été observées dans plusieurs protéines d'adhésion cellulaire, dans les envoplakines et dans les desmoplakines. Le rôle

de ces répétitions n'est pas bien élucidé mais quelques études ont démontré qu'elles sont des sites de liaison de PLEC1 à d'autres protéines structurales. Par exemple, la plectine interagit avec la Desmine, une protéine présente dans le muscle strié, via son domaine répété [177]. Une étude récente a montré que le domaine C, constitué de motifs répétés plectine, est requis pour la liaison de PLEC1 aux filaments intermédiaires. La mutation du domaine C perturbe la distribution des filaments intermédiaires de vimentine [178]. Favre *et al.* ont montré que l'association de plectine avec la desmine et la vimentine dépend fortement de son cinquième domaine B [179].

La figure 19 montre une superposition de la structure tridimensionnelle normale (en vert) et mutée (en bleu foncé) du domaine répété Plectine 30. La mutation P4468L est indiquée en rouge et est située dans un coude. Cette superposition montre une divergence, en amont de la mutation, de l'angle de déviation d'un coude correspondant à la séquence AFCGFEDPRTKKMSA (figure 19).

La mutation P4468L de PLEC1 pourrait avoir un effet sur la capacité de cette protéine à interagir avec les filaments intermédiaires ainsi qu'avec d'autres protéines d'échafaudage. Ceci pourrait engendrer un changement de l'adhésion de la cellule à la matrice ainsi qu'à d'autres cellules et pourrait affecter la motilité cellulaire. La perturbation à ces deux fonctions contribuerait à la carcinogenèse.

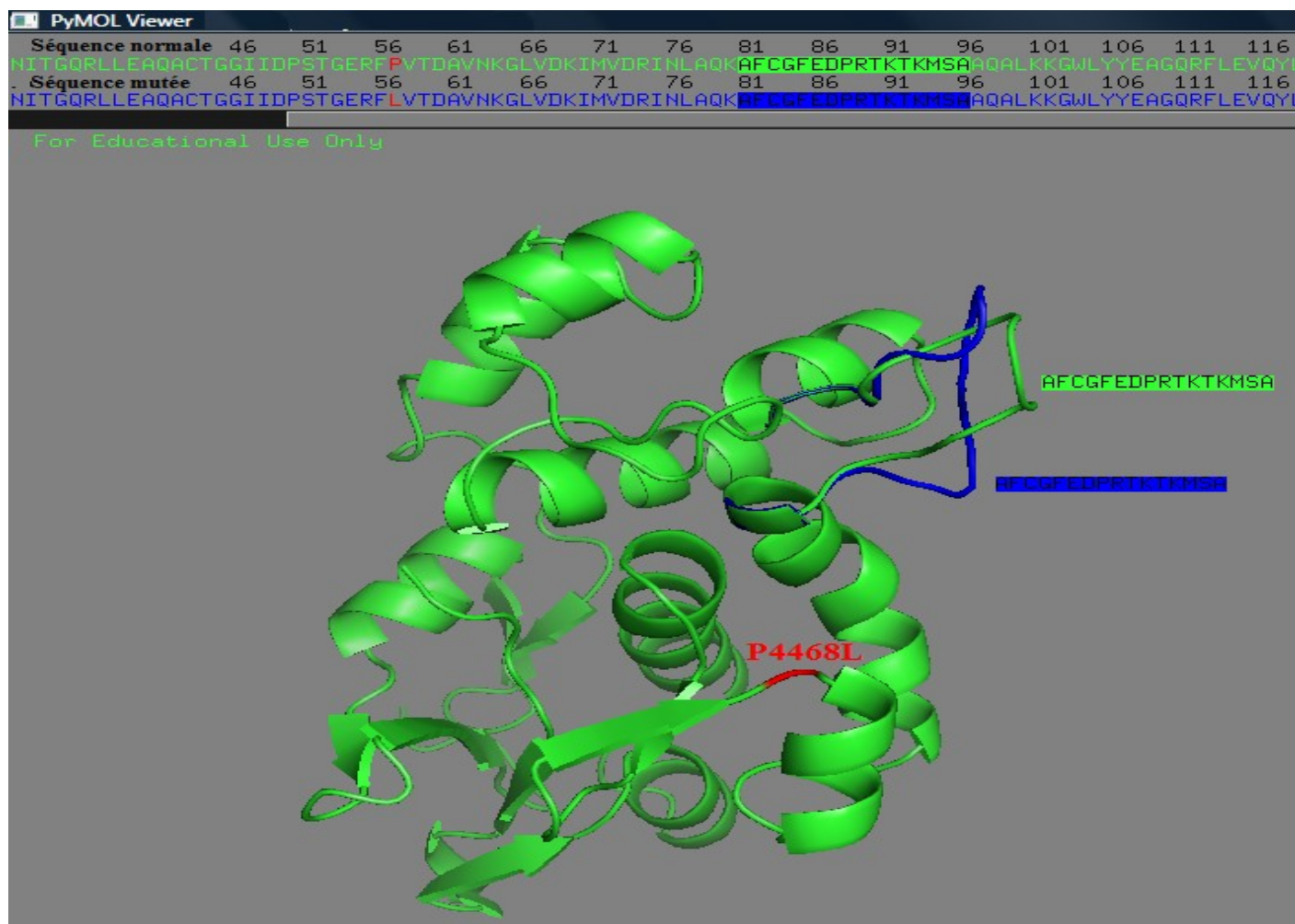


Figure 19 : Superposition des structures tridimensionnelles sauvage et mutée du domaine répété Plectine 30 de PLEC1. La configuration sauvage apparaît en vert et celle mutée en bleu. La mutation P4468L apparaît en rouge.

3.9.2.2 SEMA6C

La mutation R264C est dans le domaine Sema de SEMA6C, qui est un domaine caractéristique de la famille des sémaforines. Plusieurs études ont montré l'importance de ce domaine pour les interactions protéine-protéine et ligand-protéine [180] (tableau XXXII). Le domaine Sema est un domaine extracellulaire qui a pour rôle d'auto-inhiber le récepteur. La déplétion du domaine Sema du récepteur engendre l'activation constitutive de ce dernier. La prédiction de la structure tridimensionnelle du domaine Sema muté de SEMA6C montre quelques variations par rapport à la structure non mutée (figure 20). La superposition des configurations sauvage (figure 20 en vert) et muté

(bleu clair) montre quatre différences. La mutation est localisée dans un coude et elle entraîne des changements de structure en amont et en aval. Les changements 1, 2, 3 sont en aval de la mutation R264C et le changement 4 est en amont (figure 20). Le changement 1 est une déviation de l'angle de repliement du coude TPVSEDRVPSRPGSCAGV. Le changement 2 est un décalage entre la longueur de 2 feuillets beta et d'un coude. En effet, la conformation mutée (figure 21) présente un feuillet beta plus court (A1) suivi d'un coude C1 plus long et d'un autre feuillet beta plus court (B2) que le feuillet beta A2, le coude C2 et le feuillet beta B2 de la conformation sauvage (verte). Le changement 3 est une déviation de l'angle de repliement du coude NLHGRSA (figure 20). Le changement 4 est une déviation de l'angle de repliement du coude et une variation dans la structure secondaire de la séquence AELGLDFQRFLTLNRT. Cette séquence correspond normalement à un coude mais la conformation mutée de la protéine montre la présence d'un feuillet beta au niveau de la séquence AELGLD et d'un coude dans le reste soit FQRFLTLNRT (figure 22).

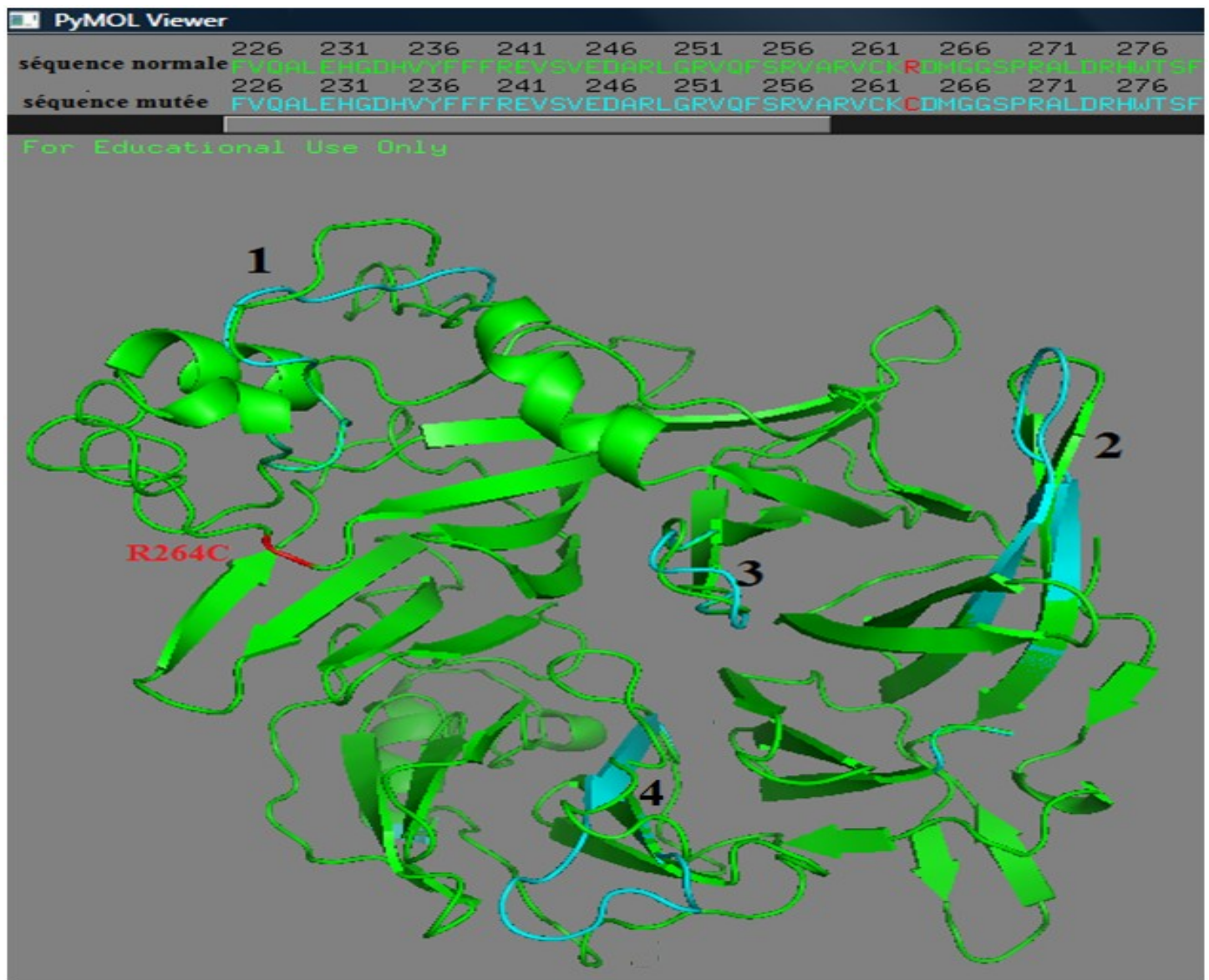


Figure 20 : Superposition du domaine Sema sauvage et muté de SEMA6C. Le changement 1 correspond à la séquence : TPVSEDRVPSRPGSCAGV, le changement 2 correspond à la séquence : LKVLTPGGRSGGPEPILL, le changement 3 correspond à la séquence : NLHGRSA, le changement 4 correspond à la séquence : AELGLDFQRFLTLNRT, R264C : mutation de l'arginine 264 en cystéine.

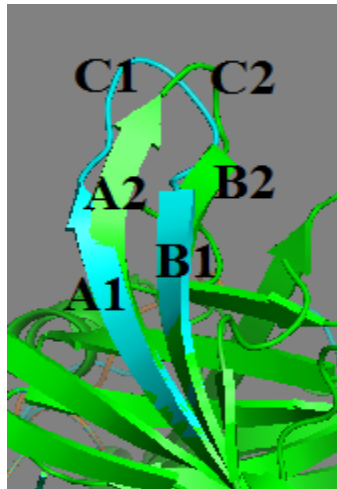


Figure 21 : Superposition des domaines Sema de SEMA6C sauvage et muté au niveau de la séquence LKVLTPGGRSGGPEPILL

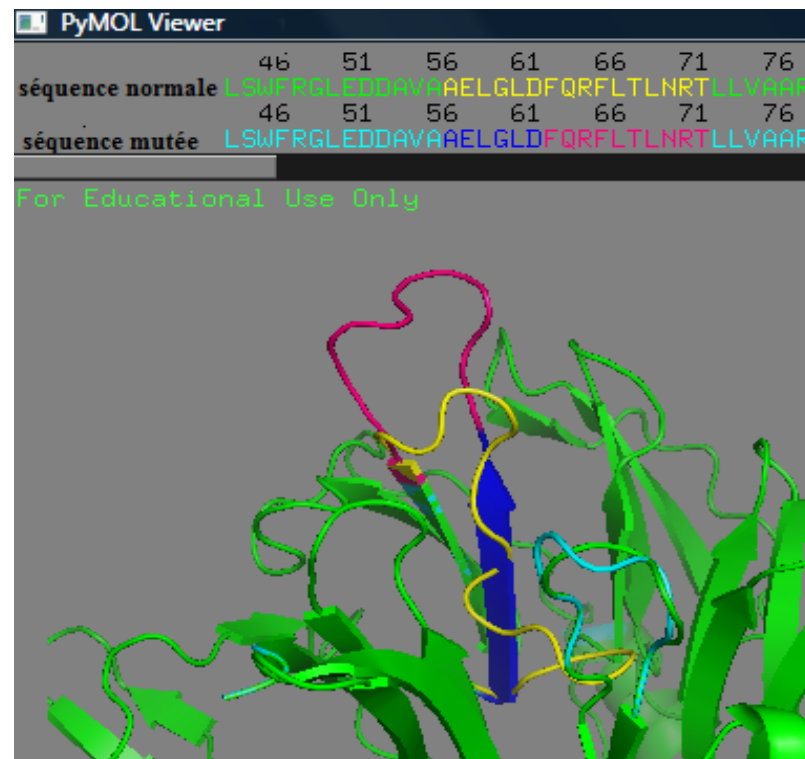


Figure 22 : Superposition des domaines Sema de SEMA6C sauvage et muté au niveau de la séquence AELGLDFQRFLTLNRT. La conformation sauvage présente un coude (en jaune) alors que la conformation mutée présente un feuillet beta (en bleu foncé) et un coude (en rose) au niveau de la séquence AELGLDFQRFLTLNRT.

La mutation R518Q est située au début du domaine PSI (Plexin- Semaphorin- Integrin) de SEMA6C (tableau XXXII). Ce domaine a été identifié dans les plexines qui sont des protéines impliquées dans le développement des tissus neuronaux et épithéliaux, dans les sémaphorines qui ont pour fonction de paralyser les cônes de croissance neuronaux et dans les intégrines qui sont essentielles pour l'adhésion des cellules épithéliales. Ce domaine est impliqué dans le maintien de l'intégrine dans un état plié et est responsable de la transduction des changements conformationnels de la protéine qui le contient [181]. Il contrôle la reconnaissance du ligand à son intégrine cible [181]. La mutation R518Q apporte trois modifications au domaine PSI. D'abord, elle cause un enroulement précoce de l'hélice (1) de la séquence ACQRSCL, une rotation du plan des feuillets beta de la séquence CGWHS (2) et de la séquence SRGCVD (3) (figure 23).

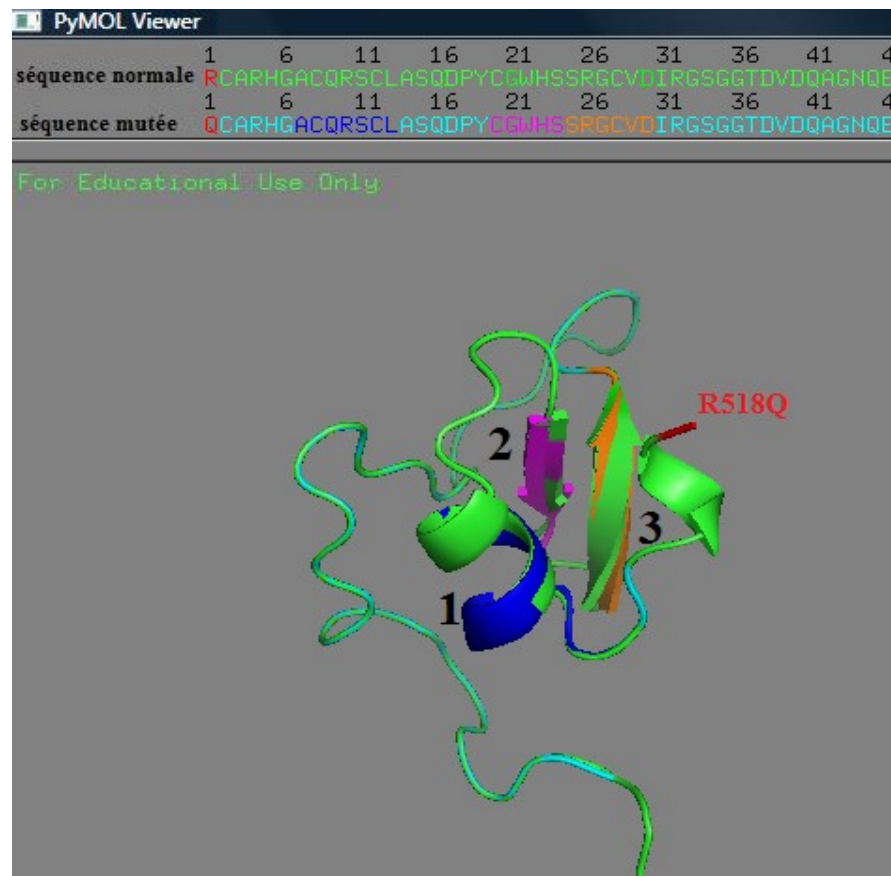


Figure 23 : Superposition des domaines PSI sauvage et muté de SEMA6C. La conformation mutée présente un enroulement précoce de l'hélice alpha (en bleu foncé) et une rotation du plan des feuillets beta (en rose et orange).

La mutation du domaine Sema de plusieurs protéines a été identifiée dans le cancer de poumons à petites cellules, cancer de l'estomac et le mésothéliome pleural malin [182, 183]. Aucune mutation des domaines Sema et PSI de SEMA6C n'a été identifiée. Les domaines Sema et PSI jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. Ainsi, les mutations R264C et R518Q pourraient avoir un effet sur l'interaction du récepteur avec son ligand et pourraient perturber l'adhésion et la migration cellulaires [168].

3.10 Effet de la mutation sur l'expression des gènes

Les données de la micropuce à ADNc MAS5 U133 Plus 2 d'Affymetrix ont été utilisées pour comparer les niveaux d'expression des gènes *PLECI*, *SCRIB* et *SEMA6C* dans les neuf lignées cellulaires.

Deux sondes ont été utilisées afin d'évaluer les niveaux d'expression de *PLECI*. Les deux sondes sont localisées au début de l'exon 1 de *PLECI*. Le niveau d'expression de *PLECI* détecté par la sonde 201373_at et celui détecté par la sonde 216971_s_at se ressemblent. Les niveaux d'expression de *PLECI* dans les neuf lignées cellulaires sont variables. Les lignées TOV2295, OV2295-2, TOV3133G, TOV3133D, OV3133, OV3133-2 et TOV1369TR expriment *PLECI* à des faibles niveaux, alors que les lignées OV1369-2 et OV2295 ont une expression plus élevée de *PLECI*. Les lignées cellulaires présentant la mutation semblent avoir entre elles des niveaux d'expression variables de *PLECI*. Par exemple, la lignée OV1369-2 exprime *PLECI* 2 fois plus que la lignée TOV1369TR. De plus, l'expression de *PLECI* dans les lignées non mutées n'est pas la même. La lignée OV2295 exprime 3 fois plus de *PLECI* que TOV2295 et 2 fois plus qu'OV2295-2. Les quatre lignées mutées de la patiente 3133 ont des niveaux de *PLECI* comparables à ceux de la lignée non mutée OV2295-2 (figure 24).

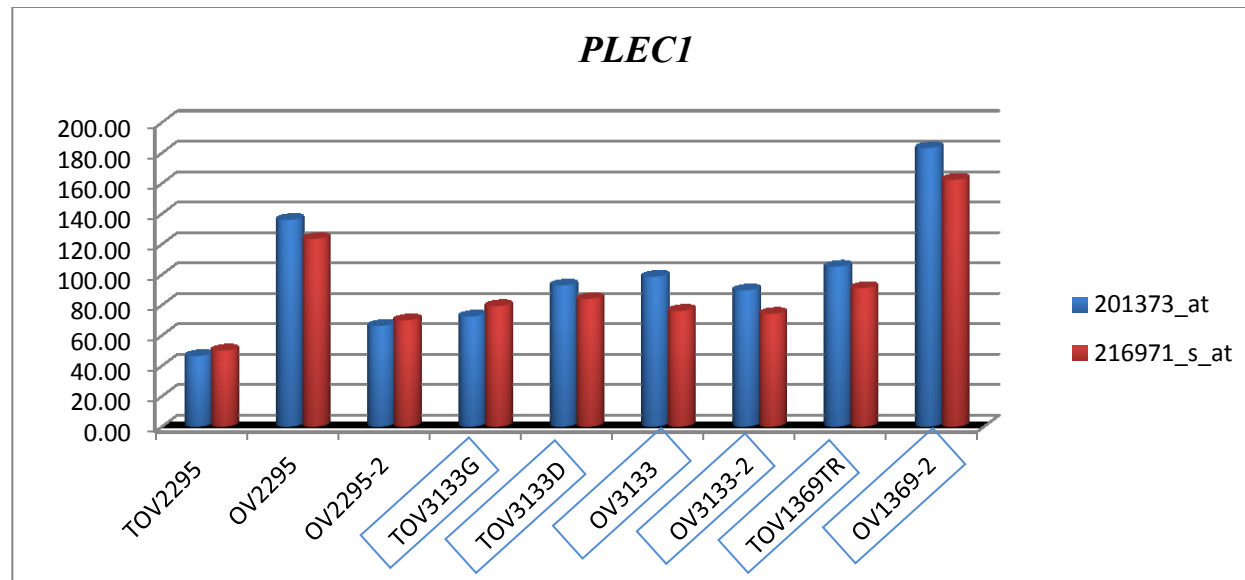


Figure 24 : Niveaux d'expressions de *PLEC1* dans les neuf lignées cellulaires. Les lignées mutées (encadrées en bleu) montrent des niveaux d'expression de *PLEC1* comparables aux lignées ne présentant pas la mutation. À noter qu'un gène est faiblement exprimé lorsque son niveau d'expression est entre 50 et 100.

La sonde 212556_at, située dans l'exon 1 de *SCRIB*, a été utilisée pour évaluer le niveau d'expression de ce gène. Pour les neuf lignées cellulaires, les niveaux d'expressions de *SCRIB* sont variés et élevés. Les lignées TOV2295 et TOV1369TR expriment *SCRIB* à de très haut niveau. *SCRIB* est mutée dans les lignées TOV1369TR et OV1369-2. Les niveaux d'expression de *SCRIB* muté dans ces lignées sont comparables aux niveaux d'expression de *SCRIB* sauvage dans les autres lignées. Bien que *SCRIB* soit muté dans la lignée OV1369-2 et non muté dans la lignée OV3133, ces deux lignées ont une expression identique de *SCRIB* (figure 25).

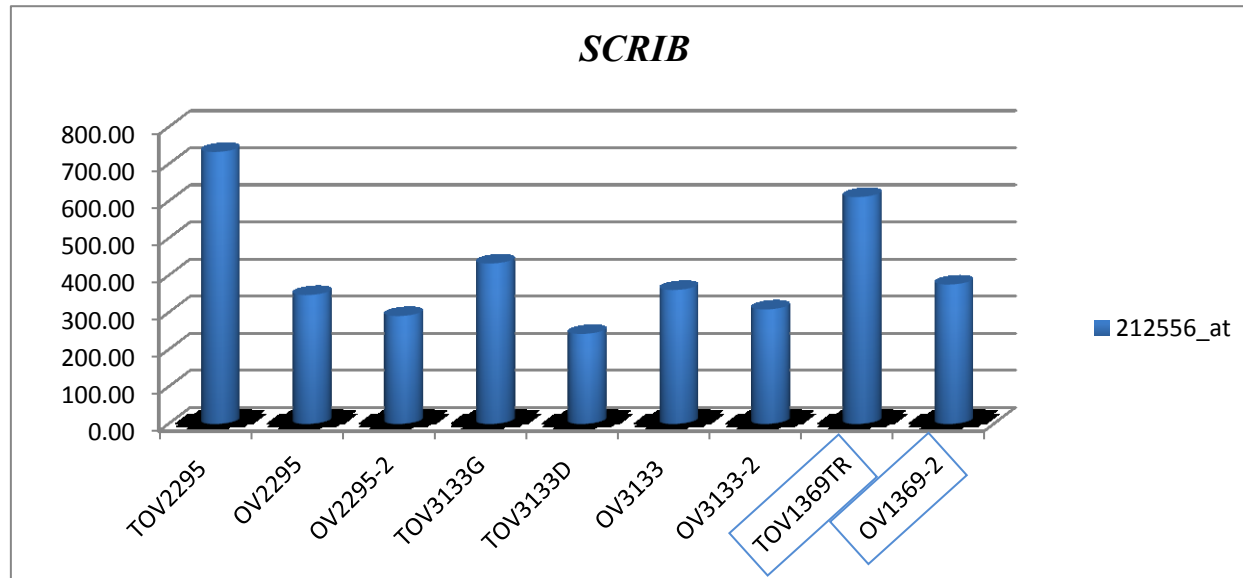


Figure 25 : Niveaux d'expressions de *SCRIB* dans les neuf lignées cellulaires.

Les niveaux d'expression de *SEMA6C* dans les neuf lignées cellulaires ont été mesurés par la sonde 208100_x_at qui est située au début de l'exon 1. Toutes nos lignées cellulaires expriment très faiblement *SEMA6C*. La mutation ne semble pas affecter ces niveaux d'expression du fait que les lignées non mutées pour *SEM6C*, l'exprime encore très faiblement (figure 26).

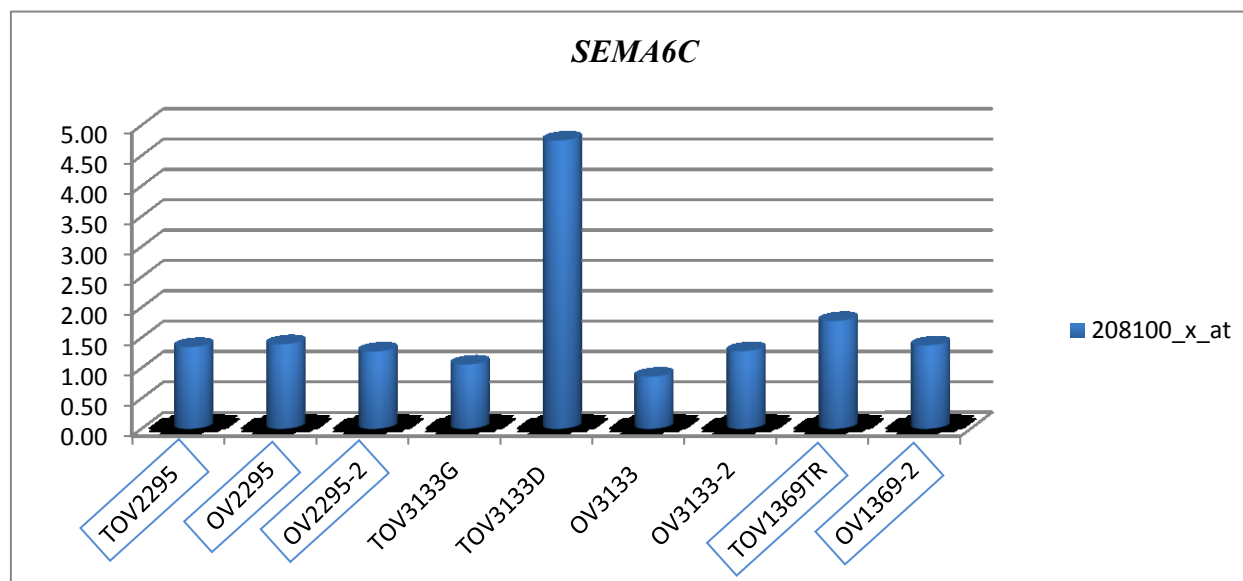


Figure 26 : Niveaux d'expressions de *SEMA6C* dans les neuf lignées cellulaires.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 L'importance de notre modèle cellulaire dans l'étude de l'évolution du CEO

Dans notre laboratoire, des lignées cellulaires ont été déjà établies à partir des tumeurs prélevées au moment du diagnostic et après la récurrence du cancer épithélial de l'ovaire. Au moment de l'établissement de ces lignées, ce modèle constituait une première dans le domaine du cancer épithélial de l'ovaire, jusqu'à ce qu'un groupe britannique ait publié en 2010 une étude où un modèle cellulaire similaire a été utilisé [184]. Cette stratégie permet de mieux comprendre l'évolution des tumeurs ovariennes dans le temps et les changements moléculaires et génétiques qui se déroulent après leur exposition à la chimiothérapie. En effet, les lignées établies après leur exposition aux traitements de chimiothérapies accumulent des altérations génétiques et épigénétiques qui pourraient contribuer à l'évolution de la maladie. L'établissement des lignées cellulaires ovariennes naïves pour la chimiothérapie dérivées des tumeurs prélevées au moment du diagnostic, est une étape essentielle pour mieux comprendre l'évolution de la biologie de ces cellules. Plus précisément, l'analyse génétique de ces lignées cellulaires modèles permettrait de découvrir et d'étudier les mutations de certains gènes et les modifications de certaines protéines qui pourraient être impliquées dans la progression du CEO.

Les lignées cellulaires ont été dérivées à partir de tumeurs solides (TOV) ou d'ascites (OV) de trois patientes (1369, 2295, 3133) présentant un CEO, peu de temps après le diagnostic (tumeurs primaire) et après la récurrence des tumeurs ovariennes. Les quatre lignées établies à partir de la tumeur primaire (TOV1369TR, OV2295, TOV3133D et TOV3133G) et les cinq lignées établies à partir de la tumeur récurrente [OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 et OV3133(2)] ont été caractérisées *in vitro* au niveau moléculaire (expression de HER2 et de TP53) et au niveau physiologique [185]. Des études plus poussées ont permis de caractériser la capacité des nos cellules à former des sphéroïdes, leur potentiel de migration, leur aptitude à croître indépendamment de l'ancrage, leur potentiel tumorigénique et leur réponse au paclitaxel et à le carboplatine [185].

Ces études ont été suivies par une caractérisation génétique des lignées cellulaires au moyen d'une technique de séquençage à haut débit. Les séquençages de l'ADNc (RNAseq) des lignées cellulaires et de l'ADNg du sang des trois patientes ont été effectués par la technique de séquençage de nouvelle génération (TSNG). Cette technique permet un séquençage massif en parallèle des régions codantes (transcriptome et exome) et du génome complet (*Whole genome shotgun sequencing*) sans avoir recours au clonage. Au cours des cinq dernières années, l'utilisation de la TSNG est devenue de plus en plus fréquente car elle fournit une technologie prometteuse dont le but sera de séquencer le génome en une semaine et pour un coût de moins de 1000 dollars (figure 27).

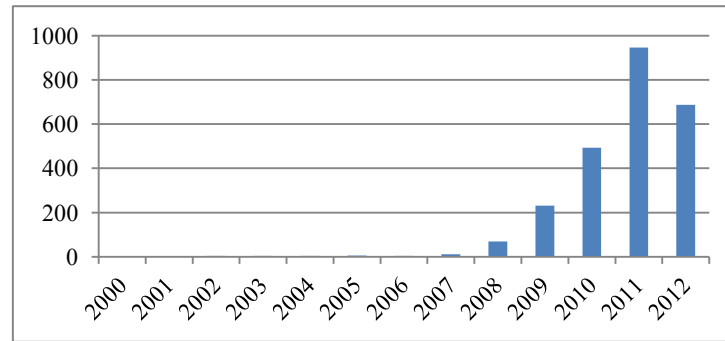


Figure 27 : Publications sur le séquençage de nouvelle génération parus dans NCBI durant la dernière décennie (jusqu'à juin 2012).

4.2 Analyse des algorithmes A et B

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) a permis la découverte des variations nucléotidiques (SNV ou *single nucleotide variant*) à l'échelle du génome et du transcriptome des cellules cancéreuses. Cette technique est capable de lire des millions de petites séquences qui, une fois comparées à un génome humain de référence, peuvent être analysées pour la présence des SNVs. Plusieurs outils sont disponibles pour la découverte et l'interprétation des SNVs mais aucun n'est spécifiquement adapté dans la gestion des données provenant du séquençage des tumeurs. En effet, la cellularité des tumeurs et l'altération de leurs ploïdies affectent les analyses statistiques de détection de mutations [186]. Pour cela, la conception et l'optimisation des algorithmes statistiques est toujours en cours afin de trouver les meilleurs paramètres probabilistes pour détecter les mutations.

Les algorithmes A et B utilisent le programme SNVMix, qui est un modèle de mélange probabiliste binomiale conçu pour détecter les mutations dans les données de séquençage de nouvelle génération. Les paramètres probabilistes de cet algorithme sont variables afin de maximiser la précision de détection. À chaque fois que les paramètres varient, le nombre de mutations détectées varie de même. Ceci constitue un inconvénient pour l'interprétation des résultats de séquençage car ces derniers sont susceptibles à des erreurs d'analyse et à des changements d'un algorithme à un autre. Il est important d'analyser les résultats de séquençage par différents paramètres afin d'optimiser la précision de détection des mutations.

La comparaison du nombre de substitutions identifiées par les deux algorithmes montre une importante différence dans les résultats générés par chaque algorithme. La deuxième analyse, effectuée par l'algorithme B, révèle un plus grand nombre de substitutions mais également un plus grand nombre de gènes mutés. Les insertions/délétions

rapportées par l'algorithme A sont beaucoup plus nombreuses que celles détectées par l'algorithme B (639 contre 69 pour les lignées des patientes 1369 et 3133). De même le nombre de gènes contenant des mutations de type insertions/délétions est plus important dans l'analyse effectuée par l'algorithme A que dans celle effectuée par l'algorithme B. Ces données montrent que l'algorithme A a permis la détection d'un plus grand nombre de gènes présentant des insertions/délétions alors que l'algorithme B a permis l'identification d'un plus grand nombre de gènes mutés et de mutations de type substitution. Ceci signifie que soit l'algorithme A est plus efficace pour détecter des indels que l'algorithme B, soit il est moins sensible car il permet de détecter un plus grand nombre de faux positifs c'est-à-dire des indels qui n'existent pas. De même pour l'algorithme B, le grand nombre de substitutions détectées pourrait être dû à une bonne efficacité ou à sa faible sensibilité entraînant la détection de faux positifs.

La comparaison du nombre de mutations identifiées dans l'ADNc des lignées cellulaires établies après la récurrence à celui des lignées cellulaires établies de la tumeur primaire nous a permis de tester l'hypothèse de Shah *et al.* qui propose que les tumeurs récurrentes présentent un plus grand nombre de mutations que les tumeurs primaires. Les lignées des patientes 1369 et 2295 qui ont été établies de la tumeur récurrente présentent plus de mutations que celles établies à partir de la tumeur primaire. Si les analyses de séquençage sont fiables, ces résultats montrent que la tumeur récurrente a acquis plus de mutations, soit parce qu'elle est génétiquement instable ou parce que le traitement de chimiothérapie a causé des dommages à son ADN. Cependant, les lignées établies de la tumeur récurrente de la patiente 3133 présentent moins de mutations que celles établies de la tumeur primaire. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'après la chimiothérapie, la tumeur a subi une pression de sélection entraînant l'émergence d'une sous-population résistante ne possédant pas les mêmes altérations génétiques [123, 187].

4.3 Choix des gènes candidats

L'accumulation des mutations au cours des cycles cellulaires et la capacité des cellules endommagées à échapper à l'apoptose et au système immunitaire ainsi qu'à d'autres facteurs favorisant la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Les mutations qui se produisent dans des gènes essentiels à la régulation du cycle cellulaire, à la mort cellulaire programmée et à la prolifération, contribuent à l'initiation de la carcinogenèse. Au fur et à mesure de cette transformation oncogénique, la cellule cancéreuse accumule de plus en plus de mutations qui aident à l'évolution du cancer et favorisent l'hétérogénéité tumorale. Les mutations acquises après l'exposition des cellules cancéreuses à la chimiothérapie sont soit la cause de la récurrence de la maladie et de

son évolution soit la conséquence des dommages causés par les agents chimiothérapeutiques. Ainsi, nous assumons que les mutations présentes dans toutes les lignées cellulaires de nos 3 patientes sont possiblement impliquées dans l'initiation du CEO et que les mutations qui se trouvent dans les lignées établies après la récurrence pourraient contribuer à la progression et l'évolution du CEO.

Le choix des gènes mutés s'est basé sur deux critères : leur profil de mutations et leur relation avec le cancer. De l'analyse par l'algorithme A, *PLEC1* et *SCRIB* ont été sélectionnés comme étant muté dans toutes les lignées cellulaires des patientes 1369 et 3133 (score = 6). Au moment de cette analyse, les résultats de séquençage des ADNc des lignées de la patiente 2295 n'étaient pas disponibles. De même, *IKBKB* a été choisi comme candidat muté dans deux des trois lignées établies après la récurrence. De l'analyse par l'algorithme B, *NCOR2* a été choisi comme gène présentant des mutations dans les neuf lignées cellulaires (score = 9) et *ITGAE*, *SEMA6C*, *GLCE* comme gènes mutés chacun dans deux des cinq lignées établies après la récurrence.

4.4 Sensibilité de chaque algorithme pour détecter les mutations

La validation de chacune des mutations a été effectuée par séquençage Sanger de l'ADNc et de l'ADNg des neuf lignées cellulaires. Cette stratégie permet d'abord de confirmer si la mutation est présente au niveau génomique et ARNomique. De plus, elle permet de vérifier si les mutations se trouvent dans les gènes des lignées qui sont rapportés par TSNG uniquement ou dans d'autres lignées non mentionnées par séquençage à haut débit.

En résumé, l'algorithme B a permis d'améliorer l'analyse des résultats de séquençage dans le cas de *SCRIB*, *IKBKB* et *SEMA6C* mais en même temps il a permis de prédire beaucoup de faux positifs comme dans le cas de *PLEC1*, *NCOR2*, *ITGAE* et *GLCE*. Aucun des deux algorithmes n'était meilleur ou plus sensible pour détecter les mutations. La combinaison des résultats de séquençage analysés par les deux algorithmes a été nécessaire pour choisir les gènes candidats.

Ces pourcentages montrent l'importance de l'étape de validation des mutations. Comme le séquençage Sanger est une technique qui consomme beaucoup plus de temps que le séquençage à haut débit, il est rendu nécessaire de trouver des méthodes de validation plus rapide. Ces derniers aident à prévenir les erreurs des algorithmes d'analyse d'un part et à éviter le séquençage Sanger et ses étapes d'autre part. Dans cette perspective, Life Technologies™ et Illumina Inc. ont développé indépendamment deux séquenceurs, Ion Proton™ Sequencer et MiSeq Personal

Sequencer, qui pourront être utilisés dans les laboratoires afin de faciliter le séquençage et la validation des mutations.

4.5 Analyse des données brutes, des mutations dans COSMIC et TCGA, de la structure protéique et des niveaux d'expression de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C*.

Pour étudier la nature, le type et la fonction des mutations, nous avons effectué plusieurs analyses bioinformatiques. Ces analyses nous ont permis de déterminer si ces mutations sont germinales ou somatiques et si elles affectent la structure protéique et l'expression des gènes. Ces analyses sont limitées aux gènes dont la mutation a été validée par séquençage Sanger. L'évaluation de la fréquence des mutations dans l'ADNg du sang des patientes 2295 et 3133, a montré que les mutations G>A de *PLEC1* et de *SEMA6C* pourraient être des mutations germinales ou des polymorphismes génétiques inconnus. Les mutations germinales sont impliquées dans l'initiation et la progression du cancer. La transmission d'une copie mutée d'un gène suppresseur de tumeur à la descendance prédispose l'individu au cancer. L'acquisition d'une mutation sur le deuxième allèle (mutation somatique) pourrait supprimer l'expression de ce gène. Le rôle de *PLEC1* comme suppresseur de tumeur n'est pas certain. L'étude de Ramakrishna montre que l'inhibition de l'expression de *PLEC1* par des siARNs entraîne une augmentation de la prolifération des lignées cellulaires ovariennes [142]. Cependant, d'autres études montrent une expression augmentée de *PLEC1* dans les tumeurs du pancréas de stade avancé et dans les ascites de l'ovaire [139-141]. Si *PLEC1* est un suppresseur de tumeur dans les cellules ovariennes, le fait qu'il présente une mutation germinale dans les cellules de la patiente 3133 pourrait avoir contribué au développement d'un cancer de l'ovaire suite à la mutation du deuxième allèle. Le rôle de *SEMA6C* dans le cancer en général n'est pas bien élucidé. Sa mutation dans nos lignées pourrait être une mutation passagère c'est-à-dire qu'elle n'initie pas la tumorigenèse et ne contribue pas à la progression de la maladie. La nature de la mutation de *SCRIB* n'a pu être déterminée car il est muté dans les lignées de la patiente 1369 dont les séquences d'ADNg du sang ne sont pas disponibles.

L'évaluation des fréquences des mutations identifiées par le séquençage TSNG (données brutes) a permis d'expliquer l'hétérozygotie allélique observée dans les chromatogrammes du séquençage Sanger. Cette hétérozygotie est due soit à la présence des deux allèles (sauvage et muté) soit à l'aneuploïdie des cellules tumorales qui présentent plusieurs copies de ce gène soit à la présence des cellules qui portent l'allèle sauvage et

d'autres qui portent l'allèle muté. En effet, nous avons remarqué que la hauteur des pics de chaque allèle concorde avec les pourcentages de mutations rapportés par les données brutes de séquençage TSNG.

Pour analyser si les mutations de nos 3 gènes candidats ont précédemment été détectées dans le tissu tumoral de l'ovaire, nous avons examiné la base de données COSMIC et la liste des gènes mutés publiée par le réseau de recherche *The Cancer Genome Atlas*. COSMIC regroupe l'ensemble des mutations rapportées par la littérature scientifique ainsi que celles identifiées par l'institut Sanger. Les mutations de nos 3 gènes sont présentes dans la base de données COSMIC, celles-ci sont les mêmes mutations mentionnées dans la liste de gènes du réseau de recherche TCGA. Cependant, ces positions de mutation ne sont pas les mêmes que celles identifiées par le séquençage à haut débit de nos lignées cellulaires. En effet, les mutations de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C* à différentes positions pourraient démontrer leur rôle important dans la carcinogenèse de l'ovaire.

Dans le but d'analyser les mutations de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C*, nous avons évalué l'impact de ces mutations sur la structure protéique et l'expression des gènes. Une mutation pourrait ou non avoir un effet sur la protéine, elle pourrait aboutir soit à une protéine tronquée ou plus longue (chimère) ou à l'absence totale de la protéine ou de sa fonction.

D'abord, nous avons déterminé l'effet de ces mutations sur la charge et la polarité. La plupart de ces mutations engendrent un changement de la charge et/ou de la polarité car l'acide aminé substitué possède des propriétés distinctes de l'acide aminé de référence. De plus, nous avons localisé ces mutations dans la structure de la protéine afin de déterminer le domaine protéique où elles se trouvent. La localisation de l'acide aminé muté dans les domaines protéiques nous permet d'évaluer l'effet que pourrait engendrer la mutation. Par exemple, la mutation P4468L de *PLEC1* est localisée dans le motif répété plectine 30. Le rôle des motifs répétés n'est pas bien élucidé mais quelques études ont démontré qu'ils sont des sites de liaison de *PLEC1* pour d'autres protéines structurales. De plus, plusieurs protéines d'adhésion cellulaires comme les envoplakines et les desmoplakines présentent ces motifs. Ainsi une mutation faux-sens dans ce domaine pourrait engendrer des changements aux interactions de *PLEC1*. Pour mieux comprendre les changements structuraux, nous avons utilisé le service Phyre qui permet de prédire la structure tridimensionnelle des domaines protéiques sauvages et mutés. Les données obtenues avec ce service correspondent à une modélisation ainsi les mutations que nous avons validées peuvent ou non affectées la structure tridimensionnelle de *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C*. Seuls les cristallographies du domaine répété Plectine 30 et des domaines Sema et PSI de *SEMA6C* étaient disponibles. La superposition de la conformation mutée à la conformation sauvage révèle une divergence du repliement de la protéine en amont ou en aval de la mutation. Pour *PLEC1*, dont la mutation P4468L est située dans le motif répété Plectine 30, la structure mutée montre une

déviations de l'angle de repliement d'un coude. Ce changement conformationnel pourrait avoir un effet sur la fonction de la protéine et sur ses interactions. De même, la superposition des domaines sauvages et mutés de SEMA6C montre plusieurs changements. Selon le service Phyre, la mutation G>A (R264C) située dans le domaine Sema produit une variation de l'angle de déviation d'un coude aux niveaux de la séquence TPVSEDRVPSRPGSCAGV et de la séquence NLHGRSA, une différence de la longueur de 2 feuillets beta et d'un coude, et un changement de la structure secondaire de la séquence AELGLDFQRFLTLNRT. Ces changements touchent plusieurs sous-domaines de Sema et sont situés soit en aval ou en amont de la mutation. Ils pourront ainsi modifier les interactions de SEMA6C avec d'autres protéines ou molécules, le domaine Sema étant impliqué dans les interactions protéine-protéine et ligand-protéine. La mutation R518Q de SEMA6C est située dans le domaine PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin) qui est un domaine responsable de la transduction des changements conformationnels. Dans les sémaphorines, le domaine PSI joue un rôle différent de son rôle dans les intégrines et les plexines. La mutation R518Q cause un enroulement précoce d'une hélice alpha et une rotation du plan de 2 feuillets beta. Ces modifications pourront avoir un effet sur la fonction du domaine PSI de SEMA6C.

L'analyse des données de la micropuce à ADNc a été effectuée dans le but d'évaluer l'effet de la mutation sur les niveaux d'expression de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C*. La comparaison des niveaux d'expression des 3 gènes dans les lignées mutées et celles non mutées, montre qu'il n'y a pas une relation entre le profil de mutation et les niveaux d'expression de ces gènes.

La mutation de *PLEC1*, de *SCRIB* ou de *SEMA6C* n'a jamais été rapportée dans les cellules du cancer de l'ovaire. Cependant, le rôle de ces protéines est important, ce qui fait que leur dérégulation pourrait contribuer à l'initiation et/ou à la progression du cancer de l'ovaire.

L'expression de *PLEC1* a été augmentée suite à l'exposition de la lignée de l'ovaire OV-90 aux ascites. De plus, le rôle de *PLEC1* dans l'invasion cellulaire a été confirmé. Ainsi, la mutation de *PLEC1* dans nos lignées cellulaires pourrait entraîner une dérégulation de l'expression du gène ou de fonction de sa protéine menant alors à une augmentation de la capacité invasive des cellules cancéreuses de l'ovaire.

La protéine Scribble (*SCRIB*) forme avec *NOS1AP* et *VANGL1* le complexe *SCRIB* qui maintient la polarité des cellules épithéliales. Ce complexe est souvent délocalisé et dérégulé dans le cancer colorectal et le cancer du sein. De plus, les souris déficientes en *SCRIB* développent des tumeurs de la prostate. De plus, *SCRIB* joue un rôle très important dans le contrôle de la prolifération, la migration, l'invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules de l'ovaire de la drosophile. Ainsi, une mutation de *SCRIB* qui rend la protéine non fonctionnelle pourrait probablement entraîner la tumorigenèse des cellules de l'ovaire humain.

Le rôle de SEMA6C dans le cancer est très peu connu. Elle est surtout impliquée dans les processus neuronaux. Cependant, SEMA6C est un récepteur qui interagit avec plusieurs protéines qui jouent un rôle essentiel dans la tumorigenèse comme les intégrines. La mutation de SEMA6C pourrait ne pas avoir un effet direct sur l'initiation et/ou la progression du cancer épithéliale de l'ovaire (mutation passagère).

Conclusions

Ce projet avait pour objectif de mieux comprendre l'initiation et la progression du cancer épithélial de l'ovaire. Pour ce faire, nous avons utilisé un nouveau modèle de lignées cellulaires établies à partir de la tumeur primaire, de la tumeur récurrente et des ascites de mêmes patientes. Ces lignées cellulaires ont été dérivées des tumeurs épithéliales de l'ovaire de stade III et de grade 3, qui représentent la forme la plus fréquente des cancers épithéliales de l'ovaire. La caractérisation génétique de ces lignées par la technologie de séquençage de nouvelle génération, nous a permis de générer une liste de gènes mutés dans l'ADNc de ces lignées. Les résultats de séquençage ont été filtrés pour des polymorphismes et pour des mutations germinales. Ensuite, les résultats ont été analysés par deux algorithmes probabilistes, soit l'algorithme A et B. Ces deux algorithmes se distinguent par leurs paramètres statistiques et peuvent ainsi interpréter les données de séquençage différemment. Nous avons d'abord analysé les résultats de séquençage pour sélectionner quelques gènes ayant une relation fonctionnelle avec le cancer et pouvant être impliqués dans l'initiation et/ou la progression du CEO. À partir des données de séquençage analysées par l'algorithme A, nous avons sélectionné *PLEC1*, *SCRIB* et *IKBKB*. À partir de l'algorithme B, nous avons choisi *NCOR2*, *ITGAE*, *SEMA6C*, *GLCE*. Nos 7 gènes candidats présentent une relation avérée avec le cancer. Afin de déterminer l'efficacité des deux algorithmes pour identifier les mutations, nous avons validé la présence de ces mutations dans l'ADNc et l'ADNg de chacune de nos lignées cellulaires par séquençage Sanger. Seules quelques mutations de *PLEC1* et de *SCRIB* ont été validées. Les mutations de *SEMA6C* ont été également retrouvées dans les lignées établies de la tumeur primaire. Afin de mieux caractériser les mutations validées, nous avons analysé les données bioinformatiques. Ces données comportent le séquençage de l'ADNg du sang des patientes, le séquençage brut de l'ADNc des lignées et les niveaux d'expression de l'ADNc de nos gènes. L'effet des mutations sur la structure protéique a révélé plusieurs changements de conformationnels de *PLEC1* et de *SEMA6C*.

Cette étude a permis de montrer l'importance de valider les résultats de séquençage de nouvelle génération. De plus, nous avons mis au point la technique de validation et cela va nous permettre de sélectionner des gènes dont la

mutation après l'exposition à la chimiothérapie pourrait contribuer à l'évolution, à la progression et à la récurrence de la maladie. Dans notre étude aucun des gènes sélectionnés et dont la mutation a été validée n'est muté que dans les lignées établies à partir de la tumeur récurrente. La caractérisation de l'effet des mutations de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C* nécessite une étude plus approfondie afin de déterminer le rôle fonctionnel des protéines mutées. Ainsi, il serait possible d'élucider le rôle de ces mutations dans la tumorigenèse de l'ovaire.

Perspectives

Nous avons validé la mutation de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C* dans nos lignées cellulaires. L'implication de *PLEC1* et de *SCRIB* dans plusieurs cancers a été démontrée dans quelques études, alors que peu est connu sur *SEMA6C*. Il serait intéressant de caractériser la fonction des protéines mutées que nous avons identifiées dans les lignées cellulaires de l'ovaire et de définir les conséquences potentielles de ces mutations. Afin de comprendre la fonction de ces protéines, des expériences de sauvetage avec la forme sauvage de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C* pourraient être réalisées dans nos lignées cellulaires. Ceci pourrait nous permettre de caractériser les changements qui surviennent comme les changements aux niveaux de la morphologie, de la prolifération, de la capacité de migration, de la capacité de former des structures en 3D (sphéroïdes), de la capacité de pousser indépendamment de l'ancrage et la réponse à la chimiothérapie.

De même, l'inhibition de l'expression de ces trois gènes par des siARNs pourrait nous donner une idée sur leur rôle dans la tumorigenèse. La caractérisation *in vitro* pourrait être complétée par une caractérisation *in vivo*, c'est-à-dire l'injection de nos lignées qui expriment ou non *PLEC1*, *SCRIB* et *SEMA6C* dans des souris SCID (immunodéficientes) afin d'évaluer la capacité de ces lignées à former des tumeurs.

De plus, il serait également intéressant d'exprimer les mutants de *PLEC1*, de *SCRIB* et de *SEMA6C* dans une lignée cellulaire de l'ovaire peu agressive comme la TOV81D. Ceci nous permettrait de voir s'il y a un changement de l'agressivité de cette lignée cellulaire et d'évaluer sa réponse à la chimiothérapie suite à l'induction de l'expression de ces gènes mutés.

Enfin, comme aucun des gènes que nous avons sélectionné n'est muté dans toutes les lignées cellulaires ou dans les lignées établies après la récurrence, nous espérons ré-analyser les données de séquençage à haut débit afin de choisir des gènes plus pertinents et dont la mutation répond mieux à nos critères de sélection.

CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Le Page C, P.D., Maugard CM, Ouellet V, Mes- and M. AM., *Signature of a silent killer: Expression profiling in epithelial ovarian cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2004. **4**: p. 157–167.
4. cancer, S.c.d., in *Statistiques canadiennes sur le cancer* 2011.
5. Colombo, N., et al., *Ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **60**(2): p. 159-79.
6. Salehi, F., et al., *Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008. **11**(3-4): p. 301-21.
7. Booth, M., V. Beral, and P. Smith, *Risk factors for ovarian cancer: a case-control study*. Br J Cancer, 1989. **60**(4): p. 592-8.
8. Zenzes, M.T., *Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(2): p. 122-31.
9. Faber, M.T., et al., *Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: a pooled analysis of 21 case-control studies*. Cancer Causes Control, 2013.
10. Chang, S. and H.A. Risch, *Perineal talc exposure and risk of ovarian carcinoma*. Cancer, 1997. **79**(12): p. 2396-401.
11. Donna, A., et al., *Triazine herbicides and ovarian epithelial neoplasms*. Scand J Work Environ Health, 1989. **15**(1): p. 47-53.
12. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* Lancet, 1971. **2**(7716): p. 163.
13. Choi, J.H., et al., *Gonadotropins and ovarian cancer*. Endocr Rev, 2007. **28**(4): p. 440-61.
14. Pennington, K.P. and E.M. Swisher, *Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects*. Gynecol Oncol, 2012. **124**(2): p. 347-53.
15. Vollebergh, M.A., J. Jonkers, and S.C. Linn, *Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 223-45.
16. Cherry, J.M., *Comparative study of molecular changes in ovarian tumor progression and the identification of biomarkers*. 2009.
17. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
18. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(3): p. 433-43.
19. Boyle, K.J. and S. Torrealday, *Benign gynecologic conditions*. Surg Clin North Am, 2008. **88**(2): p. 245-64, v.
20. Pejovic, T., et al., *Trisomy 12 is a consistent chromosomal aberration in benign ovarian tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 1990. **2**(1): p. 48-52.
21. Izutsu, T., et al., *Comparative cytogenetic studies of benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors*. J Obstet Gynaecol Res, 1996. **22**(6): p. 541-9.
22. Seidman, J.D., B.M. Ronnett, and R.J. Kurman, *Pathology of borderline (low malignant potential) ovarian tumours*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2002. **16**(4): p. 499-512.
23. Ouellet, V., et al., *Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4672-87.
24. Ouellet, V., et al., *Immunohistochemical profiling of benign, low malignant potential and low grade serous epithelial ovarian tumors*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 346.
25. Dietel, M. and S. Hauptmann, *Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology*. Virchows Arch, 2000. **436**(5): p. 403-12.
26. Soslow, R.A., *Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 161-74.

27. McCluggage, W.G., *Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis*. Pathology, 2011. **43**(5): p. 420-32.
28. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 255-88.
29. Bell, D.A., *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S19-32.
30. Katabuchi, H. and H. Okamura, *Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(2): p. 74-86.
31. Crum, C.P., et al., *Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer*. Clin Med Res, 2007. **5**(1): p. 35-44.
32. Crum, C.P., et al., *The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(1): p. 3-9.
33. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
34. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7273-9.
35. cancer, S.c.d., *signes et symptômes du cancer de l'ovaire*. Encyclopédie canadienne du cancer, 2012.
36. Aletti, G.D., et al., *Current management strategies for ovarian cancer*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(6): p. 751-70.
37. Buys, S.S., et al., *Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2295-303.
38. Bast, R.C., Jr., et al., *A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 1983. **309**(15): p. 883-7.
39. Woolas, R.P., et al., *Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(21): p. 1748-51.
40. Gogoi, R., S. Srinivasan, and D.A. Fishman, *Progress in biomarker discovery for diagnostic testing in epithelial ovarian cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2006. **6**(4): p. 627-37.
41. Benedet, J.L., et al., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. Int J Gynaecol Obstet, 2000. **70**(2): p. 209-62.
42. Klostergaard, J., K. Parga, and R.G. Raptis, *Current and future applications of magnetic resonance imaging (MRI) to breast and ovarian cancer patient management*. P R Health Sci J, 2010. **29**(3): p. 223-31.
43. Hennessy, B.T., R.L. Coleman, and M. Markman, *Ovarian cancer*. Lancet, 2009. **374**(9698): p. 1371-82.
44. Elit, L., et al., *Systematic review of adjuvant care for women with Stage I ovarian carcinoma*. Cancer, 2004. **101**(9): p. 1926-35.
45. Wheate, N.J., et al., *The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials*. Dalton Trans, 2010. **39**(35): p. 8113-27.
46. Berek, J.S., C. Trope, and I. Vergote, *Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer*. Ann Oncol, 1999. **10 Suppl 1**: p. 3-7.
47. Landrum, L.M., et al., *Intraperitoneal chemotherapy for patients with advanced epithelial ovarian cancer: a review of complications and completion rates*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(2): p. 342-7.
48. Hruby, G., et al., *WART revisited: the treatment of epithelial ovarian cancer by whole abdominal radiotherapy*. Australas Radiol, 1997. **41**(3): p. 276-80.
49. Hawkins, R.E., et al., *The prognostic significance of the half-life of serum CA 125 in patients responding to chemotherapy for epithelial ovarian carcinoma*. Br J Obstet Gynaecol, 1989. **96**(12): p. 1395-9.
50. Armstrong, D.K., *Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease*. Oncologist, 2002. **7 Suppl 5**: p. 20-8.

51. Funt, S.A. and H. Hricak, *Ovarian malignancies*. Top Magn Reson Imaging, 2003. **14**(4): p. 329-37.
52. Dicato, M., et al., *Multidrug resistance: molecular and clinical aspects*. Cytokines Cell Mol Ther, 1997. **3**(2): p. 91-9.
53. Chao, S.Y., et al., *An integrative approach to identifying cancer chemoresistance-associated pathways*. BMC Med Genomics, 2011. **4**: p. 23.
54. Bovicelli, A., G. D'Andrilli, and A. Giordano, *New players in ovarian cancer*. J Cell Physiol, 2011. **226**(10): p. 2500-4.
55. Sherman-Baust, C.A., et al., *Gene expression and pathway analysis of ovarian cancer cells selected for resistance to cisplatin, paclitaxel, or doxorubicin*. J Ovarian Res, 2011. **4**(1): p. 21.
56. Shahzad, M.M., G. Lopez-Berestein, and A.K. Sood, *Novel strategies for reversing platinum resistance*. Drug Resist Updat, 2009. **12**(6): p. 148-52.
57. Network, C.T.R. 2012; Available from: <http://www.ctrnet.ca/glossary/lang:fr>.
58. Lounis, H., et al., *Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies*. Exp Cell Res, 1994. **215**(2): p. 303-9.
59. Provencher, D.M., et al., *Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000. **36**(6): p. 357-61.
60. Tonin, P.N., et al., *Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model*. Oncogene, 2001. **20**(45): p. 6617-26.
61. Simone, N.L., et al., *Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics*. Mol Diagn, 2000. **5**(4): p. 301-7.
62. Zietarska, M., et al., *Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC)*. Mol Carcinog, 2007. **46**(10): p. 872-85.
63. Ouellet, V., et al., *Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 152.
64. Boveri, T., *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumouren*, 1914, Gustav Fischer.
65. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
66. Rudkin, C.T., D.A. Hungerford, and P.C. Nowell, *DNA CONTENTS OF CHROMOSOME PHI AND CHROMOSOME 21 IN HUMAN CHRONIC GRANULOCYtic LEUKEMIA*. Science, 1964. **144**(3623): p. 1229-31.
67. Bell, D.W., *Our changing view of the genomic landscape of cancer*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 231-43.
68. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
69. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
70. International Human Genome Sequencing, C., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
71. N.H.R.I, N.C.I. *The Cancer Genome Atlas*. Available from: <http://cancergenome.nih.gov/>.
72. Aguilera, A. and B. Gomez-Gonzalez, *Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(3): p. 204-17.
73. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
74. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
75. Thompson, S.L. and D.A. Compton, *Chromosomes and cancer cells*. Chromosome Res, 2011. **19**(3): p. 433-44.
76. Vaish, M. and B. Mittal, *DNA mismatch repair, microsatellite instability and cancer*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(9): p. 989-94.

77. Yamada, K., N. Takagi, and A.A. Sandberg, *Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. II. Karyotypes of human solid tumors*. Cancer, 1966. **19**(12): p. 1879-90.
78. Martin, S.A., et al., *Genomic instability and the selection of treatments for cancer*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 281-9.
79. Thompson, S.L. and D.A. Compton, *Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells*. J Cell Biol, 2008. **180**(4): p. 665-72.
80. Anthony JF Griffiths, W.M.G., Jeffrey H Miller, and Richard C Lewontin., *Modern Genetic Analysis*. 1999, New York: W. H. Freeman.
81. Savage, J.R.K. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 1999.
82. Madan, K., *Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(4): p. 947-63.
83. Ferry, J.A., *Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis*. Oncologist, 2006. **11**(4): p. 375-83.
84. Evans, H.J., *Cytogenetics of heritability in cancer*. IARC Sci Publ, 1982(39): p. 35-56.
85. Anton, E., et al., *Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10)*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1345-51.
86. Wicker, T., et al., *A unified classification system for eukaryotic transposable elements*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(12): p. 973-82.
87. Sankoff, D., *Rearrangements and chromosomal evolution*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(6): p. 583-7.
88. Ramel, C., *Mini- and microsatellites*. Environ Health Perspect, 1997. **105 Suppl 4**: p. 781-9.
89. Phelan, C.M., et al., *Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 309-11.
90. Murphy, M.A. and N. Wentzensen, *Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: A systematic review*. Int J Cancer, 2010.
91. Cooper, D.N., et al., *Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics*. Hum Mutat, 2010. **31**(6): p. 631-55.
92. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
93. Knudson, A.G., Jr., et al., *Chromosomal deletion and retinoblastoma*. N Engl J Med, 1976. **295**(20): p. 1120-3.
94. Knudson, A.G., *Chasing the cancer demon*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 1-19.
95. Cavenee, W.K., et al., *Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma*. Nature, 1983. **305**(5937): p. 779-84.
96. Hanby, A.M., et al., *Association between loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 and morphological attributes of sporadic breast cancer*. Int J Cancer, 2000. **88**(2): p. 204-8.
97. Foster, K.A., et al., *Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3622-5.
98. Takahashi, H., et al., *Mutations of the BRCA2 gene in ovarian carcinomas*. Cancer Res, 1996. **56**(12): p. 2738-41.
99. Singer, G., et al., *Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1223-8.
100. O'Neill, C.J., et al., *An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(8): p. 1034-41.
101. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. **42**(7): p. 918-31.

102. Wiegand KC, S.S., Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK,, et al., *ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas*. The new england journal of medicine, 2010. **363**.
103. Campbell, I.G., et al., *Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7678-81.
104. Catasus, L., et al., *Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas*. Hum Pathol, 2004. **35**(11): p. 1360-8.
105. Obata, K., et al., *Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors*. Cancer Res, 1998. **58**(10): p. 2095-7.
106. Cho, K.R. and M. Shih Ie, *Ovarian cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 287-313.
107. Ichikawa, Y., et al., *Mutation of K-ras protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors*. Cancer Res, 1994. **54**(1): p. 33-5.
108. Nakayama, K., et al., *Amplicon profiles in ovarian serous carcinomas*. Int J Cancer, 2007. **120**(12): p. 2613-7.
109. Wu, R., et al., *Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways*. Cancer Cell, 2007. **11**(4): p. 321-33.
110. Shen, Z., *Genomic instability and cancer: an introduction*. J Mol Cell Biol, 2011. **3**(1): p. 1-3.
111. Fang, X. and P. Zhang, *Aneuploidy and tumorigenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(6): p. 595-601.
112. Bates, S.E., *Classical cytogenetics: karyotyping techniques*. Methods Mol Biol, 2011. **767**: p. 177-90.
113. Schrock, E., et al., *Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes*. Science, 1996. **273**(5274): p. 494-7.
114. O'Connor, C., *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Nature Education 1(1), 2008.
115. Visakorpi, T., et al., *Sensitive detection of chromosome copy number aberrations in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization*. Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 624-30.
116. Weier, H.U., et al., *FISH in cancer diagnosis and prognostication: from cause to course of disease*. Expert Rev Mol Diagn, 2002. **2**(2): p. 109-19.
117. Heller, D. *A Review and Applications of Flow Cytometry*. 2004.
118. Fulwyler, M., *Mack Fulwyler in his own words. Interview by J. Paul Robinson and Ramunas A. Kondratas*. Cytometry A, 2005. **67**(2): p. 61-7.
119. Shinawi, M. and S.W. Cheung, *The array CGH and its clinical applications*. Drug Discov Today, 2008. **13**(17-18): p. 760-70.
120. Davies, J.J., I.M. Wilson, and W.L. Lam, *Array CGH technologies and their applications to cancer genomes*. Chromosome Res, 2005. **13**(3): p. 237-48.
121. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
122. Franca, L.T., E. Carrilho, and T.B. Kist, *A review of DNA sequencing techniques*. Q Rev Biophys, 2002. **35**(2): p. 169-200.
123. Shuen, A. and W.D. Foulkes, *Clinical implications of next-generation sequencing for cancer medicine*. Curr Oncol, 2010. **17**(5): p. 39-42.
124. Marguerat, S., B.T. Wilhelm, and J. Bahler, *Next-generation sequencing: applications beyond genomes*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 1091-6.
125. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-80.
126. Shendure, J., et al., *Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1728-32.

127. Aparicio, S.A. and D.G. Huntsman, *Does massively parallel DNA resequencing signify the end of histopathology as we know it?* J Pathol, 2010. **220**(2): p. 307-15.
128. Mardis, E.R., *Cancer genomics identifies determinants of tumor biology.* Genome Biol, 2010. **11**(5): p. 211.
129. Pareek, C.S., R. Smoczynski, and A. Tretyn, *Sequencing technologies and genome sequencing.* J Appl Genet, 2011. **52**(4): p. 413-35.
130. Shah, S.P., et al., *Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution.* Nature, 2009. **461**(7265): p. 809-13.
131. Sjoblom, T., et al., *The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers.* Science, 2006. **314**(5797): p. 268-74.
132. Wood, L.D., et al., *The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.* Science, 2007. **318**(5853): p. 1108-13.
133. Shah, S.P., et al., *Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary.* N Engl J Med, 2009. **360**(26): p. 2719-29.
134. Kelley, L.A. and M.J. Sternberg, *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.* Nat Protoc, 2009. **4**(3): p. 363-71.
135. Wang, L.-L., *Caractérisation de nouvelles lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du cancer épithélial de l'ovaire,* in Faculté de médecine 2011, Université de Montréal.
136. Letourneau, I., et al., *Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer.* BMC Cancer, 2012. **12**(1): p. 379.
137. Le Page, C., et al., *BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis.* J Ovarian Res, 2009. **2**: p. 4.
138. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma.* Nature, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
139. Bausch, D., et al., *Plectin-1 is a biomarker of malignant pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms.* J Gastrointest Surg, 2009. **13**(11): p. 1948-54; discussion 1954.
140. Bausch, D., et al., *Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(2): p. 302-9.
141. Puiffe, M.-L., et al., *Characterization of Ovarian Cancer Ascites on Cell Invasion, Proliferation, Spheroid Formation, and Gene Expression in an <I>In Vitro</I> Model of Epithelial Ovarian Cancer.* Neoplasia, 2007. **9**(10): p. 820-829.
142. Ramakrishna, M., *Identification of novel growth promoters of ovarian cancer,* in Peter MacCallum Cancer Centre and Department of Pathology 2011, The University of Melbourne.
143. Zhan, L., et al., *Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma.* Cell, 2008. **135**(5): p. 865-78.
144. Anastas, J.N., et al., *A protein complex of SCRIB, NOSIAP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression.* Oncogene, 2011.
145. Vaira, V., et al., *Aberrant overexpression of the cell polarity module scribble in human cancer.* Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2478-83.
146. Fletcher, G.C., et al., *Positive Feedback and Mutual Antagonism Combine to Polarize Crumbs in the Drosophila Follicle Cell Epithelium.* Curr Biol, 2012.
147. Huang, J.H., et al., *Expression of Drosophila neoplastic tumor suppressor genes discs-large, scribble, and lethal giant larvae in the mammalian ovary.* Gene Expr Patterns, 2003. **3**(1): p. 3-11.
148. Zhao, M., et al., *Basolateral junctions utilize warts signaling to control epithelial-mesenchymal transition and proliferation crucial for migration and invasion of Drosophila ovarian epithelial cells.* Genetics, 2008. **178**(4): p. 1947-71.

149. Jepsen, K., et al., *SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron*. Nature, 2007. **450**(7168): p. 415-9.
150. Perissi, V. and M.G. Rosenfeld, *Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(7): p. 542-54.
151. Shou, J., et al., *Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(12): p. 926-35.
152. Geradts J., S.R., Groth J., Desouki M. M., Burchette J. L., Liao S., *Downregulation of the Novel Candidate Tumor Suppressor Gene NCOR2/SMRT in Human Breast Cancer Progression*. Cancer Research 2009. **69** (24): p. 696S-696S.
153. Ghoshal, P., et al., *Loss of the SMRT/NCoR2 corepressor correlates with JAG2 overexpression in multiple myeloma*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4380-7.
154. Green, A.R., et al., *The prognostic significance of steroid receptor co-regulators in breast cancer: co-repressor NCOR2/SMRT is an independent indicator of poor outcome*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **110**(3): p. 427-37.
155. van Agthoven, T., et al., *CITED2 and NCOR2 in anti-oestrogen resistance and progression of breast cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(11): p. 1824-32.
156. Havrilesky, L.J., et al., *Relationship between expression of coactivators and corepressors of hormone receptors and resistance of ovarian cancers to growth regulation by steroid hormones*. J Soc Gynecol Investig, 2001. **8**(2): p. 104-13.
157. Hussein-Fikret, S. and P.J. Fuller, *Expression of nuclear receptor coregulators in ovarian stromal and epithelial tumours*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **229**(1-2): p. 149-60.
158. Lee, D.F. and M.C. Hung, *Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(18): p. 5656-62.
159. Hernandez, L., et al., *Activation of NF-kappaB signaling by inhibitor of NF-kappaB kinase beta increases aggressiveness of ovarian cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4005-14.
160. Yang, J., et al., *Conditional ablation of Ikkb inhibits melanoma tumor development in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2563-74.
161. Aydin, C., et al., *NF-kappaB targeting by way of IKK inhibition sensitizes lung cancer cells to adenovirus delivery of TRAIL*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 584.
162. Maeda, S., et al., *IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis*. Cell, 2005. **121**(7): p. 977-90.
163. Suh, J., et al., *Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells*. Prostate, 2002. **52**(3): p. 183-200.
164. Niculaita, R., *The Role of AKT1 And IKKβ in Ovarian Cancer Tumorigenesis and Chemotherapeutic Resistance*, in College of Arts and Sciences / School of Biomedical Sciences 2008, Kent State University.
165. Webb, J.R., et al., *Profound elevation of CD8+ T cells expressing the intraepithelial lymphocyte marker CD103 (alphaE/beta7 Integrin) in high-grade serous ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **118**(3): p. 228-36.
166. French, J.J., et al., *T cell adhesion and cytolysis of pancreatic cancer cells: a role for E-cadherin in immunotherapy?* Br J Cancer, 2002. **87**(9): p. 1034-41.
167. Helleman, J., et al., *Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(8): p. 1963-71.
168. Kikuchi, K., et al., *Cloning and characterization of a novel class VI semaphorin, semaphorin Y*. Mol Cell Neurosci, 1999. **13**(1): p. 9-23.
169. Patrick Nasarre, B.C., Harry A. Drabkin et Joëlle Roche, « *Sémaphorines et cancers : état des lieux* ». M/S : médecine sciences, 2005. **vol. 21**(n° 6-7): p. p. 641-647.

170. Laurence, D.S.B.A.B., *Sémaphorines et migrations cellulaires* Hématologie, 2001. **vol. 7**(no1): p. pp. 60-67
171. Katoh, M. and M. Katoh, *Comparative integromics on non-canonical WNT or planar cell polarity signaling molecules: transcriptional mechanism of PTK7 in colorectal cancer and that of SEMA6A in undifferentiated ES cells*. Int J Mol Med, 2007. **20**(3): p. 405-9.
172. G2SBC. Available from: <http://www.itb.cnr.it/breastcancer/php/geneReport.php?id=10500>.
173. Grigorieva, E.V., et al., *D-glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 74-82.
174. Grigorieva, E., et al., *Decreased expression of human D-glucuronyl C5-epimerase in breast cancer*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 1172-6.
175. Prudnikova, T.Y., et al., *Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells*. Cancer Cell Int, 2010. **10**: p. 27.
176. <http://string-db.org/>. Available from: http://smart.embl.de/smart/show_motifs.pl?GENOMIC=1&DO_PFAM=DO_PFAM&INCLUDE_SIGNAL_P=INCLUDE_SIGNALP&ID=9606.ENSFP00000323856.
177. Reipert, S., et al., *Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle*. Exp Cell Res, 1999. **252**(2): p. 479-91.
178. Karashima, T., et al., *Interaction of plectin and intermediate filaments*. J Dermatol Sci, 2012. **66**(1): p. 44-50.
179. Favre, B., et al., *Plectin interacts with the rod domain of type III intermediate filament proteins desmin and vimentin*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(5): p. 390-400.
180. Gherardi, E., et al., *The sema domain*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(6): p. 669-78.
181. Mould, A.P., et al., *Evidence that monoclonal antibodies directed against the integrin beta subunit plexin/semaphorin/integrin domain stimulate function by inducing receptor extension*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4238-46.
182. Ma, P.C., et al., *c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6272-81.
183. Jagadeeswaran, R., et al., *Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 352-61.
184. Cooke, S.L., et al., *Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma*. Oncogene, 2010. **29**(35): p. 4905-13.
185. Létourneau I., Q.M., Wang L., Portelance L., Caceres K., Cyr L., Delvoye N., Meunier L., de Ladurantaye M., Shen Z., L Arcand S., Tonin P., Provencher D., Mes-Masson A-M., *Modeling tumor progression in serous ovarian cancer through the derivation of matched cell lines from primary and recurrent disease*. . in press.
186. Goya, R., et al., *SNVMix: predicting single nucleotide variants from next-generation sequencing of tumors*. Bioinformatics, 2010. **26**(6): p. 730-6.
187. Ding, L., et al., *Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 999-1005.

CHAPITRE 6: ANNEXE

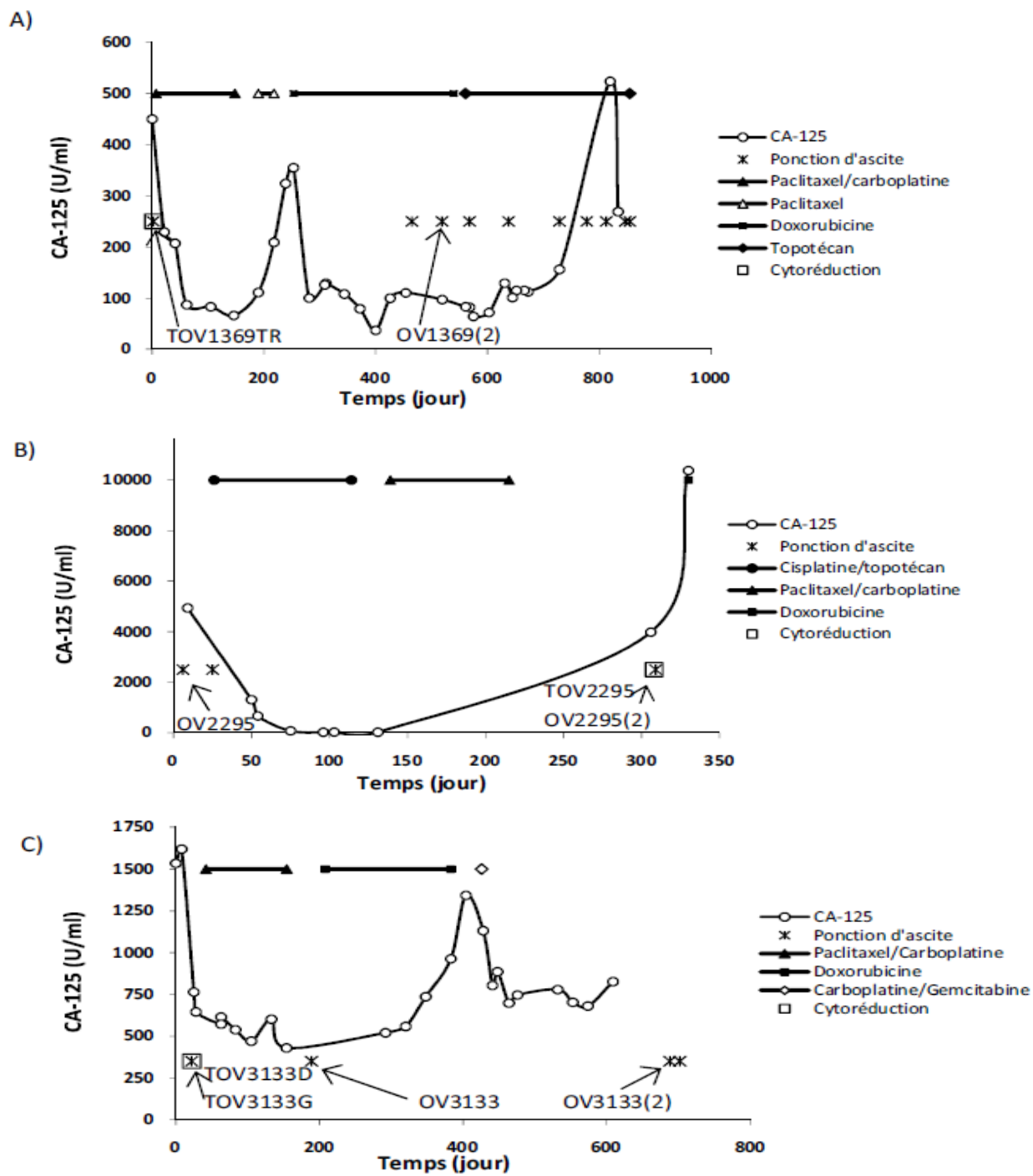


Figure supplémentaire 1 : Variation du taux de CA125 au cours du traitement des patientes 1369 (A), 2295 (B), et 3133 (C) et moment clinique du prélèvement de tissus mis en culture (modifiée de [185])