

Université de Montréal

**Profil d'expression moléculaire des tumeurs épithéliales ovariennes à faible et haut potentiel de malignité**

par

Véronique Ouellet

Programme de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

Ph.D. en biologie moléculaire

Août, 2007



©Véronique Ouellet, 2007



## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

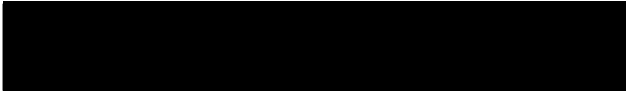
In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :  
**Profil d'expression moléculaire des tumeurs épithéliales ovariennes à faible et  
haut potentiel de malignité**

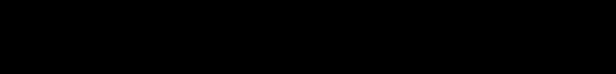
présentée par :  
Véronique Ouellet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

  
président-rapporteur

Dre Anne-Marie Mes-Masson  
directrice de recherche

Dre Diane M. Provencher  
co-directrice de recherche

  
membre du jury

  
examinateur externe

  
représentant du doyen de la Faculté de Médecine



## RÉSUMÉ

Le cancer épithélial de l'ovaire (EOC) est le sixième cancer en importance chez la femme au Canada et représente le cinquième cancer le plus meurtrier. Les tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire se subdivisent en deux classes soit les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP) et les tumeurs invasives (TOV). Les LMP représentent 20% des tumeurs malignes et se distinguent des TOV par leur indolence clinique et leur incapacité d'invasion. De ce fait, plus de 90% des patientes atteintes de LMP survivent plus de cinq ans suite à leur diagnostic en comparaison avec un faible 30% pour celles souffrant de TOV. Les tumeurs malignes sont également caractérisées par le grade tumoral (G0 à G3) qui précise le degré de différenciation des tumeurs, celles de G0 sont les LMP et le grade augmente de G1 à G3, selon la perte de différenciation de la TOV. La caractérisation moléculaire des LMP reste à être approfondie et la comparaison de leur profil moléculaire avec celui des TOV pourrait permettre l'identification de gènes reliés au diagnostic et au pronostic des patientes.

Le chapitre II de cette thèse de doctorat avait pour but d'identifier une signature moléculaire propre aux LMP et aux TOV. Par des analyses de micropuces à ADN, trois algorithmes statistiques ont servi à l'identification de gènes distinctifs permettant la classification adéquate de données originales et publiées. Aussi, la validation de l'expression différentielle de certains candidats a été effectuée par PCR quantitatif.

Dans les chapitres subséquents (Chapitre III, IV et V), nous nous sommes attardés à la découverte de candidats, marqueurs du diagnostic ou du pronostic des patientes visant l'amélioration éventuelle de la prise en charge des patientes. Deux approches ont été utilisées pour la sélection des candidats, la première (Chapitre III) effectuée selon une base individuelle où les candidats présentaient une fonction biologique intéressante et la seconde approche (Chapitre IV et V) consistait à une sélection des gènes candidats selon leur implication dans des complexes ou des voies de

signalisation. Par ces deux approches, plusieurs candidats ont montré une expression différentielle entre les grades tumoraux (Ran, Cdc20, Cks1, Ccne1, Ahr, Met, Mek1, Paep, Cas, Trail, Dr4, Dr5, DcR1, Flip, Casp8, Cyc, Set, Nm23, Pp32, Ape1 et Hmgb2). De plus, parmi les quatre candidats associés au pronostic des patientes (Ran, Cdc20, Cks1 et Dr5), Ran s'est avéré être le plus prometteur pour une transition en tant que marqueur clinique de l'EOC puisqu'il présentait la meilleure combinaison de sensibilité et de spécificité, mais permettait également la distinction des patientes de bon et mauvais pronostic à l'intérieur d'un même grade tumoral.

Finalement, les résultats encourageants obtenus pour les candidats Ran, Cdc20 et Cks1 nous incitent à étudier, de façon plus approfondie, leur implication dans l'EOC. Nos perspectives de recherches seront donc dirigées vers l'évaluation du rôle de ces candidats dans la tumorigenèse ovarienne suite à la suppression de leur expression, de même qu'à la détermination de leur potentiel en tant que cible thérapeutique pour le traitement de l'EOC.

### **Mots clés**

Cancer épithélial ovarien

Tumeurs à faible potentiel de malignité (borderline) et invasives

Profil d'expression génique

Marqueur de différenciation tumorale

Marqueur pronostique

## SUMMARY

In women, ovarian cancer is the sixth most frequently diagnosed cancer and represents the fifth leading cause of deaths related to cancer in Canada. Malignant epithelial ovarian tumors are subdivided into two major types of tumors: the low malignant potential or borderline (LMP) and the invasive (TOV) tumors. LMP tumors represent 20% of epithelial ovarian cancers (EOCs) and these tumors are distinguished from TOVs by their clinical indolence and their non-invasiveness. More than 90% of LMP patients are alive five years after diagnosis compared to the 30% associated with TOVs. Tumor grade represents the degree of differentiation, with LMPs (G0) being highly differentiated while TOVs are classified as well (G1), moderately (G2) or poorly (G3) differentiated. Defining the molecular relationship between ovarian LMPs and TOVs may provide insights into the molecular pathways that impact negatively on prognosis as well as providing molecular markers to better define these EOCs.

In the chapter II of this thesis, we present the molecular profiling of LMPs and TOVs defined using a microarray approach. By different statistical algorithms, genes specific to LMPs and TOVs that allowed proper re-classification of in-house and published datasets were defined. Validation of expression of selected candidates was also performed.

In the following chapters (Chapter III, IV and V), we extended the analysis to address the protein expression of a limited number of candidates identified, in order to define their usefulness as diagnostic and prognostic markers of EOC. To this end, two approaches were used to select candidate genes. Initially (Chapter III), candidates were selected on an individual basis and focused on genes with relevant biological function and subsequently (Chapters IV and V), a global overview of genes and selection of candidates based on their implication in common complexes or cell signaling pathways was employed. Using these two approaches, several candidate genes were shown to be differentially expressed according to tumor grade (Ran,

Cdc20, Cks1, Ccne1, Ahr, Met, Mek1, Paep, Cas, Trail, Dr4, Dr5, DcR1, Flip, Casp8, Cyc, Set, Nm23, Pp32, Ape1 et Hmgb2). Furthermore, among the four candidates that showed an association with patient survival (Ran, Cdc20, Cks1 et Dr5), Ran was the one that showed the most promising results for its translation to a clinical use for EOC. Indeed, Ran showed the best combination of specificity and sensitivity and allowed the distinction between good and poor prognosis patients of the same tumor grade.

Finally, the promising results obtained for Ran, Cdc20 and Cks1 convinced us to pursue our investigation on their implication in EOC. Our research perspectives will be directed upon the evaluation of the role of these candidates in ovarian tumorigenesis by suppressing their expression in a cell line model system as well as the determination of their potential as therapeutic target for EOC patient treatment.

### **Keywords**

Epithelial ovarian cancer

Tumors of low malignant potential (borderline) and invasive tumors

Molecular profiling

Tumor differentiation markers

Prognosis markers

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Mots clés	ii
Summary	iii
Keywords	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xiii
Liste des sigles et des abréviations	xvi
Dédicace	xxi
Remerciements	xxii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 L'OVAIRE NORMAL	1
1.1.1 L'embryologie de l'ovaire	1
1.1.2 L'anatomie de l'ovaire	3
1.1.3 L'histologie de l'ovaire	5
1.1.4 La physiologie de l'ovaire	8
1.2 LE CANCER DE L'OVAIRE	10
1.2.1 Les trois types de tumeurs de l'ovaire	10
1.2.1.1 Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels	11
1.2.1.2 Les tumeurs germinales	12
1.2.1.3 Les tumeurs épithéliales	12
1.3 LE CANCER ÉPITHÉLIAL DE L'OVAIRE (EOC) ET SES ORIGINES	13
1.3.1 L'OSE et les kystes d'inclusion	13
1.3.2 Les autres origines possibles du développement de l'EOC	16

1.4	ÉTIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE AU DÉVELOPPEMENT DE L'EOC	17
1.4.1	Épidémiologie	17
1.4.2	Étiologie et facteurs de risque associés au développement de l'EOC	17
1.4.2.1	L'âge	17
1.4.2.2	L'alimentation et les habitudes de vie	18
1.4.2.3	Les facteurs environnementaux et l'inflammation	18
1.4.2.4	Les effets de l'ovulation	19
1.4.2.5	L'hypothèse de la gonadotropine	20
1.4.2.6	La ménopause et les hormones exogènes	21
1.4.2.7	L'hérédité et l'EOC	21
1.5	CLASSIFICATION DES TUMEURS DE L'OVAIRE SELON LA FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE GYNÉCOLOGIE ET D'OBSTÉTRIQUE	22
1.5.1	Les types histopathologiques de l'EOC	22
1.5.2	Les classes de tumeurs ovariennes	25
1.5.2.1	Les tumeurs bénignes (BOV)	25
1.5.2.2	Les tumeurs borderline ou à faible potentiel de malignité (LMP)	26
1.5.2.2.1	La caractérisation des LMP	26
1.5.2.2.2	Les implants péritonéaux associés aux LMP	28
1.5.2.2.3	Les carcinomes micropapillaires séreux (MPSC)	32
1.5.2.2.4	La progression des LMP	34
1.5.2.3	Les tumeurs invasives	35
1.5.3	Les grades de différenciation tumorale de l'EOC (G0 à G3)	36
1.5.4	Les stades de l'EOC (SI à SIV)	38
1.6	HYPOTHÈSE D'UN CONTINUUM DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'EOC	41

1.7	PRÉSENTATION CLINIQUE DE L'EOC	45
1.7.1	Les symptômes de l'EOC	45
1.7.2	Les techniques de dépistage de l'EOC	45
1.7.3	Les interventions thérapeutiques associées à l'EOC	47
1.7.3.1	La chirurgie	47
1.7.3.2	La chimiothérapie et la radiothérapie	49
1.7.3.3	Le suivi et la progression de l'EOC	51
1.7.3.4	Les interventions de seconde ligne	53
1.8	LES FACTEURS PRONOSTIQUES DE L'EOC	54
1.8.1	L'âge au diagnostic	54
1.8.2	La maladie résiduelle	54
1.8.3	Le grade de différenciation tumorale	55
1.8.4	Le stade de la maladie	55
1.8.5	Le type histopathologique	56
1.8.6	Le statut des gènes <i>BRCA</i>	56
1.9	DESCRIPTION DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE L'EOC	56
1.10	LES MODÈLES D'ÉTUDE DE L'EOC	60
1.11	OBJECTIFS DU PROJET DE DOCTORAT	63
1.11.1	Chapitre II : Le criblage moléculaire des tumeurs épithéliales de l'ovaire	64
1.11.2	Chapitres II, IV et V : Les analyses statistiques / bioinformatiques et validation des résultats de micropuces à ADN	66
1.11.3	Chapitres III, IV et V : Essais de marqueurs pronostiques et diagnostiques	68

CHAPITRE II	Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling <i>(Oncogene, vol 24(29): 4672-87, 2005)</i>	69
Résumé		70
Abstract		71
Introduction		72
Results		75
Discussion		80
Conclusion		85
Materials and Methods		86
Acknowledgement		92
References		93
Tables		101
Figures		104
CHAPITRE III	Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcomes in serous epithelial ovarian cancer <i>(Int J Cancer, vol 119(3) : 599-607, 2006)</i>	114
Résumé		115
Abstract		116
Introduction		117
Materials and Methods		119
Results		122
Discussion		125
Conclusion		128
Acknowledgement		130
References		131
Tables		137
Figures		139



CHAPITRE VI	DISCUSSION	201
6.1	LES COMPARAISONS ET LES MÉTA-ANALYSES DES DONNÉES D'EXPRESSION	201
6.1.1	Limitations rencontrées lors des méta-analyses	201
6.1.2	Comparaison des études LMP-TOV	203
6.1.3	Ontologie des gènes modulés entre les LMP et les TOV	210
6.2	L'UTILISATION SECONDAIRE DES RÉSULTATS DE MICROPUCES À ADN	211
6.2.1	Étude des marqueurs de différenciation tumorale	212
6.2.2	Étude des marqueurs pronostiques	214
6.3	LA PROLIFÉRATION ET LE CYCLE CELLULAIRE	217
6.3.1	Observations découlant des analyses de micropuces à ADN	217
6.3.2	Gènes candidats impliqués dans le cycle cellulaire	219
6.3.3	Perspectives fonctionnelles des marqueurs	223
6.3.3.1	La suppression de l'expression génique	223
6.3.3.2	Étude de Ran	224
6.3.3.3	Étude de Cdc20 et de Cks1	227
6.3.3.4	Perspectives futures des candidats dans le dépistage de l'EOC	230
6.4	CONCLUSION	233
CHAPITRE VII	BIBLIOGRAPHIE	235

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

Tableau 1.	Stadification du cancer épithélial de l’ovaire	40
------------	--	----

### CHAPITRE II

Table 1.	Model system and tumor descriptors of tested samples	101
----------	--	-----

Table 2.	Tumor tissues analysis common genes compared to previously reported result for EOC	102
----------	--	-----

Table 3.	Primary culture analysis common genes compared to previously reported result for EOC	103
----------	--	-----

### CHAPITRE III

Table 1.	Statistical analyses of candidate expression determined by immunohistochemistry and association to tumor grade	137
----------	--	-----

Table 2.	Specificity and sensitivity of the markers for diagnosis and prognosis	138
----------	--	-----

### CHAPITRE IV

Table 1.	Description of the serous tissue array	167
----------	--	-----

Table 2.	Set complex protein expressions determined by immunohistochemistry and association to tumor grade	168
----------	---	-----

Table 3.	Sex complex protein expressions determined by immunohistochemistry and association to disease staging	169
----------	---	-----

Table 4.	Survival and disease free interval analysis performed using Kaplan-Meier coupled to a log rank test	169
----------	---	-----

## CHAPITRE V

Table 1.	Description of the serous tissue array	194
Table 2.	Statistical analyses of candidate expression determined by immunohistochemistry and associated with tumor grade	195
Table 3.	Expression of apoptosis-related protein determined by immunohistochemistry and association with disease staging	196
Table 4.	Analysis of apoptosis monitored by staining intensity of cleaved capsase-3	197
Table 5.	Survival analysis performed using a Kaplan-Meier curve coupled to a log-rank test	197

## CHAPITRE VI

Tableau 2.	Éléments critiques identifiés dans les critères d'information minimale sur les micropuces à ADN	202
Tableau 3.	Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude effectuée par Warrenfeltz <i>et al.</i>	204
Tableau 4.	Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude effectuée par Meinhold-Heerlein <i>et al.</i>	205
Tableau 5.	Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude effectuée par Rhodes <i>et al.</i>	207
Tableau 6.	Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude effectuée par Gilks <i>et al.</i>	208
Tableau 7.	Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude effectuée par Bonome <i>et al.</i>	209
Tableau 8.	Joueurs impliqués dans la transition entre les phases G2 / M du cycle cellulaire modulés dans divers types de cancers	222

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

Figure 1.	Anatomie du système reproducteur féminin	4
Figure 2.	Histologie de l'ovaire normal humain	5
Figure 3.	Structure de l'ovaire normal montrant les divers stades de la maturation des follicules	7
Figure 4.	Régulation et sécrétion des hormones sexuelles femelles selon l'axe hypothalamo-hypophysaire	10
Figure 5.	Représentation des différents types cellulaires desquels dérivent les trois grandes classes de tumeurs ovariennes	11
Figure 6.	Coupes histologiques représentant l'épithélium de surface ovarien, une inclusion kystique et une invagination de l'OSE	13
Figure 7.	Coupe histologique d'une tumeur bénigne	25
Figure 8.	Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité	27
Figure 9.	Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité présentant de la microinvasion	28
Figure 10.	Coupes histologiques d'implants péritonéaux de type épithélial et desmoplasique associés aux tumeurs à faible potentiel de malignité	30
Figure 11.	Coupes histologiques d'implants péritonéaux de type non-invasif et invasif associés aux tumeurs à faible potentiel de malignité	31
Figure 12.	Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité présentant une architecture de carcinome micropapillaire séreux	33
Figure 13.	Coupe histologique d'une tumeur invasive	36
Figure 14.	Coupes histologiques présentant deux aspects considérés par le système de gradation universel adopté par la FIGO	37
Figure 15.	Représentation du patron de dissémination typique des cellules du cancer épithélial de l'ovaire	39
Figure 16.	Représentation schématique du modèle dualistique du développement du cancer épithélial de l'ovaire	44

## CHAPITRE II

- Figure 1. Gene expression profile of low (LMP) and high (TOV) malignancy potential tumors using class prediction methods applied to HuFL microarray datasets in the tumor tissue model system. 104
- Figure 2. Gene expression profile of low (LMP) and high (TOV) malignancy potential tumors using class prediction methods applied to HuFL microarray datasets in the primary culture model system. 106
- Figure 3. Common candidates identified by class prediction (see Figures 1d and 2d) to stratify LMPs and TOVs were used to retrieve the corresponding expression in the alternate model system. 108
- Figure 4. Prediction strength for the reclassification of the tumors included in the starting set. 110
- Figure 5. Validation of the candidate genes by RT-qPCR. 112
- Figure 6. Protein expression of the candidate genes assessed by immunohistochemistry. 113

## CHAPITRE III

- Figure 1. Expression of markers on epithelial ovarian tumors tissues of different grades varying from G0 to G3. 139
- Figure 2. Relation between Ran expression and cumulative survival of patients with EOC. 140
- Figure 3. Relation between Cdc20, Madh3 and Cks1 expression and cumulative survival of patients with EOC. 141

## CHAPITRE IV

- Figure 1. Expression of the SET complex proteins on epithelial ovarian tumor tissues of different grades varying from G0 to G3. 170
- Figure 2. Relation between combination of Set complex markers and cumulative survival of patients with EOC. 171

## CHAPITRE V

Figure 1.	Expression of apoptosis-related proteins in epithelial ovarian tumor tissues of different grades varying from grade 0 to grade 3.	198
Figure 2.	Expression of cleaved caspase-3 on epithelial ovarian tumor tissues.	199
Figure 3.	Relations between expression of the receptor Dr5 and the cumulative survival of patients with epithelial ovarian cancer.	200
Figure 4.	Relations between combinations of apoptosis-related proteins and the cumulative survival of patients with epithelial ovarian cancer.	201
Figure 5.	The relation between combinations of apoptosis-related proteins and the cumulative survival of patients with epithelial ovarian cancer.	202

## CHAPITRE VI

Figure 17.	Représentation d'un arbre décisionnel associé à une courbe de survie de Kaplan-Meier	217
Figure 18.	Représentation schématique des diverses phases du cycle cellulaire	220
Figure 19.	Représentation schématique des régulateurs du cycle cellulaire présentant une expression plus forte (rouge) ou plus faible (vert foncé) chez les TOV lorsque comparé aux LMP	221
Figure 20.	Réseau de Ran impliqué dans le transport nucléo-cytoplasmique	226
Figure 21.	Régulation et fonctions de l'APC/C	229

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
AMH	anti-mullerian hormone
ANOVA	analysis of variance
APC/C	anaphase promoting complex/cyclosome
APE1	apuric endonuclease 1
APOJ	apolipoprotein J
ARHI	ras homolog gene family I
ARN	acide ribonucléique
BOV	benign ovarian tumor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1
BRCA1	breast cancer 1 gene
BRCA2	breast cancer 2 gene
BUB1	homolog of <i>S. cerevisiae</i> budding uninhibited by benzimidazoles 1
CA125	ovarian carcinoma antigen ; mucine 16 : MUC16
CAS	cellular apoptosis susceptibility
CASP8	caspase 8
CDC20	homolog to <i>S. cerevisiae</i> cell division cycle 20
CDC25	cell division cycle 25
CDK1	cyclin dependant kinase 1
CDKN1A	cyclin-dependant kinase inhibitor 1A
CDKN2A	cyclin-dependant kinase inhibitor 2A
CCNE1	cycline E1
CCNB	cycline B
C-FMS	v-fms McDonough feline sarcoma viral oncogene homolog
CGH	comparative genomic hybridization
CKS1	cdc28 protein kinase 1

CM	centimètre
CT	computerized tomography
CXCL10	chemokine CXC motif ligand 10
CYC	cytochrome c
DAVID	database for annotation, visualization and integrated discovery
DCR1	decoy receptor 1
DCR2	decoy receptor 2
DR4	death receptor 4
DR5	death receptor 5
E1A	early region 1A
E2F	facteur de transcription E2F
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor; v-erb-b avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog : ERBB1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EOC	epithelial ovarian cancer
ERBB2	v-erb-b avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
EST	expressed sequence tag
ETS2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
FGF	fibroblast growth factor
FGF2	fibroblast growth factor 2
FIGO	fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FLIP	fllice inhibitory protein
FSH	follicle-stimulating hormone
G	tumor grade
GABP	GA-binding protein ; nuclear respiratory factor 2 : NRF2
GDP	guanine di-phosphate
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GO	gene ontology
GTP	guanine tri-phosphate



HBV	hepatitis B virus
HBX	HBV protein X
HC	hierarchical clustering
HGF	hepatocyte growth factor
HMG	high mobility group
HMGB2	high mobility group protein 2
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HOXA7	homeobox A7
HPCE	high-performance capillary electrophoresis
HPLC	high pressure liquid chromatography
HPV	human papilloma virus
ID4	inhibiteur de liaison à l'ADN 4
IGF2	insulin-like growth factor 2
IHC	immunohistochimie
IL1	interleukine 1
IL6	interleukine 6
IL18	interleukine 18
IRM	imagerie par résonance magnétique
JAK-STAT	voie Janus kinase et signal transducer and activator of transcription
KB	kilobase
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KLK	kallikréine
KRAS	v-ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRT	kératine
LH	luteinizing hormone
LH-RH	luteinizing hormone-releasing hormone
LMP	low malignant potential tumor ; borderline tumor
LOH	lost of heterozygosity
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEK1	MAPK/ERK kinase 1
MET	oncogene MET; hepatocyte growth factor receptor : HGFR

MIAME	minimal information about microarray experiment
MISIIR	Müllerian inhibiting substance type II receptor
MLH1	MutL <i>E. coli</i> homolog 1
MPSC	micropapillary serous carcinoma
MSH2	MutS <i>E. coli</i> homolog 2
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NK	natural killer
NM23	nonmetastatic protein 23
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5 group A member 1
OCCR	ovarian cancer cluster region
OMIM	online mendelian inheritance in man
OSE	ovarian surface epithelium
PAEP	progesterone-associated endometrial protein
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PET	positron emission tomography
PIK3	phosphoinositide 3-kinase adaptor protein 1
PMS1	postmeiotic segregation increased <i>S. cerevisiae</i> 1
PMS2	postmeiotic segregation increased <i>S. cerevisiae</i> 2
PP32	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family
PTEN	phosphate and tensin homolog
PTTG1	pituitary tumor-transforming gene 1
RAD50	homolog of <i>S.cerevisiae</i> RAD50
RAD51	homolog of <i>S.cerevisiae</i> RAD51
RAN	ras-related nuclear protein
RANBP1	ran binding protein 1
RANGAP	ran guanine activating protein
RANGEF	ran guanine exchange factor
RCC1	regulator of chromosome condensation
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
RHA	RNA helicase A

RISC	RNA-induced silencing complex
RB	Rétinoblastome
RT-qPCR	reverse transcription followed by quantitative real-time PCR
S	stade de la maladie
S2N	signal to noise
SAM	significant analysis of microarray
SET	set translocation associated with myeloid leukemia
ShRNA	short hairpin ribonucleotidic acid
SKY	spectral karyotyping
SLPI	secretory leukocyte protease inhibitor
SOM	self-organizing map
SOX9	<i>SRY</i> related HMG-box gene 9
SRY	sex-determining region Y
SV40	Simian vacuolating virus 40
TGF	transforming growth factor
TGFBR2	transforming growth factor-beta receptor type II
TOV	invasive ovarian tumor
TP53	tumor protein 53
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UBCH10	ubiquitin-conjugating enzyme 10
VEGF	vascular endothelial growth factor
WASF3	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3

- À toi Pierre, mon mari, mon amour

## REMERCIEMENTS

Il me serait impossible de débiter cette section sans remercier profondément mes deux directrices de recherche les Dres Anne-Marie Mes-Masson et Diane Provencher. Ces deux femmes, par leur énergie et leur détermination, ont permis la réalisation d'un projet de doctorat passionnant, avec lequel j'ai pu évoluer et acquérir une expérience de recherche enrichissante. Un grand merci pour vos encouragements et la confiance que vous avez eu en moi qui, petit à petit, m'ont aidé à prendre conscience de mes capacités. Merci pour votre patience envers mes mille et une questions, vos réponses ont su m'éclairer... ou piquer davantage ma curiosité.

Il m'aurait été impossible de mener à terme ce projet de doctorat avec dévouement et agrément si je n'avais pas été entourée de gens dynamiques et stimulants. J'aimerais saluer les membres de l'équipe ovaire, pour votre présence attachante et votre passage dans cet épisode de ma vie, je vous remercie Véronique Barrès, Julie Desgagnés, Ali Filali-Mouhim, Stéphanie Girard, Stéphanie Lepage, Manon de Ladurantaye, Jason Madore, Karine Normandin, Lise Portelance, Marie-Line Puiffe, Marise Roy, Vanessa Samouelian et Magdalena Zietarska. J'aimerais souligner la contribution inestimable du Dr Cécile Le Page dans l'accomplissement de mon projet de recherche. Merci Cécile de m'avoir guidée et montré la voie à suivre afin d'accomplir une recherche de façon efficace. Je suis reconnaissante également aux membres de l'équipe polyome et plus spécialement aux Drs Michela Bossolasco et Francis Rodier qui m'ont épaulée lors de mes premiers pas en recherche. J'aimerais également souligner l'apport de l'équipe de la prostate avec qui un partage des connaissances a été florissant. Un merci tout spécial au Dr Laurent Lessard qui a su trouver les mots appropriés pour m'aider à surmonter certaines épreuves et dont la bonne humeur contagieuse a su amener le soleil dans le laboratoire. J'aimerais également prendre quelques lignes pour faire un hommage tout particulier à Mme Louise Champoux qui a été présente à mes côtés tout au long de ces années. Tantôt assistante de recherche, tantôt psychologue, ministre des finances, cuisinière et/ou amie, tu as été pour moi un pilier très important dans l'accomplissement de mes travaux. Merci pour ta générosité

et ta disponibilité, mais également pour la révision minutieuse de ma thèse. Il me sera impossible d'oublier ce que tu as fait pour moi. J'ai également eu la chance d'avoir à mes côtés, des petites mains agiles et habiles en stage de recherche, Marie-Claude Guyot, Drs Marie-Hélène Dufresne-Beauchamps et Tak-Hay Ling. Merci à vous d'avoir permis l'avancement rapide de mes recherches. Je tiens également à exprimer ma gratitude envers les divers collaborateurs dont le savoir et les connaissances ont permis l'accomplissement de diverses parties de mon projet ou encore l'évolution de mon apprentissage technique (Dr Dimcho Bachvarov, Neal Cody, Dr Mario Fillion, Bing Ge, Dr Tom Hudson, Dr Christian Lussier, Dre Christine Maugard, Dr Jaroslav Novak, Dr Michael Quinn, Dre Claudine Rancourt, Dre Fengge Ren, Dre Patricia Tonin et Dr Gilles Tremblay).

Je désire également souligner la contribution des membres de mon comité de thèse, Dr Richard Bertrand, Dr Mario Chevrette, Dre Isabelle Royale ainsi que les étudiants et les membres du personnel qui m'ont côtoyée durant toutes ces années. Merci à vous chers membres de l'Institut du cancer, du Centre de recherche du CHUM, des départements de gynécologie, de pathologie et de chirurgie du CHUM ainsi que des Programmes de biologie moléculaire d'avoir fait en sorte que je sorte grandie de mon expérience acquise à vos côtés.

Tout au long de ces dernières années, je n'aurais pu subsister sans la contribution financière des divers organismes subventionnaires. Un grand merci à mes directrices de recherche, à l'Institut du cancer, à Canderel, aux Programmes de biologie moléculaire, au Centre de recherche du CHUM et aux Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour leur soutien et leur confiance.

Finalement, je désire terminer cette section en remerciant du fond du cœur, les membres de ma famille qui, sans comprendre à fond ce que je faisais, m'ont supportée depuis le début jusqu'à la fin de cette grande aventure qu'est le doctorat. Merci à vous pour vos encouragements et votre fierté à mon égard. Ils m'ont grandement stimulée à performer davantage. Et finalement, un grand merci à mon

époux, Pierre, qui a su m'encourager dans les moments de joies comme dans les périodes plus difficiles. Ta force, tes conseils, ton calme et ton amour ont fait en sorte que j'atteins présentement le but que je m'étais fixé, soit la complétion de mes études de doctorat.

**1.1 L'OVAIRE NORMAL**

D'un point de vue purement biologique, il semblerait que nous ne soyons sur terre que dans un seul et unique but, soit celui de propager notre matériel génétique et de contribuer ainsi à la survie de l'espèce humaine. Chez la femme, ce sont deux petites glandes paires, appelées ovaires qui assurent la production des gamètes femelles, nécessaires à la propagation de notre génome. Ils ont également comme fonction la sécrétion des hormones sexuelles nécessaires à la féminisation et à la reproduction. Au fil du temps, les cellules qui composent ces organes peuvent acquérir des modifications génétiques et épigénétiques conduisant au développement de tumeurs ovariennes tant bénignes que malignes. De par leur origine embryonnaire et leur composition histologique, les tumeurs de l'ovaire comptent parmi les plus complexes chez l'humain. L'intérêt principal de la présente thèse repose sur l'une de ces pathologies complexes, soit le cancer épithélial de l'ovaire, et traite plus particulièrement de la stratification de la malignité de ce cancer. Afin d'apprécier ultérieurement toute la complexité des tumeurs qui dérivent des cellules ovariennes, la première section de cette thèse sera consacrée à l'embryologie, l'anatomie et la physiologie des ovaires à partir de leur conception jusqu'à leur maturation complète.

**1.1.1 L'embryologie de l'ovaire**

Lors du développement des gonades, tant mâles que femelles, deux phases distinctes ont été identifiées. La première est caractérisée par la formation de la crête génitale où les gonades sont indifférenciées. À ce moment précis, elles ont donc la capacité de former l'un ou l'autre des organes reproducteurs mâle et femelle [1]. Leur destin de testicules ou d'ovaires se détermine par la suite, lors de la seconde phase, où l'expression et le bon fonctionnement du gène de détermination du sexe de la région Y (sex-determining region Y ; *SRY*) est primordial. *SRY* encode pour un facteur de transcription, membre de la famille des protéines de liaison à l'ADN à boîte de



groupement à haute mobilité (HMG-box) [2] qui agit en tant qu'activateur [3, 4] ou répresseur [5, 6] de l'expression génique (revu dans [1, 7]). Le produit de ce gène, encodé sur le chromosome Y, est requis pour déterminer le destin des gonades indifférenciées vers la formation des testicules. Si *Sry* n'est pas présent, ou si sa fonction est altérée, la différenciation des gonades s'effectue vers le développement des ovaires. Les mutations dans *SRY*, mais également dans les facteurs de transcriptions *SOX9* et *NR5A1*, expliquent la majeure partie des cas de troubles de différenciation sexuelle chez l'humain. Un des rôles de *Nr5a1* est de cibler directement l'expression de *SRY* [8, 9], qui à son tour, favorise l'expression de *SOX9* [10, 11] (revu dans [1, 7]).

Par leurs expériences, trois groupes de chercheurs ont pu montrer le processus de différenciation des gonades en ovaires chez l'humain [12, 13]. Leurs recherches montrent qu'environ quatre semaines après la conception, l'épithélium coelomique, qui tapisse l'intérieur de la cavité embryonnaire, se replie pour former les canaux de Müller (canaux müllériens), ancêtres de l'utérus, des trompes de Fallope et de la partie supérieure du vagin. Au même moment, les cellules germinales, précurseurs des gamètes, migrent à partir du sac vitellin pour aboutir dans la crête urogénitale. Suite à sa prolifération et sa stratification en crête génitale, l'épithélium coelomique fait saillie dans le coelome et donne la gonade indifférenciée. C'est à cette étape que les cellules germinales prennent le nom de gonocyte (ovocyte) et se multiplient [13, 14] (et revu dans [1, 15]). C'est au cours de cette phase que le produit du gène *SRY* intervient et son expression, par les cellules somatiques testiculaires Sertoli et Leydig, favorise la sécrétion d'un peptide (hormone anti-müllérienne; *Amh*) dont la fonction est d'inhiber le développement des canaux müllériens (revu dans [7, 16]). En son absence, la différenciation en gonades femelles s'effectue vers la huitième semaine post-conception et, à la dixième semaine, la gonade devient l'ovaire [17, 18]. À la douzième semaine, deux zones de l'ovaire se distinguent, soit la corticale (cortex) qui contient les gonocytes en prolifération (6-7 millions) et la médullaire (médulla) (section 1.1.3). Vers la seizième semaine de vie embryonnaire, les follicules primordiaux sont observés (section 1.1.4) et c'est durant cette période que le nombre

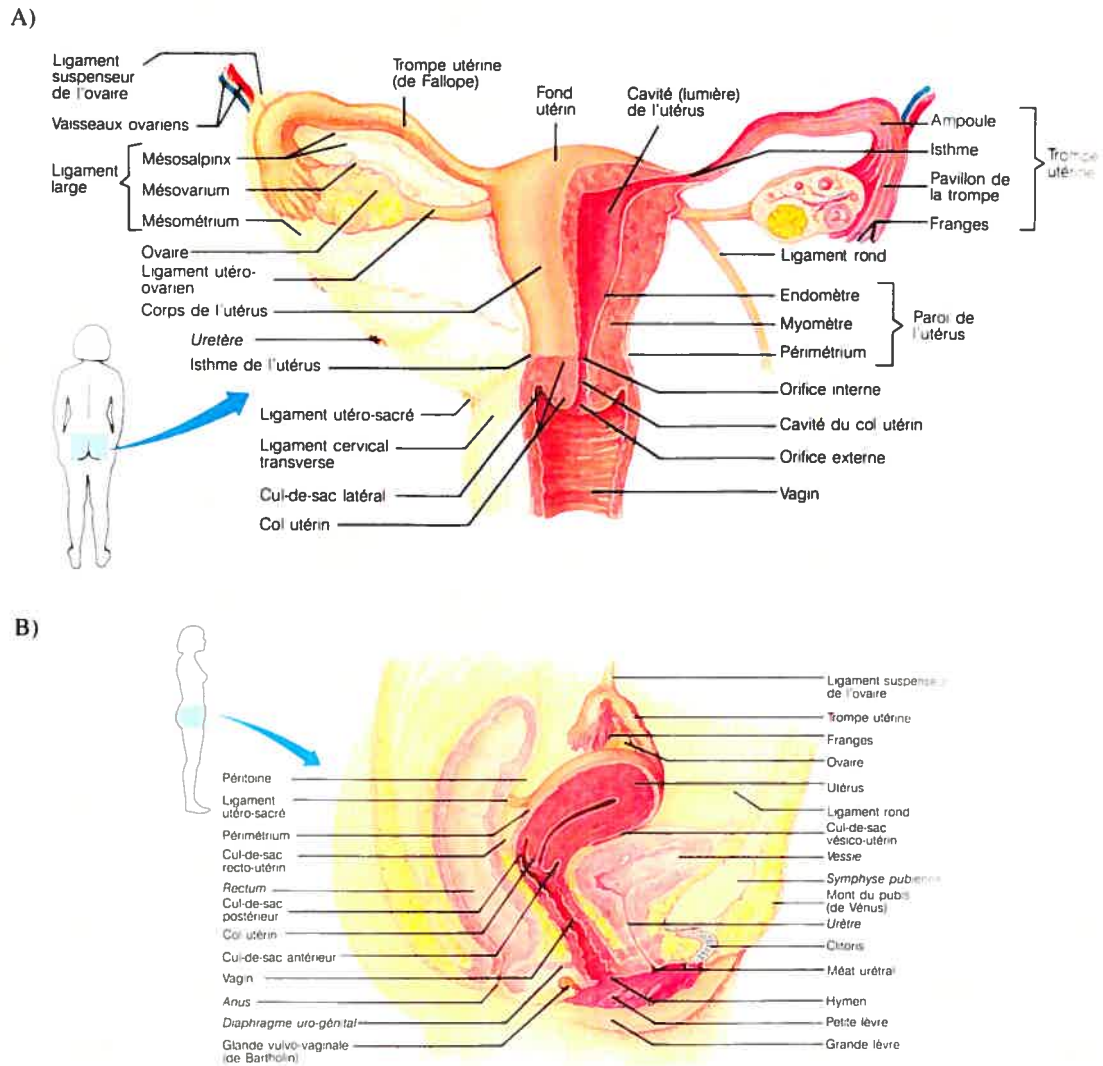
de gonocytes chute dramatiquement. La thèque interne et plus tard la thèque externe se forment, puis le mésenchyme, présent entre les follicules, devient le stroma cortical. C'est vers la trentième semaine de gestation qu'une chute drastique des ovocytes survient et seuls 300 000 d'entre eux sont présents à la naissance de la petite fille (revu dans [15]). Même après la naissance, les organes reproducteurs féminins et les organes sexuels secondaires subissent des modifications tissulaires et morphologiques pour atteindre leur maturation physiologique durant la puberté. C'est à ce moment qu'ils ont la capacité de produire et de sécréter des hormones sexuelles, en plus de libérer des gamètes afin d'assurer la survie de l'espèce. L'œstrogène, produit par l'ovaire, est requis pour la maturation et la croissance des organes reproducteurs féminins de même que pour la féminisation des organes sexuels secondaires (revu dans [15, 19, 20]). La période de périménopause s'accompagne de changements hormonaux importants et les fonctions reproductives des ovaires s'éteignent peu à peu. Finalement, l'arrêt complet des menstruations se produit généralement entre 45 et 55 ans et met fin à la vie reproductive de la femme qui devient alors ménopausée.

### **1.1.2 L'anatomie de l'ovaire**

Chez la femme adulte, l'ovaire a une structure ovoïde et aplatie comparable à celle d'une amande, dont la taille est d'environ trois à cinq centimètres et le poids de deux à quatre grammes (revu dans [14]). Son aspect macroscopique varie selon l'âge, le nombre de grossesses et le moment du cycle menstruel (revu dans [15]). Chez la femme ménopausée, les ovaires deviennent atrophiés et leur surface est lisse, tandis qu'elle est mamelonnée chez la femme encore sous l'influence du cycle menstruel.

Les ovaires sont localisés dans la cavité péritonéale et se trouvent de part et d'autre de l'utérus, accolés aux trompes de Fallope (Figure 1). Chaque ovaire est maintenu en place par le ligament tubo-ovarien qui le relie à l'utérus, le mésovarium qui le rattache à la paroi du bassin et le ligament lombo-ovarien qui suspend l'ovaire dans la cavité. Les artères ovariennes et utérines assurent un apport sanguin adéquat et les

ovaires sont drainés par un réseau veineux dense et complexe de même que par un riche réseau lymphatique (revu dans [15]).



**Figure 1 Anatomie du système reproducteur féminin (tirée de [21])**

**A) Vue dorsale**

**B) Vue sagittale**

### 1.1.3 L'histologie de l'ovaire

Au niveau microscopique, l'ovaire comporte trois zones distinctes. Sa surface est recouverte d'une couche de cellules épithéliales qui forme l'épithélium de surface ovarien (OSE), vient ensuite la zone périphérique ou corticale et enfin, la zone centrale ou médullaire (Figure 2).

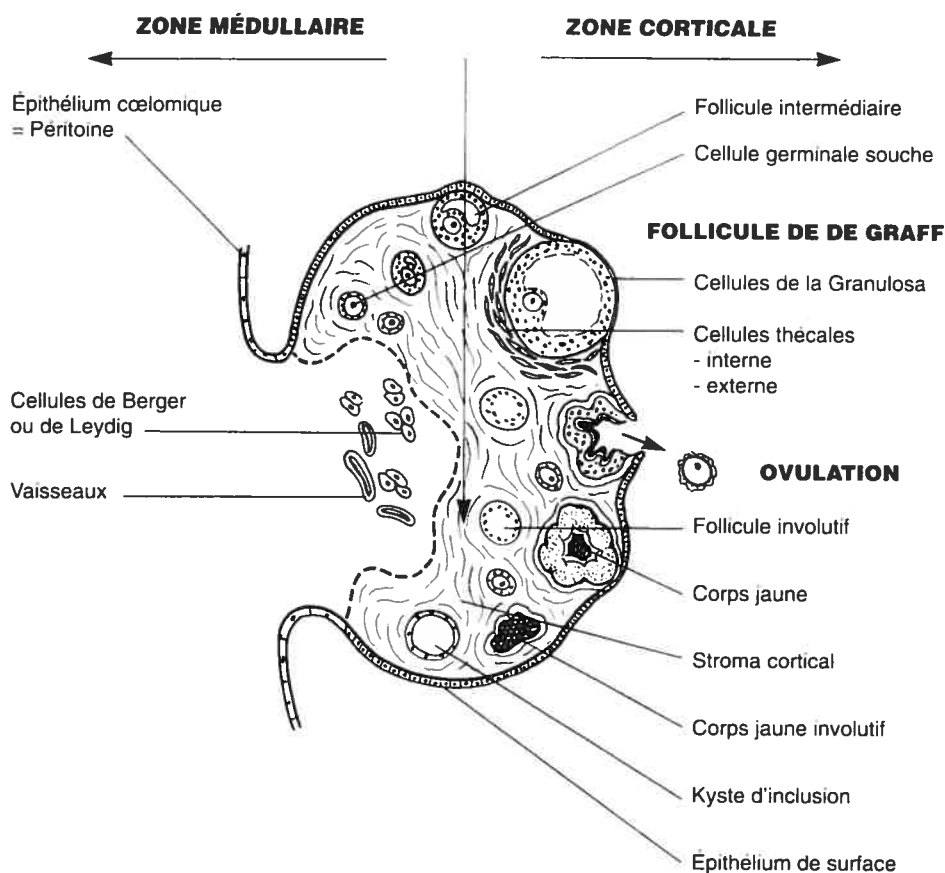
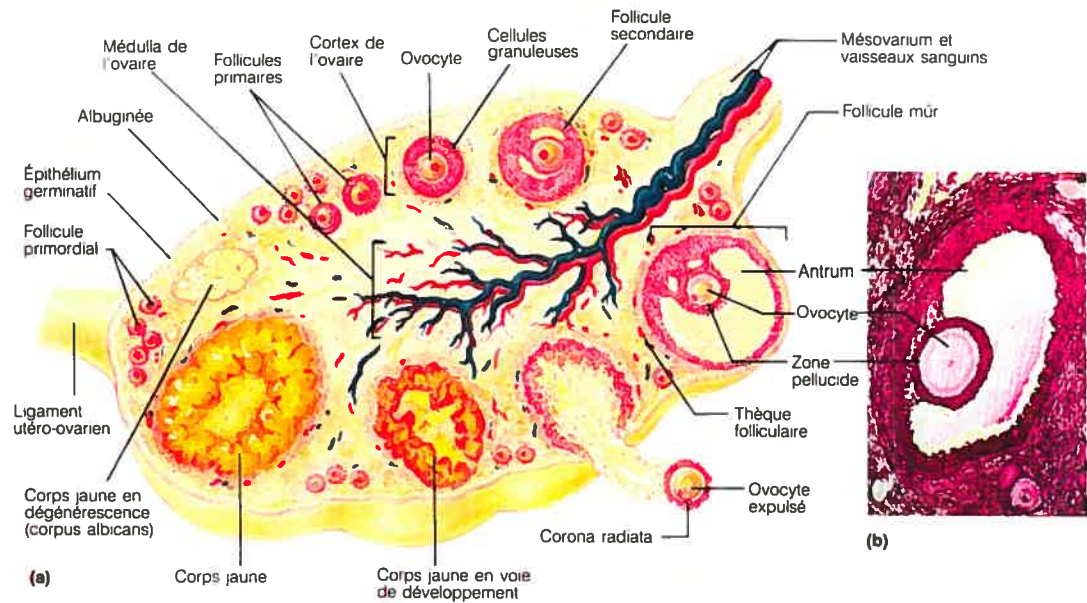


Figure 2 Histologie de l'ovaire normal humain (tirée de [15])

L'OSE dérive de l'épithélium coelomique et est formé d'une couche de cellules épithéliales cuboïdes, au noyau proéminent. Cet épithélium enrobe la surface externe de l'ovaire et n'y est attaché que très faiblement. Durant plusieurs années, l'OSE était appelé l'épithélium germinatif puisque les scientifiques croyaient, à tort, qu'il pouvait donner naissance aux cellules germinales [22]. L'OSE est caractérisé par la présence des kératines (Krt) des épithéliums simples soit les Krt 7, 8, 18 et 19. Les cellules de l'OSE sont tapissées à leur surface par des microvillosités ce qui suggère un transport actif d'ions et d'autres molécules entre l'ovaire et la cavité péritonéale adjacente (revu dans [15]). L'OSE est également impliqué dans la rupture et la réparation de la surface ovarienne qui surviennent à la suite de l'ovulation. Ces fonctions, qui évoluent au cours du cycle menstruel, sont généralement associées à la présence d'hormones auxquelles répondent les cellules de l'OSE puisque ces dernières en expriment les récepteurs (ex. œstrogène, progestérone et gonadotropine) [23, 24] (revu dans [25, 26]). L'OSE est séparé du stroma ovarien par la membrane basale, constituée de tissu conjonctif, qui sert de barrière partielle à la diffusion des molécules bio-actives entre l'OSE et le stroma. Certaines cellules de l'OSE se retrouvent également dans la zone corticale sous forme de glandes ou de kystes d'inclusion qui se sont probablement détachées du reste de l'épithélium au cours des modifications apportées durant le processus de réparation de la surface ovarienne suite à l'ovulation (voir aussi section 1.3.1).

Immédiatement sous l'OSE, se retrouve la tunique albuginée (capsule, sous la membrane basale) qui dérive du mésenchyme et qui consiste en une couche de tissu conjonctif dense et fibreux composé majoritairement de collagène (revu dans [14, 26]). C'est sous cette tunique de la zone corticale que se retrouve le stroma ovarien. Cette zone est parsemée d'organites ovariens (follicules) à divers stades d'évolution disposés dans le stroma ovarien. Les follicules sont composés de cellules germinales (ovocytes) entourées de cellules granuleuses (granulosa) et de cellules de la thèque interne qui seront décrits plus en détails dans la section sur la physiologie de l'ovaire (section 1.1.4).

La dernière zone de l'ovaire, la médulla, est composée d'un tissu conjonctif très vascularisé et se retrouve en continuité avec le mésovarium. La médulla est également parsemée de cellules de Berger, similaires aux cellules de Leydig présentes dans les testicules, qui sont spécialisées dans la sécrétion de l'androgène.



**Figure 3 Structure de l'ovaire normal montrant les divers stades de la maturation des follicules (tirée de [21])**

**A) Représentation graphique de l'ovaire normal**

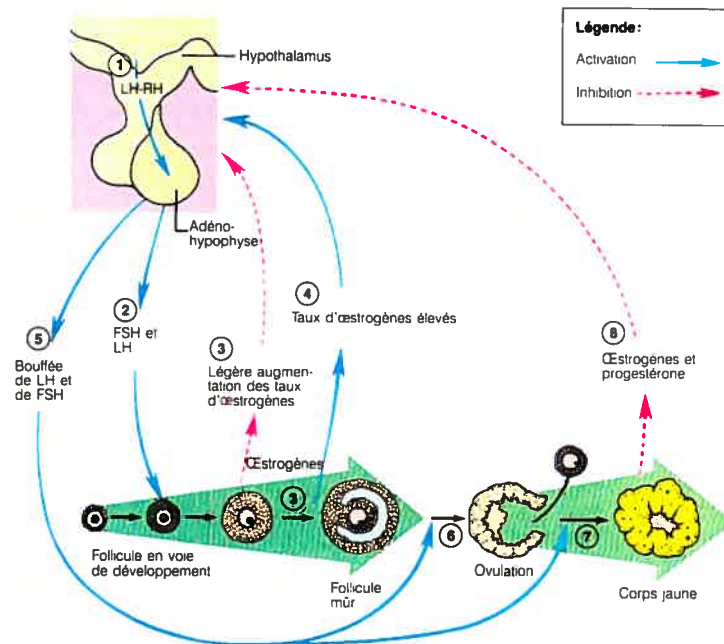
**B) Coupe histologique d'un follicule ovarien**

### 1.1.4 La physiologie de l'ovaire

L'ovaire possède deux fonctions principales : la production des gamètes femelles nommées ovules et la sécrétion de la progestérone et de l'œstrogène [19, 21]. C'est dans la zone corticale que les ovocytes acquièrent leur maturité selon un processus long et dispendieux pour l'ovaire dont le but ultime est la libération d'un ovule (Figure 3). Ce processus débute dans le follicule primordial où l'ovocyte est entouré d'une couche de cellules folliculaires. La maturation s'effectue par la suite en follicule primaire où plus d'une couche de cellules granuleuses entourent l'ovocyte et composent la granulosa. En grossissant, le follicule devient secondaire, puis tertiaire lorsque les cellules de la granulosa forme une cavité, appelée le corps de Call-Exner, qui se remplit de liquide folliculaire pour former l'antrum. Les cellules stromales adjacentes au follicule se différencient pour former les cellules de la thèque qui assurent un apport en nutriments aux cellules de la granulosa. Par la suite, l'ovocyte poursuit sa croissance, nourri par les cellules de la granulosa pour enfin devenir mature. C'est à ce moment que le follicule prend l'appellation de follicule mature ou De Graaf. Une vingtaine de follicules antraux matures sont présents à la fin d'un cycle et seule une faible proportion d'entre eux persiste jusqu'au prochain ; les autres disparaissent par involution. À chaque cycle, un seul follicule, appelé dominant, se développe en inhibant la maturation des autres pour enfin se rompre à la surface de l'ovaire et libérer l'ovule (revu dans [19, 21]). Le rôle de l'OSE dans la rupture folliculaire demeure encore incertain, mais pourrait être associé à la sécrétion de protéases. Ce rôle est toutefois remis en question puisque le follicule peut se rompre à la surface ovarienne, même en absence de l'OSE [27-29] (revu dans [26, 30]). De plus, il a été montré que les cellules de l'OSE dégénèrent et disparaissent de la surface du follicule quelque temps avant la rupture et que cette disparition peut être due à leur apoptose médiée par les prostaglandines ou par le ligand Fas [31, 32]. Le bris du collagène et la mort cellulaire présente dans l'apex du follicule pré-ovulatoire sont des caractéristiques de l'ovulation.

Le processus d'ovulation et de maturation des ovocytes ne pourrait avoir lieu en l'absence de la deuxième fonction primordiale des ovaires, soit la production des hormones sexuelles, oestrogène et progestérone (Figure 4). Le processus de production et sécrétion hormonale qui s'amplifie à l'adolescence, est régulé par l'axe hypothalamo-hypophysaire et s'initie par une sécrétion de gonadotropine (LH-RH) par l'hypothalamus (1) qui entraîne la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) par l'hypophyse (2). Ce sont ces dernières qui favorisent la maturation du follicule. La LH stimule initialement les cellules de la thèque et la FSH celles du follicule. La stéroïdogénèse chez la plupart des mammifères semble survenir via un modèle de deux cellules / deux gonadotropines où les androgènes sont synthétisés à partir du cholestérol dans les cellules de la thèque stimulées avec la LH, suivi par sa conversion en œstrogène dans les cellules de la granulosa stimulées à la FSH (3). La production d'œstrogène survient lorsque le follicule est en cours de maturation et l'augmentation des niveaux de cette hormone entraîne l'accumulation de la LH et la FSH par l'hypophyse plutôt que leur sécrétion et ce, par un processus de rétro-action positive. En réponse, le follicule mature et sécrète alors de plus en plus d'œstrogène (4). Les niveaux d'œstrogène élevés entraînent un relargage massif de LH et FSH par l'hypophyse (5) et amènent le follicule mature ou follicule De Graaf à se rompre à la surface de l'ovaire pour libérer l'ovule (6) [19, 21]. La production et la sécrétion de la progestérone surviennent suite à la rupture folliculaire où, selon un processus nommé luténisation, les cellules de la granulosa et de la thèque accumulent des lipides dans leur cytoplasme pour former le corps jaune (7). Cette nouvelle glande, sous l'influence de la LH, sécrète un peu d'oestrogène et une grande quantité de progestérone ce qui apprête l'endomètre, la couche interne de l'utérus, à l'implantation de l'embryon (8). L'augmentation des niveaux de progestérone dans le sang inhibe la sécrétion de la LH par l'hypophyse, ce qui a pour effet d'empêcher la maturation des autres follicules. En absence de fécondation, le corps jaune dégénère et la production de progestérone cesse donc avec lui (revu dans [15, 19] [21]).





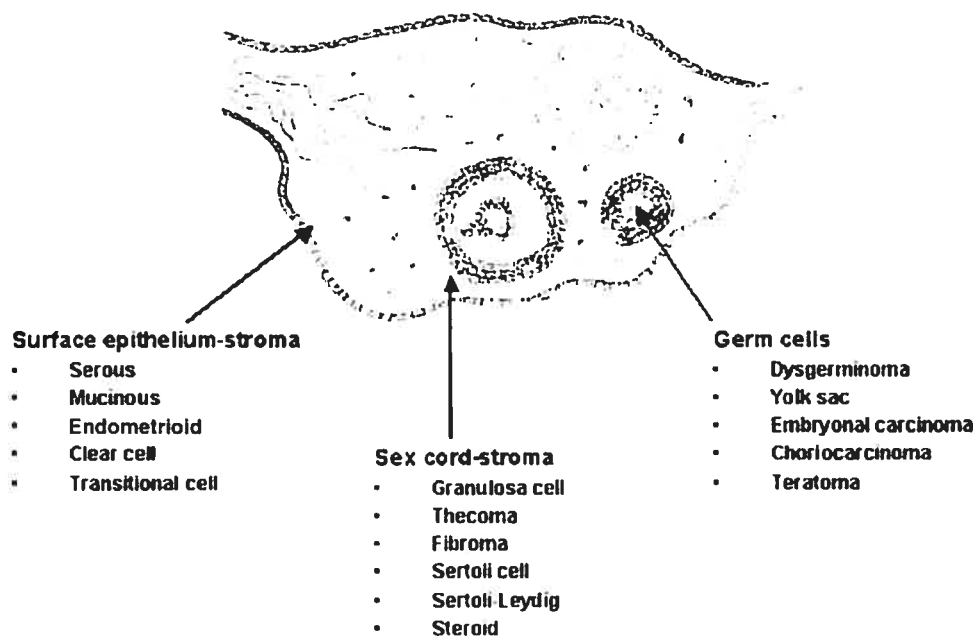
**Figure 4 Régulation et sécrétion des des hormones sexuelles femelles selon l'axe hypothalamo-hypophysaire (tirée de [21])**

## 1.2 LE CANCER DE L'OVAIRE

La composition cellulaire de l'ovaire de même que son origine font en sorte que les pathologies de cet organe sont complexes. Plusieurs critères ont donc été établis pour définir les divers types de tumeurs qui dérivent de cette glande.

### 1.2.1 Les trois types de tumeurs de l'ovaire

Les tumeurs de l'ovaire se subdivisent en trois types selon les cellules impliquées dans la formation de la tumeur. Elles peuvent être stromales ou des cordons sexuels, germinales ou encore épithéliales (Figure 5).



**Figure 5** Représentation des différents types cellulaires desquels dérivent les trois grandes classes de tumeurs ovariennes (tirée de [14])

### 1.2.1.1 Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels

Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels comptent pour 5 à 10% des tumeurs de l'ovaire et représentent de 2 à 7% des tumeurs malignes de l'ovaire (revu dans [14]). Ce type de tumeur peut être associé à la production d'hormones endocriniennes. Elles proviennent surtout des cellules de la granulosa, mais également des cellules de la thèque folliculaire (thécome), des cellules stromales qui composent le collagène (fibrome) ou des cellules de Sertoli et Leydig (Figure 5) (revu dans [15, 33-35]).

### **1.2.1.2 Les tumeurs germinales**

Le second type de tumeurs, qui compte pour environ 15 à 25% des tumeurs de l'ovaire et, de 3 à 7% des tumeurs malignes, est celui qui dérive des cellules germinales (Figure 5). Ces tumeurs sont fréquemment diagnostiquées chez les fillettes et les adolescentes. En effet, elles sont responsables du tiers des tumeurs malignes de ce groupe d'âge. Chez l'adulte toutefois, l'incidence est faible et ces tumeurs sont généralement bénignes. Les tumeurs germinales sont classifiées selon la différenciation des cellules retrouvées dans la tumeur. Dans la majorité des cas, un diagnostic de tumeurs du sinus endodermique ou du sac vitellin (architecture cellulaire du sac vitellin) ou de tératome (plus d'un type de tissus embryonnaire ecto-, méso- ou endoderme) est posé. Dans ce dernier cas, il n'est pas rare de découvrir des dents ou des cheveux à l'intérieur de la tumeur. Plus rarement, un diagnostic de carcinome embryonnaire (cellules multi-potentes et pauvrement différenciées), de choriocarcinome (tissus d'origine extra-embryonnaire tel le trophoblaste ou le placenta) ou de dysgerminome (cellules germinales primitives) est posé. Les tumeurs germinales peuvent également être composées de plus d'un type de cellules et elles sont alors considérées comme mixtes (revu dans [14, 15, 34, 35]).

### **1.2.1.3 Les tumeurs épithéliales**

Finalement, dans la majorité des cas, soit dans 60-70 % des tumeurs de l'ovaire et dans 90 % des cas de cancer, les tumeurs dérivent de l'OSE (Figure 4) (revu dans [14, 26, 34, 35]). Puisque ce type de tumeurs est celui sur lequel mes recherches ont porté, les sections qui suivent lui seront consacrées.

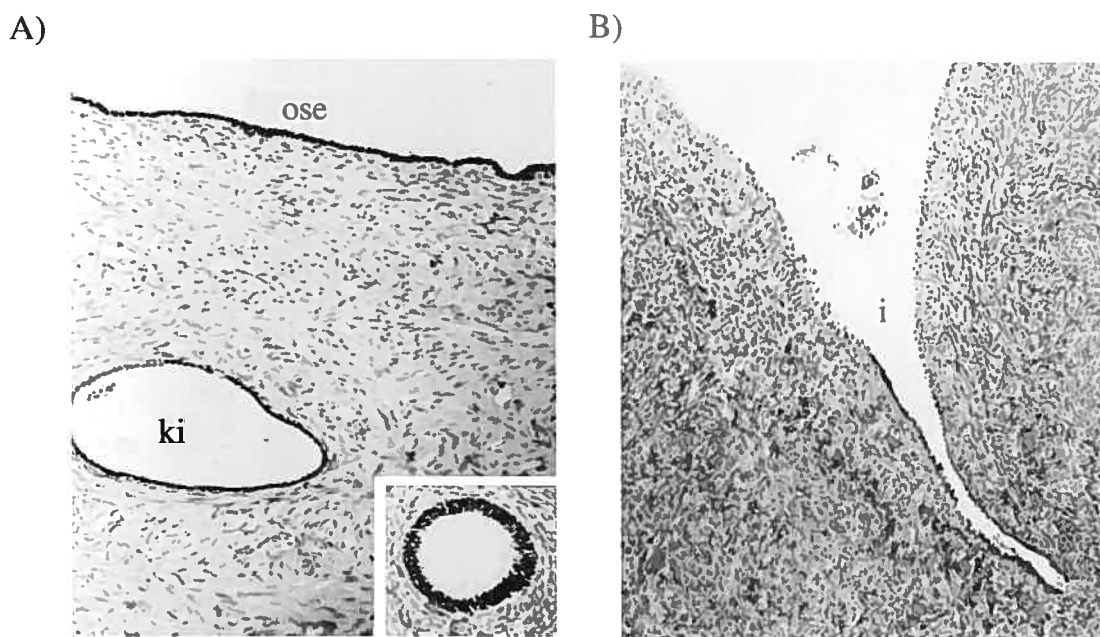
## **1.3 LE CANCER ÉPITHÉLIAL DE L'OVAIRE (EOC) ET SES ORIGINES**

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la source du développement de l'EOC. En effet, le cancer pourrait provenir d'une transformation de l'OSE, de ses

invaginations et de ses kystes d'inclusions. Il se développerait également à partir de tumeurs bénignes (BOV), de tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP), de la trompe de Fallope ou de lésions d'endométriose.

### 1.3.1 L'OSE et les kystes d'inclusion

L'hypothèse la plus acceptée pour expliquer l'origine de l'EOC est la prolifération et la transformation des cellules de l'OSE tant à la surface de l'ovaire que dans les invaginations ou les kystes d'inclusion formés par cet épithélium dans le stroma ovarien (Figure 6) (revu dans [15, 26]).



**Figure 6 Coupes histologiques représentant l'épithélium de surface ovarien, une inclusion kystique et une invagination de l'OSE (tirée de [26, 36])**

**A) Coupe d'un tissu ovarien présentant l'épithélium de surface (OSE) et un kyste d'inclusion (ki)**

**B) Coupe d'un tissu ovarien présentant une invagination (i) de l'OSE**

Afin d'élucider le développement de l'EOC, divers groupes ont effectué des études sur des lésions ovariennes précoces retrouvées dans des circonstances cliniques différentes. Par exemple, ces lésions peuvent être retirées lors d'ovariectomies prophylactiques chez des patientes ayant une histoire familiale d'EOC. Elles peuvent aussi être retrouvées sur l'ovaire contralatéral dans un contexte d'une tumeur épithéliale ovarienne invasive (TOV), sur l'OSE et les kystes d'inclusion adjacents à une TOV et finalement sur des ovaires suspects en raison d'imageries ou d'une cytologie tumorale positive (revu dans [35, 37]).

Les études sur l'OSE sont toutefois limitées par sa fragilité puisque ce dernier n'est que légèrement attaché à la surface de l'ovaire et les manipulations humaines effectuées durant la résection et l'examen pathologique macroscopique suffisent à le détacher. Seuls quelques fragments résistent et peuvent être utilisés pour l'analyse microscopique (revu dans [26, 37]). Un nombre limité d'études ont pu démontrer des atypies significatives (dysplasie sévère ou carcinome *in situ*) caractérisées par une stratification des cellules de l'OSE ou des kystes d'inclusions avec une perte de polarité nucléaire et des atypies nucléaires (ex. augmentation du ratio noyau/cytoplasme, condensation de la chromatine et noyaux surnuméraires) [38-44]. Des modifications cellulaires de l'OSE ont aussi été montrées à proximité des carcinomes visibles ou microscopiques [38-42, 45-47], tandis que d'autres études n'ont pu significativement démontrer ces atypies [48-53] (revu dans [35, 37]).

Plusieurs évidences et hypothèses tentent d'expliquer la transformation de ces cellules de l'OSE. Des expériences effectuées chez différents mammifères (lapin, souris et humain) montrent que les cellules de l'OSE sont appelées à proliférer afin de restaurer l'intégrité de la surface ovarienne. Cette activité proliférative est présente à proximité du site d'ovulation et atteint un sommet immédiatement après la rupture folliculaire [23, 29, 54, 55]. Les cellules de l'OSE seraient héréditairement fragiles à la transformation puisqu'elles ne sont pas outillées comme les cellules épithéliales de l'intestin, de la peau ou des muqueuses, pour réparer fréquemment les blessures ou pour remplacer les cellules dégénérées. D'ailleurs, des expériences *in vitro* ont

montré que la pression de croissance des cellules de l'OSE entraîne l'apparition de signes de transformation comparativement aux mêmes cellules maintenues quiescentes par inhibition de contact [56, 57]. De plus, contrairement à la plupart des épithéliums, l'OSE ne prolifère pas de façon similaire aux cellules souches régénératives. Il semble plutôt avoir des caractéristiques de cellules souches productives, puisque la cellule donne naissance à deux cellules filles au potentiel de croissance identique laissant libre cours à la propagation des défauts génétiques (ex. mutations dans les suppresseurs de tumeurs et/ou oncogènes). Finalement, lors de la restauration du cortex ovarien, les cellules de l'OSE utilisent leur capacité de transition épithélio-mésenchymale afin de migrer, de se contracter, de proliférer et de modifier la matrice extra-cellulaire qui remplissent des fonctions importantes également pour les cellules tumorales [29, 54, 55]. (revu dans [26]).

Il a été proposé que les invaginations de même que les kystes d'inclusions sont formés à la suite de l'ovulation par les cellules de l'OSE qui restent emprisonnées à l'intérieur du stroma, à la proximité du follicule rompu [26]. Cette hypothèse n'est cependant pas supportée par la présence accrue de kystes d'inclusions chez certaines femmes multipares ou aux ovaires polykystiques qui présentent une ovulation moins fréquente. Cette observation a mené à une seconde hypothèse selon laquelle ces kystes proviennent plutôt d'adhérences de l'OSE accolées aux sites d'invaginations, combinées à une prolifération localisée de cellules stromales [58] (et revu dans [26, 59]). Bien que leur origine demeure discutable, il reste que les cellules de l'OSE, présentes dans les invaginations et dans les kystes d'inclusion, montrent des signes de changements métaplasiques et/ou néoplasiques, en plus de présenter des caractéristiques de l'épithélium des canaux mülleriens (ex. utérus et trompes de Fallope). Contrairement aux cellules de l'OSE à la surface, celles présentes dans les inclusions sécrètent du CA125 et expriment la E-cadhérine, HoxA7, ErbB2 et le récepteur de tyrosine kinase Kit [60-64]. La transformation des cellules de l'OSE dans les invaginations et les inclusions pourrait être favorisée par leur nouveau microenvironnement. En effet, étant donné l'absence de la membrane basale, ces dernières se retrouvent alors directement en contact avec le stroma ovarien. De cette

façon, les facteurs de croissance, les cytokines et les autres molécules normalement bloqués par la membrane basale, sont maintenant accessibles aux cellules de l'OSE et peuvent stimuler leur prolifération. Cette hypothèse est supportée par le fait que les changements métaplasiques et dysplasiques sont plus fréquents dans les kystes d'inclusion près du stroma, comparativement au côté adjacent à la tunique albuginée ([58, 65]). Aussi, le confinement des cellules dans une architecture glandulaire fait en sorte que les facteurs de croissance sécrétés de façon autocrine par les cellules de l'OSE, tels l'IL-1 et l'IL-6, restent séquestrés et s'accumulent dans les inclusions, plutôt que de diffuser dans la cavité péritonéale [23, 66-69] (et revu dans [26, 70]).

### 1.3.2 Les autres origines possibles du développement de l'EOC

D'autres hypothèses concernant l'origine de l'EOC ont été proposées sans pour autant surclasser l'hypothèse de l'origine épithéliale discutée plus haut. Dans certains types de tumeurs seulement, il a été suggéré que l'EOC provient des lésions d'endométriose, une pathologie gynécologique bénigne où les patientes présentent une prolifération de tissus de l'endomètre de façon ectopique sur les ovaires, les trompes de Fallope, les ligaments soutenant l'utérus et quelques fois sur la vessie, le vagin et l'intestin. L'endomètre recouvre normalement l'intérieur de l'utérus. Il a été montré qu'un sous-groupe de tumeurs ovariennes endométrioïdes (voir section 1.5.1) provient des lésions d'endométriose [71-76] (et revu dans [37]). Bien que peu d'études aient été faites sur le sujet, les lésions d'endométriose semblent également permettre le développement de certaines TOV à cellules claires (voir section 1.5.1) [71] (et revu dans [37]). Plus récemment, et principalement chez les femmes porteuses de mutations de *BRCA1*, il a été suggéré que l'EOC dérive de la muqueuse de la trompe de Fallope. Cette hypothèse provient de l'observation de carcinomes *in situ* ou de lésions d'atypies sévères présents sur la trompe de Fallope de femmes subissant une ovariectomie prophylactique (revu dans [37, 77]). Finalement, la dernière hypothèse concernant l'origine de l'EOC suggère que le développement des TOV s'effectue selon un continuum qui débiterait par les tumeurs BOV pour évoluer

vers une LMP et finalement terminer en TOV. Ce point sera décrit de façon plus détaillée dans la section 1.6 de cette thèse.

## **1.4 ÉPIDÉMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES ASSOCIÉS AU DÉVELOPPEMENT DE L'EOC**

### **1.4.1 Épidémiologie**

L'EOC est la cause majeure des décès par cancer gynécologique. Chez les femmes canadiennes, il représente le sixième cancer en importance en plus d'être le cinquième cancer le plus meurtrier. En 2006, l'EOC a été diagnostiqué chez 2300 Canadiennes et cette maladie en a emporté 1600 [78]. Mondialement, 11 femmes sur 100 000 seront frappées par ce cancer dont l'incidence varie selon la région géographique. Ce sont les Européennes et les Nord-Américaines qui ont l'incidence la plus élevée, alors que l'incidence la plus basse se retrouve chez les Africaines et les Asiatiques [79].

### **1.4.2 Étiologie et facteurs de risque associés au développement de l'EOC**

Bien que certaines associations aient été observées, l'étiologie de l'EOC n'est toujours pas très bien comprise. De plus, vu l'absence de lésion précurseur définie et propre à l'EOC, l'étude de celle-ci en est que plus difficile. Voici un aperçu des quelques facteurs de risques qui ont été associés à son développement (revu dans [26, 35, 79-82]).

#### **1.4.2.1 L'âge**

En fait, comme la plupart des cancers, le risque de développer l'EOC s'accroît avec l'âge et ce dernier frappe principalement les femmes péri- ou post-ménauposées (médiane d'environ 60 ans). Il est rarement diagnostiqué chez les femmes de moins



de 40 ans. L'incidence de l'EOC augmente avec chaque décennie d'âge, pour finalement atteindre un sommet chez les femmes de 75-79 ans (revu dans [26, 35, 79-82]).

#### **1.4.2.2 L'alimentation et les habitudes de vie**

Le risque de développer l'EOC varie entre les différents pays, l'ethnie et le rang social. Ceci s'explique probablement par les facteurs environnementaux, dont l'alimentation et les habitudes de vie et de reproduction (revu dans [26, 35, 79-82]). Comme la plupart des études d'épidémiologie, certaines études montrent une association entre un type d'aliment précis et le risque de développer l'EOC tandis que d'autres ne peuvent reproduire leurs observations. Des méta-analyses ont conclu qu'il existe des évidences d'association entre le développement de l'EOC et la faible consommation de fruits/légumes ou la forte consommation de viandes/matières grasses d'origine animale (revu dans [80, 82]). Les évidences sont toutefois insuffisantes pour conférer une association entre la consommation de poissons, d'œufs, de caroténoïdes, de vitamine D ou de calcium et le risque de développer l'EOC [83, 84] (revu dans [80]). Il a été suggéré que l'alimentation affecte le risque d'être atteint d'EOC via les changements dans les hormones endogènes et/ou via les effets anti-oxidants ou anti-carcinogènes des substances [85-87]. Les études effectuées sur l'indice de masse corporelle élevée et le risque de souffrir d'EOC montrent également des résultats contradictoires avec association positive, négative ou absente (revu dans [80, 82]). Le risque associé au statut fumeur de la patiente, quant à lui, reste litigieux, mais semble être plus fortement associé avec le développement de tumeurs mucineuses (voir section 1.5.1) [88-93].

#### **1.4.2.3 Les facteurs environnementaux et l'inflammation**

Différents facteurs environnementaux semblent associés au développement de l'EOC dont l'utilisation du talc dans la région péri-génitale, les polluants industriels, l'amiante et certains agents infectieux (revu dans [26, 35, 79, 82, 94]). Ces agents

tendent à induire une réaction inflammatoire et il a été proposé que ce processus peut favoriser le développement de l'EOC. Cette théorie est supportée par le fait que les femmes exposées à ces facteurs environnementaux ont une incidence réduite d'EOC lorsqu'elles ont subi une hystérectomie ou une ligature de leurs trompes de Fallope (revu dans [15, 35, 82, 94]). Ceci suggère un effet de barrière au passage des initiateurs d'inflammation environnementaux, conféré par ces interventions chirurgicales [95-97]. L'inflammation provoquée par les agents environnementaux engendrent des dommages cellulaires causés par un stress oxydatif de même que des élévations de molécules potentiellement mutagéniques dont les cytokines et les prostaglandines (revu dans [35, 82, 94] ).

#### **1.4.2.4 Les effets de l'ovulation**

En 1971, Fathalla a émis une hypothèse selon laquelle l'ovulation incessante a un rôle à jouer dans le développement de l'EOC puisque les ruptures et les réparations ayant lieu au site de l'ovulation sont des sources potentielles d'aberrations génétiques [98]. À cette époque, cette hypothèse était appuyée par un nombre limité d'observations. Par exemple, le nombre d'ovulations chez la femme est beaucoup plus élevé que chez toutes autres espèces animales où l'EOC est quasi-inexistant. D'ailleurs, certaines espèces animales ovulent seulement en saison de reproduction, en présence d'un mâle ou encore seulement quelques fois par année. À l'opposé, un exemple classique d'ovulation continue est la poule chez qui la carcinose augmente lors de la surproduction d'œuf [98-100]. En outre, il a été noté que l'incidence de l'EOC augmente chez les religieuses, les femmes célibataires ou infertiles. Plus tard, des études ont montré que le risque de développer l'EOC était de 30 à 60% plus élevé chez les femmes nullipares comparativement aux multipares et que celui-ci diminue en fonction du nombre de grossesses. De plus, la diminution du nombre d'ovulations, par la prise d'anovulants de même que par l'allaitement, réduit elle aussi le risque de développer l'EOC. La diminution du risque est de 7% pour chaque année de prise d'anovulants, de même que de 2.6 et 2.4% pour le nombre de mois de gestation et d'allaitement effectués [101, 102]. À l'opposé, un traitement d'hyperstimulation

ovarienne, chez les femmes qui souffrent de troubles de fertilité, augmente le risque de développer l'EOC, surtout s'il s'est avéré infructueux. Au fil du temps, plusieurs études ont pu confirmer l'hypothèse avant-gardiste émise par Fathalla (revu dans [15, 26, 34, 79, 81, 82]).

#### **1.4.2.5 L'hypothèse de la gonadotropine**

Cette hypothèse, plus récente que la précédente, stipule que l'exposition excessive aux gonadotropines, telles la FSH et la LH, favorise la stimulation oestrogénique de l'OSE et donc sa prolifération [103] (et revu dans [34, 35, 81, 82]). La gonadotropine peut soit stimuler directement la transformation ou indirectement stimuler la production d'œstrogène. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les niveaux de gonadotropine sont plus élevés chez les femmes plus âgées, et plus particulièrement à la ménopause, ce qui est en corrélation avec le développement de l'EOC [104]. Au contraire, les grossesses et les anovulants entraînent une diminution du niveau de gonadotropine pituitaire. De plus, les femmes ayant des ovaires polykystiques ont un ratio plus élevé de LH/FSH également associé à l'EOC [105, 106]. Des évidences montrent une augmentation du risque de développer des tumeurs (bénignes ou malignes) chez les femmes ayant reçu des traitements de gonadotropines pour améliorer leur fertilité, de même que chez les rats stimulés avec cette dernière. Cependant, le développement de l'EOC ne diffère pas entre les groupes contrôles et traités ce qui enlève de la validité à cette hypothèse [107, 108]. D'autres observations vont aussi à l'encontre de cette théorie. D'abord, malgré le fait qu'il entraîne une augmentation du niveau de FSH, l'allaitement s'avère protecteur au développement de l'EOC [108, 109]. En second lieu, un plus fort risque de développer l'EOC est noté chez les femmes qui présentent un niveau particulièrement faible de gonadotropine [94, 105, 110].

#### 1.4.2.6 La ménopause et les hormones exogènes

Toujours sous le spectre de l'ovulation incessante, les femmes ayant leur ménarche de façon précoce, de même que celles dont la ménopause survient plus tardivement, ont un risque plus élevé de développer l'EOC. Cependant, ces résultats demeurent conflictuels. De plus, une thérapie d'hormones de remplacement, chez les femmes voulant contrer les effets de la ménopause, augmente 1.5 à 2 fois le risque de développer l'EOC et ceci est probablement occasionné par la réponse proliférative des ovaires à ces hormones exogènes [111-113] (revu dans [15, 34, 35, 79, 81, 82, 94]).

#### 1.4.2.7 L'hérédité et l'EOC

Le dernier facteur de risque connu, associé au développement de l'EOC, est l'hérédité. En effet, dans 5 à 10% des cas, une composante génétique est à l'origine du développement de la maladie (revu dans [15, 26, 34, 79, 81, 82, 114]). Les femmes nées dans les familles atteintes ont entre 1.9 et 2.7 fois plus de risques de développer l'EOC. La probabilité de développer l'EOC n'est que de 1.6% chez les femmes de 35 ans sans histoire familiale, mais s'élève à 5 et 7% respectivement lorsqu'un ou deux membres sont atteints [82, 115-118]. Trois différents syndromes augmentent d'au moins trois fois le risque d'être atteint de l'EOC. Il s'agit des syndromes ovaire seul, sein-ovaire et de Lynch ou HNPCC (*hereditary nonpolyposis colon cancer*). Chez les familles où le syndrome ovaire seul est présent, les femmes ont 3.6 fois plus de risques, de développer l'EOC. Le syndrome sein-ovaire confère aux femmes d'une famille atteinte un risque augmenté de 20% à 40% de développer l'EOC. Des mutations germinales dans deux gènes suppresseurs de tumeur, *BRCA1* et *BRCA2*, respectivement localisés sur les chromosomes 17q et 13q, semblent responsables de la majorité de ces EOC familiaux [119-121] (revu dans [15, 26, 34, 79, 81, 82, 122, 123]). Une mutation germinale dans les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* confère un risque moyen de développer l'EOC de 16 à 39% et de 11 à 16%, respectivement et la pénétrance des mutations germinales de *BRCA1* dans l'EOC

atteint 65% [119, 124-127]. Ces gènes suppresseurs de tumeurs sont essentiels à la réparation de l'ADN, à l'activation transcriptionnelle, au contrôle du cycle cellulaire et au remodelage de la chromatine [128] (et revu dans [129]). Des efforts ont été fournis afin de déterminer quelles mutations des gènes *BRCA* conféraient un risque de développer l'EOC. Cependant, la taille imposante de ce gène et la variété des mutations trouvées rendent ces études laborieuses [130]. Malgré cela, des régions des gènes *BRCA* associées au cancer de l'ovaire (ovarian cancer cluster region; OCCR ) ont été identifiées par des études génétiques de cohortes familiales bien que des mutations aient aussi été identifiées à l'extérieure de ces régions [131]. Chez les patientes HNPCC, le risque de développer l'EOC est de 12% et une forte histoire familiale de cancer du colon, du système urinaire et de l'endomètre est retrouvée [132]. Dans ce syndrome, ce sont les gènes *MLH1*, *MSH2*, *PMS1* et/ou *PMS2*, nécessaires à la réparation des mauvais appariements de bases dans l'ADN, qui se retrouvent mutés. Toutefois, le risque associé au développement de l'EOC dans ce syndrome n'a pas encore été évalué. Dans les familles à haut risque, où plusieurs femmes ont développé l'EOC, l'exérèse prophylactique des ovaires et des trompes de Fallope est proposée (revu dans [133, 134]).

## **1.5 CLASSIFICATION DES TUMEURS DE L'OVAIRE SELON LA FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE GYNÉCOLOGIE ET D'OBSTÉTRIQUE (FIGO)**

L'EOC est l'une des malignité les plus complexes pour laquelle les scientifiques et les cliniciens de la FIGO ont établi plusieurs critères nécessaires à sa caractérisation [135]. Parmi ceux-ci se retrouvent la classe de la tumeur, le type histopathologique, le grade de différenciation tumoral et enfin le stade de la maladie.

### **1.5.1 Les types histopathologiques de l'EOC**

En absence d'ovulation, les cellules de l'OSE restent dans un état de mésothélium stationnaire et possèdent des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses.

L'OSE n'est pas totalement différencié et se rapproche plus de son précurseur embryonnaire multi-potent que les autres organes dérivés de l'épithélium coelomique (ex. : l'utérus et les trompes de Fallope). En effet, lors de la réparation de la surface ovarienne, les cellules de l'OSE déploient des caractéristiques de cellules stromales. Par ailleurs, en condition de tumeurs ou de métaplasies, elles tendent à perdre leurs caractéristiques stromales pour se différencier et acquérir celles des épithéliums dérivés, entre autres, des canaux müllériens. C'est cette différenciation qui permet de classer les tumeurs en divers types histopathologiques (revu dans [26, 81]).

L'histopathologie la plus fréquente (40-60%) est celle de type séreux ou séreux papillaire où les cellules ressemblent à celles de l'épithélium des trompes de Fallope. Les tumeurs de ce type histopathologique peuvent être bénignes (70%), à faible potentiel de malignité (10%) ou malignes (20%). Dans la majorité des cas (66%), leur présentation est bilatérale et les TOV séreuses sont agressives puisque seules 20 à 30% des patientes survivent plus de cinq ans après leur diagnostic (revu dans [15, 34])

Le type histopathologique endométrioïde présente les caractéristiques de l'épithélium de l'endomètre et les tumeurs de ce type sont plus rarement diagnostiquées puisqu'elles ne représentent que 5 à 8% des tumeurs de l'ovaire. Toutefois, comme la majorité d'entre elles sont invasives, elles constituent une large proportion des tumeurs malignes de l'ovaire, soit 20%. Les TOV endométrioïdes sont diagnostiquées chez les patientes plus âgées et surviennent de façon bilatérale dans 30% des cas. Elles sont associées à un meilleur pronostic que les tumeurs séreuses puisque 50% des patientes survivent plus de cinq ans suite à leur diagnostic (revu dans [15, 34]).

L'histopathologie mucineuse est caractérisé par des cellules qui produisent et sécrètent de la mucine. Au point de vue histologique, elles se rapprochent des cellules épithéliales de l'endocol de l'utérus, mais rappellent aussi celles de l'intestin. Elles représentent de 15 à 30% des tumeurs de l'ovaire et sont retrouvées sous forme bénigne (80%), borderline (10%) ou maligne (10%). Ces tumeurs sont généralement

plus volumineuses et atteignent les deux ovaires dans seulement 10 à 20% des cas. Malgré leur large volume, seuls 20% d'entre elles présentent des métastases péritonéales au moment du diagnostic. La survie à cinq ans des patientes avec ce type de tumeurs est de 50% (revu dans [15, 34])

Plus rarement, soit dans 3% des tumeurs ovariennes, l'histopathologie à cellules claires est diagnostiquée. Les cellules qui la composent ressemblent à celles de l'endomètre lors de la grossesse et se présentent sous forme de larges cellules remplies de glycogène. La majorité de ces tumeurs sont malignes et représentent 5 à 10% des cas d'EOC. La plupart des patientes atteintes de tumeurs à cellules claires sont diagnostiquées à des stades précoces de la maladie puisque seulement 10 à 15% des patientes présentent des lésions extra-ovariennes lors de leur diagnostic. Environ 69% des patientes diagnostiquées à un stade I survivent 5 ans ou plus après leur diagnostic et ce taux chute à 14% à des stades plus avancés [34]. Cependant, des études ont montré que ce type de tumeurs a un plus faible taux de réponse à la chimiothérapie que les autres types histopathologiques ce qui peut expliquer le fait que les patientes diagnostiquées à des stades avancés ont un pronostic plus sombre que celles ayant tout autre type histopathologique [136, 137] et (revu dans [34, 138]).

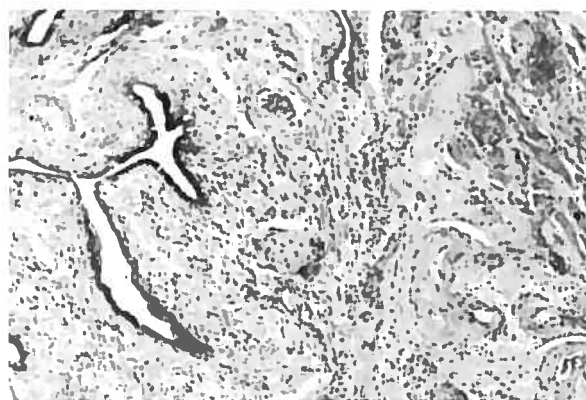
Dans une proportion moindre, soit dans 2% des tumeurs, le type histopathologique à cellules transitionnelles ou de Brenner est retrouvé. Son aspect rappelle celui des cellules épithéliales du système excréto-urinaire et les tumeurs de ce type sont bénignes. Lorsque la tumeur est composée de plus d'un type histopathologique et que chacun de ces types représente plus de 10% de la masse tumorale, l'histopathologie est alors dite mixte. Ce type survient dans 3% des cas et le pronostic reflète celui des histopathologies impliquées. Finalement, certaines tumeurs ne présentent aucune architecture spécifique et un diagnostic de tumeur indifférenciée est établi. Ces tumeurs surviennent dans 15 à 30% des EOC et le pronostic des patientes est sombre, car seulement 15% d'entre elles survivent plus de 5 ans suite à leur diagnostic.

## 1.5.2 Les classes de tumeurs ovariennes

Les tumeurs peuvent se subdiviser en trois classes majeures : les tumeurs bénignes (BOV), borderline ou à faible potentiel de malignité (LMP) et invasives (TOV). Dans la majorité des cas (50%), un diagnostic de BOV est posé, suivi par les TOV (33%) et les LMP (17%) (revu dans [15, 34]). Puisque la présente thèse traite plus spécifiquement de l'histopathologie séreuse, les paragraphes qui suivent s'attarderont principalement sur ce type de tumeurs.

### 1.5.2.1 Les tumeurs bénignes (BOV)

Les BOV présentent une prolifération épithéliale simple et sans stratification de l'OSE (Figure 7). Ces tumeurs se présentent généralement sous forme kystique, bordées d'un épithélium simple de cellules hautes en forme de palissade. Les BOV sont diagnostiquées chez des femmes jeunes, dont l'âge varie entre 20 et 60 ans. Bien qu'elles puissent être volumineuses, ces tumeurs sont inoffensives et n'entravent en rien la survie des patientes chez qui elles sont diagnostiquées. En fait, les seuls risques encourus par les patientes sont ceux reliés à la résection des BOV (revu dans [14, 34]).



**Figure 7** Coupe histologique d'une tumeur bénigne (tirée de [www.bioscience.org](http://www.bioscience.org))



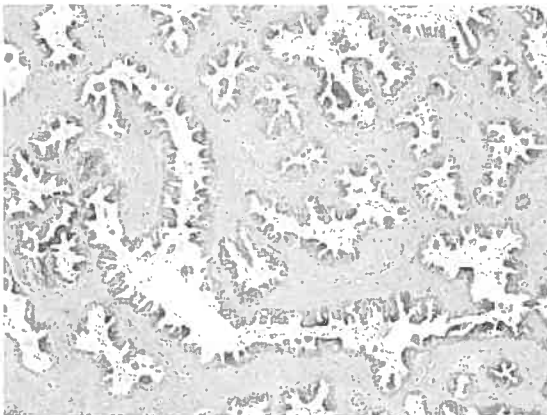
### **1.5.2.2 Les tumeurs borderline ou à faible potentiel de malignité (LMP)**

C'est en 1929 que Taylor a décrit, pour la première fois, ces tumeurs qu'il qualifia de 'semi-malignes' [139]. Aussi nommées tumeurs à faible potentiel de malignité, borderline ou à prolifération atypique, elles n'ont toutefois fait leur apparition dans la classification de la FIGO qu'en 1971. Globalement, les LMP sont diagnostiquées chez des patientes légèrement plus âgées que les patientes atteintes de BOV, mais plus jeunes que celles frappées par les TOV. Elles représentent environ 20% des tumeurs malignes de l'ovaire, surviennent de façon bilatérale dans 30-50% des cas selon l'étude et leur diamètre varie entre 5 et 20cm. Malgré leur classification en tant que tumeurs malignes, les LMP sont associées à un bon pronostic puisque environ 95% des patientes survivent plus de cinq ans après leur diagnostic (revu dans [14, 34, 140, 141]).

#### **1.5.2.2.1 La caractérisation des LMP**

Les LMP peuvent se distinguer des BOV par la complexité architecturale des structures glandulaires et à la présence de bourgeonnements épithéliaux où des cellules atypiques uniques ou en petits groupes se détachent des papilles (Figure 8). Ces papilles peuvent se projeter dans la lumière kystique (endophytique) ou à la surface de l'ovaire (exophytique) [142]. Aussi, ces tumeurs présentent une pluri-stratification de leur épithélium et montrent une activité mitotique supérieure à celle des BOV [141, 143]. Les cellules des LMP montrent quelques atypies cytonucléaires qui comprennent l'augmentation du ratio noyau/cytoplasme, l'hyperchromatinisation et la proéminence de leurs nucléoles (revu dans [14, 34, 140, 141]). Le problème principal associé au diagnostic des LMP, est la reconnaissance d'une éventuelle invasion stromale donnant lieu à un diagnostic de TOV. Les papilles des LMP sont souvent profondément invaginées dans la composante stromale ce qui laisse soupçonner une présence d'invasion selon le type de coupe histologique effectuée. Cependant, contrairement à la franche invasion présentée par les TOV où le stroma est typiquement desmoplasique et inflammatoire, celui des secteurs de pseudo-

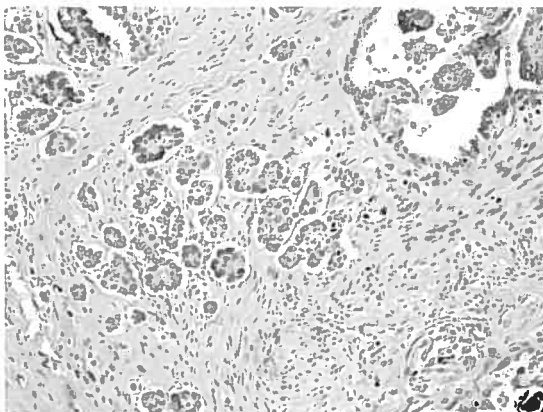
invasion des LMP ne diffère pas du parenchyme avoisinant et les formations glandulaires ont une disposition régulière et non anarchique.



**Figure 8 Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité typique (tirée de [www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm](http://www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm))**

Dans une proportion de 10 à 15%, les LMP présentent de la microinvasion (Figure 9). Celle-ci consiste en un foyer de carcinome invasif dont la plus grande dimension atteint un maximum de 3mm et/ou couvre une surface maximale de 10mm<sup>2</sup> dans le stroma ovarien [34, 143-152]. La microinvasion se dessine selon deux patrons distincts. Le plus commun est le patron éosinophilique qui montre des cellules au cytoplasme éosinophilique seules, en groupe ou en nids, de façon abondante dans le stroma. Les cellules possèdent un gros noyau, un petit nombre ou un nombre modéré d'atypies nucléaires et des nucléoles proéminents. Le stroma entourant ce type de lésion est normal ou légèrement fibreux. Le deuxième patron est caractérisé par une infiltration stromale de petits nids solides de cellules, d'embranchement de micropapilles ou de masses cribriformes (contenant de petits trous) de cellules épithéliales entourées d'un espace dans le stroma [144] (et revu dans [143, 148, 152]). Les cellules sont polygonales avec un ratio nucléo-cytoplasmique élevé, des nucléoles proéminents, une apparence cuboïde ou en palissade avec une présence

modérée à abondante de cytoplasme éosinophile. La présence de microinvasion ne semble toutefois pas affecter significativement le pronostic des patientes (revu dans [34, 143, 147, 148, 153]).

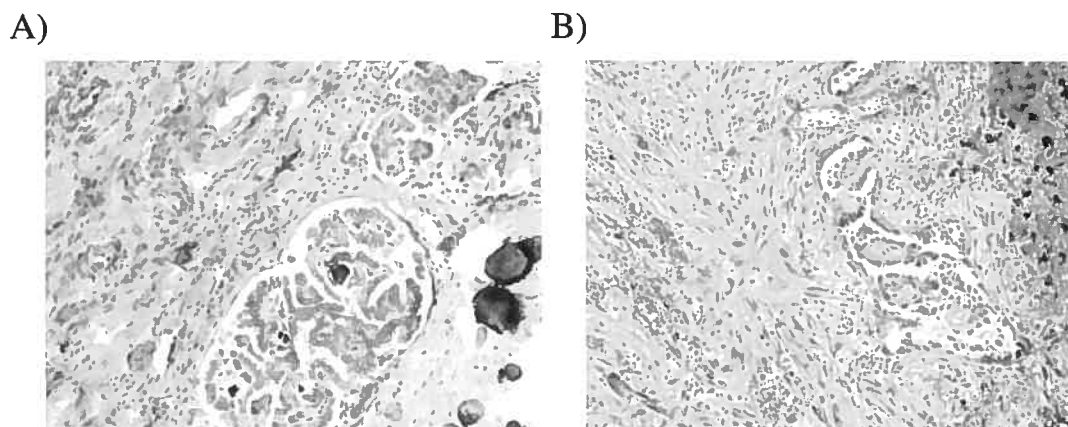


**Figure 9** Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité présentant de la microinvasion (tirée de [www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm](http://www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm))

#### 1.5.2.2 Les implants péritonéaux associés aux LMP

Selon les études, entre 16 et 46% des LMP sont associées à des implants péritonéaux (revu dans [34, 141, 143, 148, 151, 152, 154, 155]). L'origine de ces implants reste encore incertaine, mais leur incidence est plus fréquente lorsque la tumeur LMP prolifère de façon exophytique [156]. Puisque rien n'est simple dans l'EOC, les implants péritonéaux n'échappent pas à cette réalité. En effet, ils se présentent sous différents types soit épithélial ou desmoplasique, mais peuvent également être invasifs ou non-invasifs [151, 155]. Chez une même patiente, les implants de type épithélial et desmoplasique peuvent être observés (revu dans [143, 148]).

Les lésions de type épithélial présentent des papilles de cellules épithéliales en prolifération qui s'embranchent les unes aux autres avec présence de bourgeonnement cellulaire et s'implantent à la surface du péritoine, de l'épiploon (repliement du péritoine qui recouvre les organes de la cavité abdominale, omentum) ou autour des invaginations sub-péritonéales (Figure 10). Les papilles sont généralement entourées de cellules séreuses atypiques en palissade ou cuboïdes. Le stroma adjacent à ces lésions reste normal et les atypies cytologiques sont similaires à celles retrouvées dans la tumeur ovarienne LMP associée aux implants [155, 157] (et revu dans [141, 148, 151]). Les implants desmoplasiques, quant à eux, présentent des structures en forme de glandes, de groupes de papilles, de nids de cellules ou de cellules seules qui sont entourés par des cellules séreuses atypiques, emprisonnées dans du tissu prolifératif, fibreux, inflammé et/ou œdémateux qui semble être collé sur les surfaces péritonéales (Figure 10). Ces lésions, où le stroma réagit fortement à la présence des implants, sont fréquemment associées à des zones nécrotiques ou hémorragiques [155, 157] (et revu dans [141, 143, 148, 151]). Un espace interstitiel est présent entre le tissu normal, tumoral et fibreux. Les réactions stromales prédominent et semblent compresser les cellules tumorales.



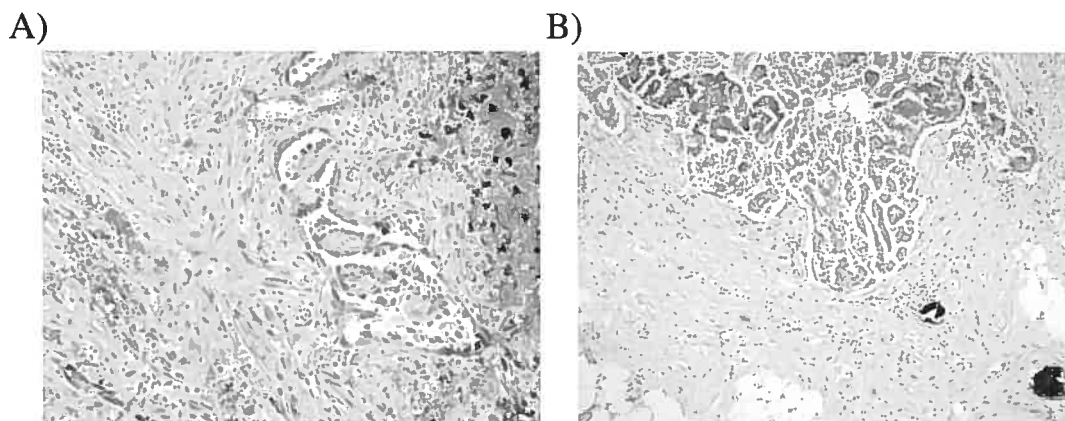
**Figure 10 Coupes histologiques d'implants péritonéaux de type épithélial et desmoplasique associés aux tumeurs à faible potentiel de malignité (tirée de [www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm](http://www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm))**

**A) Implant de type épithélial**

**B) Implant de type desmoplasique**

Les implants non-invasifs progressent lentement et n'assombrissent en rien le pronostic de la patiente puisque 95% d'entre elles survivent toujours cinq ans après leur diagnostic. Ils se localisent à la surface des structures péritonéales et ne possèdent pas de marges irrégulières infiltrantes (Figure 11). Ils présentent souvent des papilles qui suivent les invaginations kystiques. Les implants invasifs, quant à eux, sont caractérisés par une prolifération épithéliale désorganisée qui s'étend de façon irrégulière et d'apparence agressive dans le tissu normal de l'épiploon ou du péritoine (Figure 11). La tumeur infiltrante se présente sous forme de micropapilles allongées, de petits nids ou d'amas de cellules épithéliales cribriformes. Les implants invasifs présentent des atypies cellulaires plus marquées que leurs semblables non-invasifs, mais leur fréquence est moindre (22% vs 78%) [155, 158] (et revu dans [34, 143, 147, 148, 151]). La distinction entre ces deux types d'implants est importante puisque le pronostic des patientes est plus sombre lorsque les LMP sont associées aux implants invasifs (survie de 66% à cinq ans). Ces derniers sont perçus par certains

comme des TOV survenant dans un contexte de LMP (revu dans [34, 143, 147, 148, 159]).



**Figure 11 Coupes histologiques d'implants péritonéaux de type non-invasif et invasif associés aux tumeurs à faible potentiel de malignité (tirée de [www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm](http://www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm))**

**A) Implant de type non-invasif**

**B) Implant de type invasif**

La présence d'implants tumoraux soulève encore de nos jours bien des questionnements sans réponses claires et précises (revu dans [143, 148, 159]). Certains pensent que ce sont en fait de vraies métastases. Cette hypothèse est passablement discréditée par l'existence des implants non-invasifs [142, 156]. Vu leur fréquence accrue dans le cas de tumeurs à croissance exophytique, d'autres croient que les cellules des LMP se sont tout simplement accolées et implantées sur les tissus avoisinants. Finalement, il a également été suggéré que les implants proviennent de la transformation *in situ* des inclusions mülleriennes bénignes d'endosalpingiose (inclusions ectopiques glandulaires et épithéliales) puisque ces lésions sont fréquemment observées dans un contexte de LMP. Aussi, ces inclusions

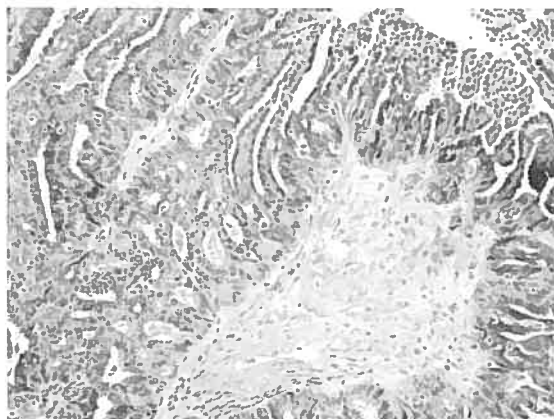
surgissent sur les tissus généralement atteints par les implants des LMP tels le péritoine, l'épiploon et les ganglions (revu dans [141, 143, 148, 154]). En opposition aux tumeurs invasives, la présence d'implants non-invasifs dans des ganglions des patientes LMP n'entrave pas leur survie (revu dans [141, 143, 148, 154]). Selon l'hypothèse, la transformation des inclusions d'endosalpingiose survient de façon multifocale sous l'effet d'un même agent tumorigène [155, 158, 160, 161] et ceci est supporté par le fait que des implants péritonéaux, identiques aux implants non-invasifs des LMP, surviennent même en absence de tumeur ovarienne [162, 163] (et revu dans [141, 143]).

En fait, des observations supportent les deux origines (LMP ou endosalpingiose) des implants tumoraux [156, 164-166] (et revu dans [141, 143]). D'ailleurs, les études de clonalité des LMP et des implants qui leur sont associés sont conflictuelles [164, 166-169] (et revu dans [170]). En effet, des essais de LOH et d'analyse de mutation dans les gènes *KRAS* et *BRAF* suggèrent que les implants dérivent de la tumeur LMP puisque la même mutation se retrouve dans la tumeur ovarienne et dans les implants alors qu'elle est absente de l'ADN normal correspondant. Bien qu'effectuées chaque fois sur un nombre limité de patientes, ces études de mutations suggèrent une origine clonale des LMP et de leurs implants [160, 166, 169, 171] (et revu dans [148, 164]). À l'opposé, des analyses d'inactivation du chromosome X supportent l'hypothèse de non-clonalité entre les LMP et leurs implants [167, 168].

### **1.5.2.2.3 Les carcinomes micropapillaires séreux (MPSC)**

C'est en 1996 qu'un groupe a mis en lumière une catégorie de LMP possédant une architecture distincte des LMP typiques qu'ils ont nommé carcinome micropapillaire séreux (MPSC) [172]. Au niveau architectural, les LMP typiques sont composées de cellules en palissade ou polygonales qui présentent quelques atypies cellulaires. Elles s'organisent en papilles fibreuses de taille variable et dont les contours sont irréguliers. Ces papilles s'agencent selon un patron de branchement hiérarchique avec un amincissement de leur pointe et la présence de bourgeonnement épithélial. Les

MPSC, quant à elles, sont caractérisées par une architecture micropapillaire, cribriforme ou solide, dont les papilles sont cinq fois plus longues que larges (Figure 12). Elles émergent de façon non-hiérarchique (même épaisseur du début à la fin) à partir de la surface d'un kyste ou d'une large papille fibreuse ou œdémateuse. Les longues micropapilles ont un centre contenant peu ou pas de tissu connectif et sont fréquemment constituées de cellules cuboïdes au cytoplasme quasi absent. Le ratio noyau-cytoplasme en est donc élevé et les nucléoles sont peu ou moyennement atypiques. Le diagnostic de MPSC survient lorsque la tumeur montre ce type d'architecture sur au moins 5mm, sans présence d'architecture typique dans le secteur vu la coexistence de ces deux types d'architectures dans la même tumeur (revu dans [34, 141, 143, 148, 152]).



**Figure 12** Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité présentant une architecture de carcinome micropapillaire séreux (MPSC) (tirée de [www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm](http://www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm))

Au point de vue clinique, l'âge au diagnostic des MPSC est similaire à celui des LMP typiques. Bien que les MPSC soient décrites comme étant légèrement plus agressives et cliniquement plus malignes que les LMP typiques, des contradictions persistent toujours concernant leur association avec un pronostic plus sombre [172]. La



controverse persiste également au sujet de leur fréquence d'association accrue avec des implants péritonéaux invasifs. Le faible échantillonnage présent dans chacune des études qui comparent les deux architectures favorise ces contradictions. Suite à ces différentes observations, il a été proposé que la classe LMP devait être abolie pour subdiviser les tumeurs en BOV (LMP typique) et en TOV (MPSC) [173]. Cependant, plutôt que l'architecture elle-même, il a été observé que le pronostic plus sombre des patientes était dû à la présence des implants invasifs qui sont plus fréquents chez les MPSC qui possèdent une croissance plus souvent exophytique [148]. D'ailleurs, en absence d'implant invasif, les MPSC sont tout aussi indolentes que les LMP typiques [174] [161] (et revu dans [70, 148]) ce qui laisse planer le doute sur leur potentialité à être considérées comme des TOV de bas grade. Suite aux diverses observations, les MPSC restent donc, jusqu'à ce jour, dans la catégorie des LMP [172] (et revu dans [34, 70, 141, 143, 148, 152, 170]).

#### **1.5.2.2.4 Progression des LMP**

La vaste majorité des LMP ont un comportement clinique similaire à celui des BOV et de ce fait, confère un bon pronostic aux patientes atteintes. Assez rarement (10 à 15%), et généralement de façon tardive (médiane 6 ans), une récurrence de la maladie peut survenir [175] (et revu dans [34, 141, 147, 148, 176]). Durant plusieurs années, il a été assumé que la récurrence des patientes LMP évoluait cliniquement à la manière d'une LMP puisque de cette dernière était tout aussi indolente que la tumeur primaire. Cependant, diverses études récentes montrent qu'une forte proportion des patientes atteintes de LMP développent une récurrence clinique invasive sous forme de TOV [173, 175, 177-181]. Ce phénomène survient plus fréquemment chez les MPSC [173, 177] et est associé à un pronostic plus sombre pour ces patientes [175]. Par contre, la latence avec laquelle ces récurrences apparaissent suggère le développement d'un second cancer primaire plutôt qu'une récurrence LMP ou encore l'inexactitude du diagnostic initial LMP. Des études génétiques évaluant la présence de mutations de *TP53* et de *KRAS* supportent cette idée vu la non-concordance des mutations retrouvées chez les cellules de la tumeur originale et celles de la récurrence [169]. Sans

raison apparente, environ 10% des LMP présentent une évolution clinique plus agressive qui entrave la survie des patientes de façon similaire à celle des TOV. Des efforts ont été déployés ces dernières années, afin de comprendre ce comportement agressif de certaines LMP. Malgré quelques associations remarquées entre le mauvais pronostic des patientes et le contenu aneuploïde des tumeurs, la haute activité mitotique des cellules, l'architecture MPSC, la micro-invasion et la présence d'implants invasifs, le mystère persiste toujours (revu dans [141, 148, 176, 182, 183]).

### **1.5.2.3 Les tumeurs invasives (TOV)**

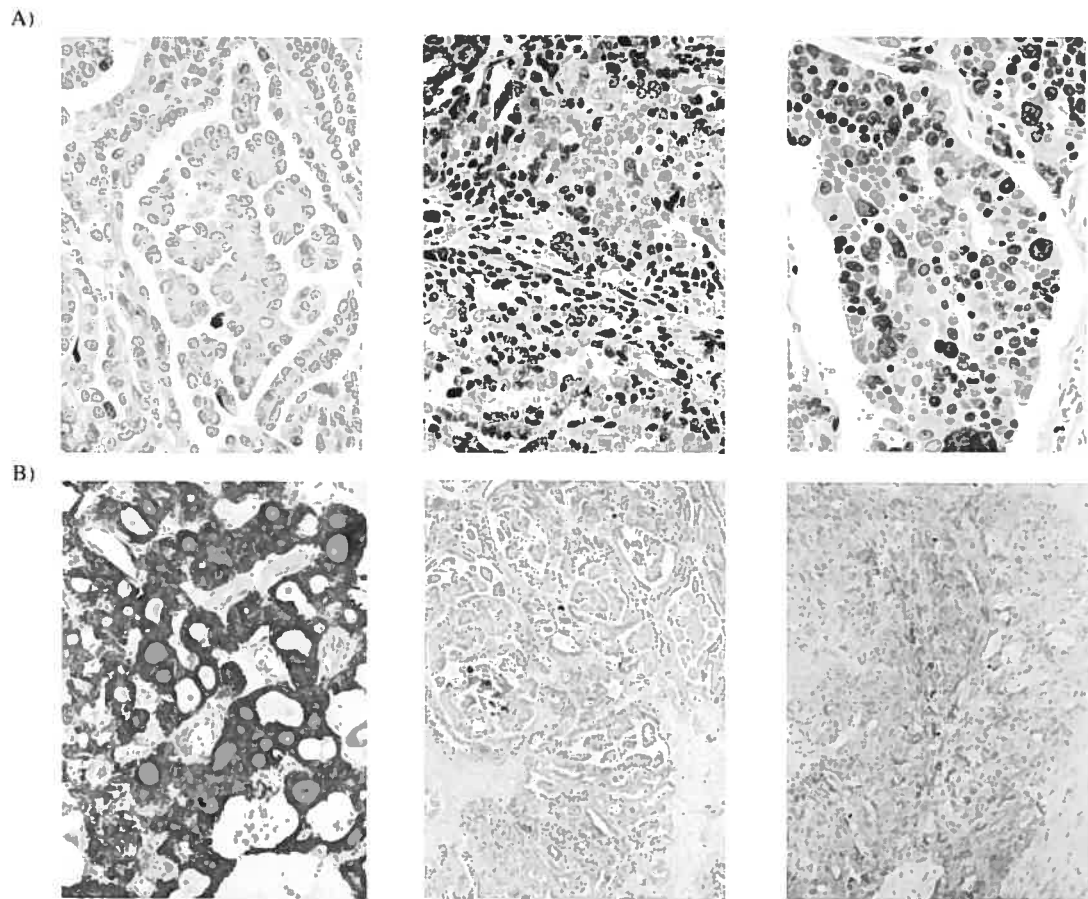
La dernière classe de tumeurs, définie par la FIGO, concerne les tumeurs invasives. Les TOV ne sont généralement pas diagnostiquées chez des femmes de moins de 40 ans. Elles présentent des zones hémorragiques et nécrotiques à l'intérieur d'une masse tumorale solide. Les TOV se distinguent principalement des LMP par leur franche invasion et destruction du stroma ovarien. Au plan architectural, ces tumeurs sont composées de cellules seules ou en petits amas qui prolifèrent en patron angulaire désorganisé dont les frontières sont délimitées et qui traversent le stroma ou semblent flotter dans ce dernier (Figure 13). De plus, la présence d'un stroma desmoplasique (contenant une réaction fibreuse), d'inflammation chronique, d'une haute activité mitotique et d'un nombre important d'atypies cellulaires lui sont propres. Ces tumeurs sont les plus létales et moins de 30% des patientes survivent cinq ans à la suite de leur diagnostic de TOV (revu dans [14, 34, 140, 141]).



**Figure 13 Coupe histologique d'une tumeur invasive**

### **1.5.3 Les grades de différenciation tumorale de l'EOC (G0 à G3)**

Le grade tumoral (G), défini par la FIGO, reflète le degré de différenciation de la tumeur. Initialement, différents systèmes de détermination du grade de la tumeur étaient utilisés et ceci entravait la reproductibilité et la consistance entre les différents observateurs. Dorénavant, la FIGO a adopté un système de gradation universel qui tient compte de trois variables (Figure 14) [184]. La première, l'indice mitotique, varie de 0 à 3 selon le nombre de mitoses retrouvées par champs d'observation. Le second paramètre est le nombre d'atypies nucléaires qui varie également de 0 à 3. Finalement, l'architecture histologique dominante est le dernier critère et est noté '1' lorsque l'architecture est glandulaire (<5% de croissance solide), '2' lorsqu'elle est papillaire (entre 5 et 50% de croissance solide) et '3' lorsqu'elle est solide (>50% de croissance solide). Donc, le grade 0 (G0) représente les LMP alors que les grades 1, 2 et 3 (G1, G2 et G3) représentent, dans l'ordre, les tumeurs invasives bien, modérément et pauvrement différenciées (revu dans [79, 135]).

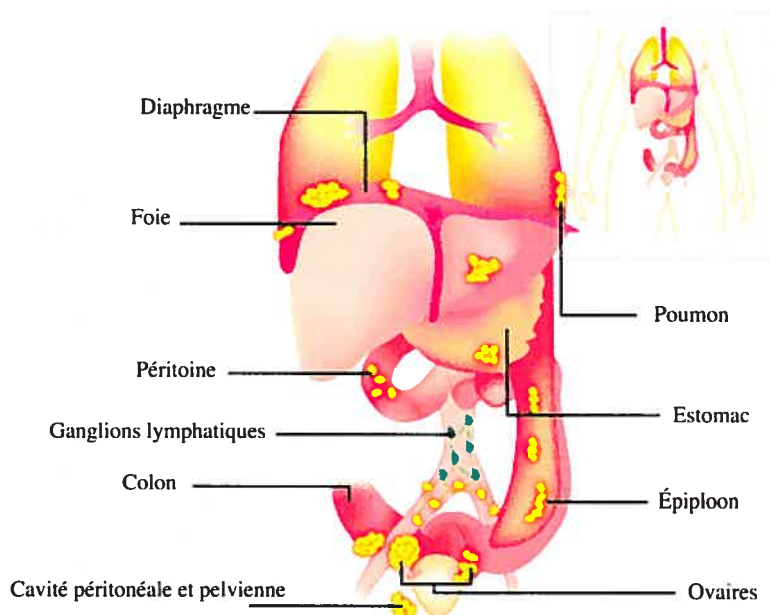


**Figure 14 Coupes histologiques présentant deux aspects considérés par le système de gradation universel adopté par la FIGO (tirée de [184])**

- A) Les atypies nucléaires des tumeurs notées 1 (gauche), 2 (centre) et 3 (droite)**
- B) L'architecture histologique des tumeurs présentée sous forme glandulaire (gauche), papillaire (centre) et solide (droite)**

#### 1.5.4 Les stades de l'EOC (SI à SIV)

La plupart des tumeurs de l'ovaire débutent leur existence par la croissance de cellules tumorales, confinées à l'intérieur des kystes d'inclusion qui sont emprisonnés dans le stroma ovarien. Au fil du temps, la tumeur atteint la surface ovarienne et détruit la capsule, ce qui permet aux cellules malignes d'émerger dans la cavité péritonéale (Figure 15). La dissémination des cellules tumorales dans la cavité abdominale s'effectue selon la circulation normale du liquide péritonéal et les cellules se logent d'abord dans la gouttière para-aortique droite et sous la surface de l'hémi-diaphragme droit. Puisque l'épiploon recouvre les organes de la cavité abdominale, il est préférentiellement et rapidement envahi par les cellules tumorales, les autres organes recouverts de péritoine deviennent une cible facilement atteignable pour les cellules de l'EOC. La dissémination des cellules tumorales peut également se faire selon la voie lymphatique rétro-péritonéale qui draine l'ovaire. D'ailleurs, la majorité des EOC de stade avancé envahissent les ganglions rétro-péritonéaux. Le dernier chemin emprunté par les cellules tumorales est la voie hématogène qui permet leur dissémination vers les sites éloignés dont le poumon, le foie et le cerveau (revu dans [15, 34, 79]). Cette voie est plus tardive et se rencontre surtout chez les patientes dont la progression se présente suite à un long intervalle de temps.



**Figure 15 Représentation du patron de dissémination typique des cellules du cancer épithélial de l'ovaire (adaptée de [www.cancerfacts.com](http://www.cancerfacts.com))**

Lors du diagnostic, l'étendue de la maladie est définie par les différents stades qui évoluent du stade I jusqu'au stade IV (Figure 15). Selon les critères de la FIGO, chaque stade, sauf le IV, peut être qualifié de a, b et c selon l'atteinte (Tableau 1). Brièvement, lorsque la tumeur reste confinée aux ovaires, la maladie est considérée comme étant de stade I. Lorsqu'elle atteint les trompes de Fallope et/ou l'utérus, un stade II est attribué. En présence d'ascite (liquide inflammatoire) contenant des cellules tumorales, d'implants ou d'extensions tumorales dans la cavité péritonéale, la maladie est dite de stade III. Finalement, les patientes atteintes d'une maladie de stade IV présentent des métastases à distance (foie, poumon, cerveau) (revu dans [15, 34, 79]). Les métastases consistent en la prolifération de cellules tumorales dans un foyer secondaire, qui surgit à distance, suite à une dissémination des cellules de la tumeur primaire.

Stade	Description et caractéristiques
I	Tumeur limitée aux ovaires (un ou les deux)
A	Tumeur limitée à un ovaire, la capsule est intacte, absence de tumeurs à la surface de l'ovaire. Aucune cellule maligne dans l'ascite ou lavement péritonéal
B	Tumeur limitée aux deux ovaires, les capsules sont intactes, absence de tumeurs à la surface de l'ovaire. Aucune cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
C	Tumeur limitée à un ou aux deux ovaires en plus d'avoir l'une ou l'autre de ses caractéristiques : rupture de la capsule, présence de tumeur à la surface de l'ovaire, présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
II	Tumeur sur un ou les deux ovaires avec des extensions tumorales sur d'autres tissus pelviens
A	Extensions ou implants présents sur l'utérus et/ou sur les trompes de Fallope. Aucune cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
B	Extensions ou implants présents sur d'autres tissus pelviens. Aucune cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
C	Extensions ou implants présents sur des tissus pelviens et présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
III	Tumeur sur un ou les deux ovaires avec des implants péritonéaux microscopiques confirmés à l'extérieur de la région pelvienne. Tumeur limitée à la région pelvienne proprement dit mais avec présence d'implants sur l'épiploon et le petit intestin. Présence de métastases superficielles sur le foie.
A	Métastases péritonéales microscopiques à l'extérieur de la région pelvienne
B	Métastases péritonéales macroscopiques à l'extérieur de la région pelvienne ayant 2 cm ou moins
C	Métastases péritonéales macroscopiques de plus de 2 cm à l'extérieur de la région pelvienne et/ou présence de métastases sur les ganglions régionaux
IV	Tumeur sur un ou les deux ovaires et métastases à distance. Effusion pleurale avec présence de cellules tumorales et implication du mésenchyme dans les métastases du foie.

**Tableau 1 Stadification du cancer épithélial de l'ovaire (adapté de carcinome de l'ovaire: FIGO Nomenclature; Rio de Janeiro, 1998)**

La stadification adéquate de l'EOC selon la FIGO comporte une inspection et une palpation de toutes les surfaces péritonéales, un lavage péritonéal, une hystérectomie totale (résection de l'utérus), une salpingo-ovariectomie bilatérale (résection des ovaires et de trompes de Fallope), une épiploectomie (résection de l'épiploon), des biopsies péritonéales de toutes lésions où des métastases sont suspectées ou une biopsie péritonéale aléatoire lorsque aucune lésion macroscopique n'est visible. Lorsque des lésions de plus de 2cm sont observées, un échantillonnage des ganglions régionaux est recommandé. La FIGO recommande également la prise d'une radiographie des poumons et du foie afin de déterminer la présence d'effusion pleurale ou de métastases hépatiques (revu dans [15, 34, 70, 79]).

## **1.6 HYPOTHÈSE D'UN CONTINUUM DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'EOC**

Un autre sujet faisant couler beaucoup d'encre dans le domaine de l'EOC est la possibilité d'un continuum entre les tumeurs BOV, LMP et TOV (revu dans [37, 70, 148, 185, 186]). Certaines études suggèrent que les voies moléculaires impliquées dans le développement des BOV, LMP et TOV sont distinctes tandis que d'autres supportent la thèse du continuum [37, 39, 169, 187-202] (et revu dans [34, 70, 148, 203]).

Puisque les BOV sont enlevées, de façon générale, dès leur diagnostic, leur histoire naturelle demeure pratiquement inconnue. Seules des évidences circonstanciées suggèrent que certaines TOV se développent à leur dépend. Ces évidences incluent une augmentation de l'incidence des TOV en fonction de l'âge, comparativement aux BOV et LMP du même type histopathologique qui surviennent chez des patientes plus jeunes. Aussi, la fréquence du diagnostic de BOV est augmentée de cinq fois chez les femmes ayant une fratrie du premier ou du second degré atteinte de TOV [204]. Il est à noter toutefois que ces femmes sont suivies plus étroitement que celles de la population générale, ce qui apporte un biais dans l'observation. Il a également été noté qu'un grossissement de la tumeur, visualisé par imagerie médicale, survenait

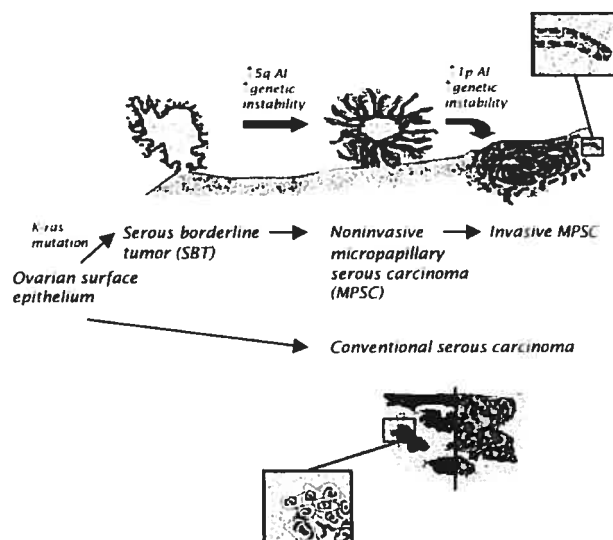


avant un diagnostic de TOV [205]. Finalement, la dernière évidence est la présence de combinaisons diverses de BOV, LMP et TOV à l'intérieur d'un même spécimen [206] (et revu dans [15, 34, 37]).

Des études au niveau moléculaire ont montré que les BOV, tout comme les LMP séreux, présentent rarement des mutations de *TP53* ou des surexpressions de p53 alors qu'elles sont courantes chez les TOV du même type [207-209]. Cependant, la théorie selon laquelle les cellules acquièrent des modifications de p53 en cours de transformation peut être discutée. Seule une faible proportion de BOV associée à une TOV (6%, 2/24) présentent des changements génétiques et cytologiques similaires [210, 211]. Une autre interprétation de ces résultats est que cet épithélium d'apparence bénigne consiste en fait en une maturation morphologique de l'épithélium malin et n'indique pas une existence de précurseur bénin. Des études de LOH ont montré une forte fréquence (70%) de perte d'hétérozygotie chez ces BOV. Des marqueurs présents sur au moins un des chromosomes 6, 7, 9, 11 ou 17, fréquemment atteints chez les TOV, appuient également l'implication d'un continuum contrairement aux études d'expression génique qui dévoilent des différences significatives dans les profils moléculaires des BOV et des TOV séreux [212, 213] (et revu dans [37]).

Un modèle dualistique qui concerne la pathologie séreuse de l'EOC a récemment été proposé et cette théorie est de plus en plus acceptée dans la communauté scientifique (Figure 16). Dans ce modèle, la plupart des TOV de haut grade (G2-G3) se développent à partir de l'OSE ou de ses inclusions kystiques, selon un mécanisme encore obscur, mais qui implique des mutations de *TP53*, *BRCA1* et/ou *BRCA2* [200]. De leur côté, les TOV de bas grade (G1), qui sont moins fréquentes, se développent selon une séquence BOV-LMP-TOV. Ce continuum implique la progression d'une BOV séreuse vers une LMP séreuse typique, puis vers une MPSC pour terminer en TOV séreuse de bas grade [188, 200]. Ce continuum est supporté par le fait que les BOV et les LMP partagent rarement les caractéristiques des TOV de haut grade contrairement à celles des TOV de bas grade. Par exemple, contrairement aux TOV

de haut grade (60% mutés), ces tumeurs n'exhibent pas de mutations du gène *TP53* et/ou la surexpression de sa protéine. Ces mutations semblent acquises très tôt puisque l'OSE et les kystes d'inclusions adjacents à une TOV de haut grade présentent une immunoréactivité accrue à p53 [188, 193, 196, 198, 199, 214]. De plus, les LMP et les TOV de bas grade ont un taux similaire de mutation de *KRAS* qui est plus élevé (27 à 36%) que chez les TOV de haut grade (0 à 12%) [39, 169, 188, 189, 193, 198, 199, 202, 215] (revu dans [70, 148, 195]). Aussi, entre 33 et 50% des LMP et des TOV de bas grade présentent des mutations de *BRAF* tandis qu'aucune TOV de haut grade n'a montré ce type de mutation [188, 193, 194, 200, 201, 216, 217]. Les mutations de *KRAS* et de *BRAF* sont mutuellement exclusives puisqu'elles ne surviennent pas dans une même tumeur LMP et elles recouvrent approximativement 60% d'entre elles (revu dans [37, 70, 148]). Ces mutations sont également présentes dans des BOV ce qui suggère leur altération précoce dans le continuum vers les TOV de bas grade. De plus, la fréquence de perte d'hétérozygocité (LOH) augmente graduellement entre les LMP typiques, les MPSC et les TOV de bas grade tandis qu'une forte fréquence de LOH est observée chez les TOV de haut grade et ce, même dans de minuscules foyers tumoraux. Ces différences génétiques entre les tumeurs séreuses LMP et les TOV de haut grade (G2-G3) laissent supposer qu'elles proviennent de voies génétiques différentes [187, 198-201, 215-219] (et revu dans [37, 148, 186]).



**Figure 16 Représentation schématique du modèle dualistique du développement du cancer épithélial de l'ovaire (tirée de [200])**

Le cas des tumeurs d'histopathologie mucineuse est cependant différent car, contrairement aux tumeurs de type séreux, des similarités dans les altérations géniques existent entre les BOV, LMP et TOV ce qui suggère une continuité dans la progression de la maladie. Les tumeurs mucineuses présentent fréquemment des mutations de *KRAS*. Des études effectuées sur des tissus micro-disséqués de 20 tumeurs mucineuses, présentant les 3 classes de tumeurs dans le même échantillon ont montré, chez la moitié d'entre elles, la présence de mutations identiques de *KRAS* et ce tant dans les portions de BOV, LMP que dans celles de TOV (revu dans [34, 37, 70, 148]).

## **1.7 PRÉSENTATION CLINIQUE DE L'EOC**

### **1.7.1 Les symptômes de l'EOC**

Le 'tueur silencieux', 'la maladie qui murmure ou qui chuchote' sont des noms bien portés par l'EOC. L'absence de symptôme, la banalité ou la non-spécificité de ceux-ci à des stades précoces (ex. constipation et fréquente miction) font en sorte que plus de 70% des patientes atteintes d'EOC sont diagnostiquées à des stades avancés de la maladie (SIII-SIV). De plus, bien camouflée dans l'abdomen, la tumeur peut croître aisément sans gêner les mouvements de la patiente et reste donc asymptomatique. Pour quelques patientes chanceuses et/ou très à l'écoute de leur corps, de la douleur, une pression ou une distension de leur abdomen peuvent être perçues (revu dans [34, 79]). Aux stades avancés de la maladie, les symptômes retrouvés sont associés à l'implication de l'épiploon ou à l'atteinte de l'intestin. Ils peuvent survenir sous forme d'une distension abdominale, de constipation, de ballonnements, d'anorexie, de nausées et/ou d'une satiété rapide dus à la pression faite sur l'estomac par l'ascite, les métastases et/ou la tumeur elle-même (revu dans [34, 79]).

### **1.7.2 Les techniques de dépistage de l'EOC**

Afin de réduire la morbidité liée à l'EOC, sa détection à un stade précoce par un programme de dépistage dans la population serait nécessaire. Toutefois, aucun marqueur à ce jour n'est assez spécifique et sensible pour servir au diagnostic précoce de l'EOC. De plus, la faible incidence de l'EOC en comparaison aux coûts engendrés par un tel programme reste discutable. À ce jour, la seule technique de dépistage reste l'examen gynécologique effectué seulement chez les patientes qui consultent de façon routinière leur médecin. Toutefois, étant donné la localisation des ovaires et la nature subjective du test (palpation), les tumeurs peuvent passer inaperçues même sous les mains des cliniciens expérimentés. Lorsque le médecin soupçonne la présence d'une masse à l'ovaire, la confirmation du diagnostic est effectuée par un ultra-son et par une mesure du niveau de CA125 sanguin. Cet antigène tumoral a été identifié en

1981 suite à la reconnaissance, par un anticorps monoclonal murin, d'une glycoprotéine membranaire présente sur une TOV séreuse [220, 221]. Ce n'est qu'en 2001 que deux groupes de chercheurs ont réussi à cloner le CA125 et la présence d'un large domaine mucine qui lui a valu l'appellation de mucine 16 (MUC16) [222, 223]. Les fonctions de cette protéine restent encore très équivoques, mais le CA125 semble protéger les cellules tumorales de la cytolyse effectuée par les cellules immunitaires NK [224]. Cependant, il sert de marqueur de différenciation épithéliale de même que pour la détection des tumeurs de l'ovaire ou celles dérivées des canaux müllériens (revu dans [26]). Chez une femme saine, le CA125 n'est pas exprimé par l'OSE, mais devient surexprimé dans un contexte de tumeur ovarienne chez certaines patientes (82%) [221]. Cette réexpression du CA125 par les cellules suggère que l'OSE a conservé la compétence de l'épithélium coelomique à se différencier en contexte de pathologies (revu dans [26]). Un niveau sérique supérieur à 35U /mL (3 écart-type supérieur aux patientes saines) indique une élévation significative du marqueur CA125 et est observé chez 23 à 50% des patientes avec l'EOC de stade I et augmente à 90% chez celles de stade II (revu dans [15, 34, 79, 225]). Le niveau de CA125 varie en fonction du cycle menstruel et se retrouve également surexprimé chez certaines patientes atteintes de BOV, de diverses pathologies gynécologiques (ex. cancer du sein, myome utérin, salpingite et endométriose) ou non-gynécologiques (ex. insuffisance hépatique ou rénale, hépatite, péritonite, pancréatite et cancer gastrique). Le niveau de CA125 sanguin varie également selon l'âge de la patiente puisque seule 15% des patientes EOC de moins de 50 ans présentent une augmentation du CA125 comparativement à 80% de celles ayant plus de 50 ans. La sensibilité de ce marqueur pour distinguer les BOV et TOV varie entre 71 et 82% selon l'étude pour une spécificité de 75 à 94% (revu dans [15, 34, 79, 225]). Dans ces conditions, l'utilisation du CA125 seul comme outil diagnostique de l'EOC pourrait inquiéter inutilement des patientes atteintes de BOV qui présentent un niveau élevé de CA125 ou, au contraire, laisserait l'EOC non-détecté chez une patiente atteinte en stade précoce ou dont la tumeur n'exprime pas le CA125. De plus en plus, les chercheurs se tournent vers une combinaison de marqueurs afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic d'EOC. L'évaluation du

niveau de CA125 sérique sert toutefois pour le suivi des patientes traitées afin de détecter une progression de leur maladie ([15, 34, 79, 225]).

### **1.7.3 Les interventions thérapeutiques associées à l'EOC**

Comme décrit brièvement ci-dessus, lorsque la présence d'une tumeur est suspectée suite à un examen physique, une mesure de CA125, mais également par imagerie transvaginale par ultra-sons, la patiente est prise en charge et subit généralement une chirurgie de cytoréduction tumorale. Cette intervention varie selon la classe de la tumeur diagnostiquée et du stade de la maladie [114]. Les traitements peuvent impliquer une chirurgie minimale et conservatrice où seulement la portion tumorale est réséquée ou une chirurgie invasive où l'exérèse de plusieurs organes est effectuée. De plus, des traitements adjuvants de chimiothérapie et/ou radiothérapie peuvent être administrés. Les paragraphes qui suivent tenteront de mieux définir les traitements possibles selon la nature des tumeurs épithéliales de l'ovaire.

#### **1.7.3.1 La chirurgie**

Lorsque l'équipe médicale soupçonne la présence d'une BOV, une ovariectomie unilatérale ou bilatérale est effectuée selon le nombre d'ovaire(s) touché(s). Lorsque la taille de la tumeur est inférieure à 10 cm, son exérèse peut s'effectuer par laparoscopie, une chirurgie moins incommode pour la patiente. Lors de cette intervention, le chirurgien procède à de petites incisions lui permettant d'introduire l'instrument de visualisation, le laparoscope, de même que les pinces et les ciseaux. La tumeur est par la suite ensachée et amenée à la surface de la peau, drainée de son contenu et extirpée de la cavité abdominale par une petite incision. L'utilisation du sac lors de cette chirurgie est nécessaire afin d'éviter la dissémination de cellules tumorales dans le cas où la BOV s'avérerait être en fait une tumeur maligne.

La patiente atteinte d'une LMP de stade I peut bénéficier d'une chirurgie conservatrice. Ceci est avantageux puisque les LMP sont généralement diagnostiquées

chez les patientes jeunes qui désirent conserver leur fertilité. Cette chirurgie conservatrice se traduit par une ovariectomie unilatérale ou une kystectomie durant laquelle seul l'ovaire atteint ou la portion tumorale de ce dernier est retiré. Ce type d'intervention, en comparaison avec une approche plus radicale, n'entrave aucunement la survie des patientes bien que le risque de récurrence augmente. Cependant, dans le cas des patientes LMP de stade plus avancé, l'hystérectomie (résection de l'utérus), la salpingo-ovariectomie uni- ou bi-latérale (exérèse d'un ou des deux ovaires et leurs trompes de Fallope annexées) et la stadification complète de la maladie sont recommandés. Chez ces femmes ayant une maladie de stade précoce (SI et SII), la chirurgie est généralement curative et les patientes restent simplement sous surveillance médicale après l'intervention. Pour la fraction des LMP qui sont diagnostiqués à un stade élevé de maladie (SIII) et qui sont associés à des implants invasifs, le traitement chirurgical est équivalent à celui des TOV. La cytoréduction tumorale s'effectue par laparotomie où une incision verticale expose l'abdomen de même que la région pelvienne ce qui rend accessibles les régions potentiellement atteintes par l'EOC (revu dans [15, 34, 79, 114, 226]).

Lorsqu'une patiente reçoit un diagnostic de tumeurs invasives de bas grade (G1) et de stade précoce (SI et SII), le chirurgien procède généralement à une laparotomie exploratrice, une cytologie péritonéale, une hystérectomie totale, une salpingo-ovariectomie bilatérale et une épiploectomie (revu dans [15, 34, 79, 114]). En plus de l'exérèse des organes typiques décrite précédemment, une patiente diagnostiquée avec une TOV de stade avancé (SIII ou SIV) subit aussi une lymphadénectomie (résection des ganglions), des biopsies aléatoires et ciblées de différents tissus et la résection de plusieurs autres portions d'organes (intestin, péritoine, etc) dans le but d'atteindre une cytoréduction optimale de la tumeur [114].

Toutefois, pour les patientes désirant conserver leur fertilité, une salpingo-ovariectomie unilatérale peut être effectuée dans la mesure où seulement un des ovaires est touché et que la stadification a été faite de façon adéquate et minutieuse. Ces patientes ayant des tumeurs de G1 et de SIA, doivent être choisies

minutieusement et surveillées adéquatement par la suite [227]. Bien que le traitement chirurgical seul peut être curatif chez les patientes de stade précoce (SI) [228], certaines auront une maladie progressive et de 10 à 30% d'entre elles en décéderont [229]. Ces patientes de G1 à haut risque de récurrence à la suite de la chirurgie peuvent recevoir un traitement de chimiothérapie qui réduit leur risque de rechute d'environ 80% et améliore, dans certain cas, leur survie globale [230-233]. Ces patientes de haut risque présentent soit un stade IC ou II ou encore une tumeur de G3. Vu les bienfaits sur l'éloignement de la récurrence et l'augmentation de la survie globale des patientes de G1 à haut risque, une chimiothérapie leur est généralement prescrite.

Lorsque les patientes présentent une maladie avancée (SIII-SIV) avec de l'ascite, des métastases ou une carcinomatose, leur pronostic demeure sombre et ce malgré le bénéfice obtenu par une cytoréduction tumorale optimale [234-236]. Pour ce groupe de patientes au pronostic sombre, le chirurgien peut décider d'effectuer une chirurgie de cytoréduction par intervalle qui consiste à effectuer l'opération après avoir traité la patiente avec 2 ou 3 cycles de chimiothérapie [237]. Ceci permet de diminuer la taille de la tumeur et de ses métastases afin de faciliter l'intervention et favoriser une réponse subséquente au traitement de chimiothérapie proposé et donc d'améliorer le pronostic des patientes [238]. Cependant, ces patientes semblent avoir une survie globale équivalente à celles ayant eu les traitements dans l'ordre conventionnel, bien que cette pratique demeure toujours à l'étude (revu dans [34, 79, 114]).

### **1.7.3.2 La chimiothérapie et la radiothérapie**

Le traitement adjuvant standard consiste en une combinaison d'agents chimiothérapeutiques de la catégorie des platines qui inclut le carboplatine ou le cisplatine de même que la catégorie des taxanes dont le paclitaxel et le docétaxel. Les platines sont des agents alkylants qui interfèrent avec la synthèse d'ADN en formant des liens intra- et inter-hélice. Les taxanes, quant à elles, inhibent la division cellulaire en empêchant la formation et la réorganisation des microtubules. La carboplatine et la cisplatine sont les agents qui s'avèrent offrir la meilleure stratégie



pour allonger l'intervalle libre de progression des patientes EOC, sans toutefois influencer leur survie globale [239]. Cet interval représente le temps entre le début du traitement et le début de la progression. Les platines utilisées en combinaison avec les taxanes se sont montrées plus efficaces à la même dose que les platines seules avec une réponse de 90% [240-242]. Bien que 80% des patientes avec une maladie avancée répondent initialement aux traitements de chimiothérapie, la majorité d'entre elles récidivent par la suite. Malgré cela, entre 10 et 30% de ces patientes bénéficient de ces traitements et voient leur survie se prolonger.

Il est à noter toutefois que les traitements de chimiothérapie ne sont pas administrés systématiquement à toutes les patientes. Pour celles diagnostiquées avec une LMP de stade précoce, aucun traitement de chimiothérapie n'est prescrit puisqu'aucun bénéfice n'a été observé. L'administration de chimiothérapie par voie veineuse est réservée aux patientes atteintes de LMP de stade avancé qui présentent des implants invasifs, une maladie résiduelle importante ou une progression [243] (et revu dans [34, 143, 226]). Toutefois, le bienfait de la chimiothérapie dans leur cas est encore discuté, mais leur survie varie entre 64 et 96% [243]. Un sous-groupe de patientes LMP (12 à 14%) ont un destin plus sombre puisque la progression de leur maladie se fait rapidement. L'aneuploïdie des tumeurs semble associée à un pronostic défavorable pour les patientes LMP âgées de plus de 60 ans dont la survie 15 ans après le diagnostic est de 20% comparativement à 75% pour les autres LMP [244-246]. La prise en charge des patientes dont les LMP se présentent avec des implants invasifs reste controversé puisque ces derniers confèrent un risque quatre fois plus élevé de récurrence et 6 fois plus élevé de décès comparativement aux implants non-invasifs. Encore une fois, une amélioration de la survie ou de l'intervalle libre de progression suite à l'administration de chimiothérapie n'a pas été établie pour ce type de tumeur. L'inefficacité de la chimiothérapie dans leur cas peut être expliquée par la faible activité mitotique de ces tumeurs [183].

Plus récemment, une approche est née d'études de modélisations pharmacologiques tenant compte des caractéristiques physiologiques et anatomiques de la cavité

péritonéale de même que des propriétés chimiques des agents anti-néoplasiques utilisés. Ces caractéristiques suggèrent que l'administration intra-péritonéale de larges volumes d'agents chimiothérapeutiques pour les tumeurs péritonéales, dont l'EOC, confère un avantage pharmacologique en comparaison avec l'administration par voie veineuse [247]. Plusieurs études cliniques ont montré que cette voie d'administration est propice et adéquate pour toutes les patientes bien que plus complexe. Par contre, dans 20 à 30% des cas, la présence d'adhérences tumorales entrave la distribution uniforme de l'agent [248-250]. Plusieurs études ont montré des résultats encourageants suite à l'administration de divers agents chimiothérapeutiques par voie intrapéritonéale [251-260] (et revu dans [34, 79, 114]).

L'utilisation de la radiothérapie reste encore controversée pour le traitement des patientes EOC puisque le choix de l'administration, des doses à utiliser de même que des patientes à sélectionner restent imprécis. Un bénéfice a été observé pour les patientes qui reçoivent de la radiothérapie abdomino-pelvienne pour traiter de la maladie résiduelle minimale suite à la première chirurgie. Ce bénéfice semble supérieur à celui procuré par la radiation pelvienne seule ou combinée à un agent alkylant [261-263]. Les doses pouvant être administrées de façon sécuritaire dans la cavité abdominale sont considérablement plus faibles que celles requises pour traiter de façon efficace les tumeurs solides puisque la tolérance des organes de la cavité abdominale est faible. Donc, seules les patientes avec un minimum de maladie résiduelle (microscopique) peuvent en bénéficier ou encore, ce traitement peut être administré de façon palliative dans certaines circonstances particulières (revu dans [34]).

### **1.7.3.3 Le suivi et la progression de l'EOC**

Les patientes diagnostiquées avec l'EOC bénéficient d'un suivi médical rigoureux. Ce dernier comprend un examen médical par palpation, une prise de CA125 trimestrielle durant les deux premières années et biannuelle pour les années subséquentes. Lorsque le médecin soupçonne la présence d'une masse, une requête

pour des visualisations par imagerie est demandée. Elle peut s'effectuer soit par tomodensitométrie (CT scan), par résonance magnétique (IRM) et/ou par tomographie par émission de positron (PET scan). Le CT scan utilise un équipement de rayon-X afin de produire des images multiples de l'intérieur du corps et un ordinateur les assemble et les montre en différentes sections. L'IRM utilise des ondes de fréquence-radio et un champ magnétique puissant plutôt que des rayons-X pour générer les images des organes et des tissus internes. Finalement, le PET scan consiste en l'acquisition d'images physiologiques basées sur la détection de radiations provenant de l'émission de positrons (particules radioactives administrées aux patients).

La progression de l'EOC se définit à plusieurs niveaux et des procédures ont été mises en place afin de déterminer la progression (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor; RECIST) [264]. Les critères de progression consistent en une augmentation du niveau de CA125 au-dessus d'un seuil arbitraire (environ 100U/mL) ou son augmentation séquentielle au fil du temps, une augmentation de la taille de la masse tumorale de 25% ou plus, une apparition de nouvelles lésions ou la mort de la patiente [264, 265]. De façon générale, l'EOC resurgit préférentiellement dans la cavité péritonéale sous forme d'une carcinomatose diffuse de même que dans l'apex vaginal. Afin de mieux définir la réponse aux traitements de première ligne, une chirurgie de second regard était pratiquée anciennement et il a été montré que malgré une réponse clinique complète, la moitié des patientes présente une progression lors de la chirurgie de suivi et l'autre moitié récidive à un moment ou l'autre. Cette réalité fait de l'EOC une maladie chronique, de laquelle les patientes ne guérissent pas. Elles subissent plutôt différentes phases de progression, de traitement et de rémission pour en décéder dans la majorité des cas [265]. De façon générale, l'intervalle libre de progression d'une patiente traitée par chirurgie et chimiothérapie de combinaison (cisplatine/paclitaxel) est, en moyenne, de 18 mois [266, 267] (et revu dans [265]). Pour ces patientes dont la maladie progresse, une seconde ligne de traitement est proposée. Le taux de réponse de ces interventions de deuxième ligne est sensiblement

identique bien que ce dernier chute en fonction du nombre de thérapies consécutives administrées [241, 268].

#### **1.7.3.4 Les interventions de seconde ligne**

La progression de la maladie peut aussi survenir en cours de traitement lorsque la patiente ne répond pas aux agents chimiothérapeutiques. Les patientes qui progressent en moins de 3 mois sont dites réfractaires au traitement de chimiothérapie, celles qui le font en moins de 6 mois sont résistantes et celles qui le font après plus de 6 mois sont dites sensibles [265]. Lors d'une progression, les patientes sensibles peuvent subir une seconde ronde de traitement avec le même agent chimiothérapeutique bien que ceci semble bénéfique seulement pour les patientes dont la réponse initiale était complète pour au moins 12 mois sans développement de carcinomatose (revu dans [79]). Dans le cas des patientes réfractaires ou résistantes, l'administration d'une thérapie similaire n'est pas recommandée puisque seulement 10% d'entre elles y répondent [269, 270]. Par contre, des bénéfices cliniques peuvent être obtenus pour ces patientes au cours d'une seconde ronde de traitement utilisant d'autres agents. Ceux-ci comprennent le topotécan, la doxorubicine, la gemcitabine, l'étoposide, le paclitaxel, le docétaxel et les platines (revu dans [79, 114, 265]). Ces traitements de deuxième ligne ne sont malheureusement pas curatifs, mais ils visent le contrôle de la maladie et l'amélioration de la qualité de vie de la patiente. La décision de traiter les patientes est influencée par leur réponse initiale et le nombre de traitements chimiothérapeutiques subis de même que par la toxicité potentielle cumulée de ces thérapies. De plus, l'état général de la patiente, le volume de la maladie, la présence d'ascite et les symptômes gastro-intestinaux peuvent être considérés lors de la prise de décision [265]. Les patientes dont la progression est rapide sous les différents agents de chimiothérapie standard peuvent être incluses dans des études cliniques où des nouveaux agents, de nouvelles combinaisons de ceux-ci ou de nouveaux modes d'administration sont étudiés dans le but d'en vérifier les effets et les projeter éventuellement en thérapie de première ligne.

La résistance au traitement de chimiothérapie peut être intrinsèque à la tumeur ou acquise suite à l'administration de l'agent. Cette résistance acquise est instable et peut s'estomper avec le temps. À cet effet, l'allongement du temps entre les traitements peut conduire à la perte de cette résistance acquise. Lors du traitement de seconde ligne, plusieurs agents aux modes d'actions différents sont disponibles et ne confèrent pas de résistance croisée à la carboplatine ou au paclitaxel. L'augmentation de l'intervalle sans platine peut être favorisée grâce à l'administration d'une chimiothérapie de seconde ligne sans cet agent ce qui améliore le pronostic des patientes en augmentant la sensibilité des tumeurs aux platines lors de son utilisation subséquente [271] (et revu dans [265]).

## **1.8 LES FACTEURS PRONOSTIQUES DE L'EOC**

Plusieurs facteurs se sont montrés associés au pronostic de la patiente atteinte d'EOC. La considération de différents facteurs pronostiques permet une prise en charge plus adéquate de la patiente. Les paragraphes qui suivent définissent quelques-uns de ces facteurs pronostiques.

### **1.8.1 L'âge au diagnostic**

L'âge au diagnostic est associé à la survie des patientes puisqu'il a été montré que 70% des patientes de moins de 45 ans survivent toujours après 5 ans après leur diagnostic comparativement à un faible 20% chez les patientes plus âgées (75 à 99 ans) (revu dans [34, 79, 272]).

### **1.8.2 La maladie résiduelle**

Le facteur pronostique le plus prédictif est sûrement la maladie résiduelle ou résidu. La survie des patientes dépend de la dimension des foyers de tumeur qui persistent suite à la chirurgie de cytoréduction. De ce fait, les patientes qui ne

présentent aucune maladie résiduelle survivent plus longtemps que celles dont les foyers ont une taille inférieure à 0.5cm (dans leur plus grande dimension), qui à leur tour ont un meilleur pronostic que les patientes chez qui des foyers de 0.5cm à 1.5cm sont visibles. Finalement, le pronostic le plus sombre est conféré aux patientes dont les foyers tumoraux résiduels atteignent plus de 2cm [234-236, 273-275] (et revu dans [15, 34, 35, 79, 272]). De plus, les patientes dont la cytoréduction est optimale (foyers <2cm) ont plus de chance d'obtenir une rémission complète suite aux traitements de chimiothérapie et ont un intervalle libre de progression plus long que celles dont la cytoréduction est sub-optimale (foyers >2cm). Enfin, les patientes de stade IV, dont la cytoréduction est optimale ont une survie médiane de 32-36 mois comparativement à une médiane de 10-16 mois pour celles dont la chirurgie s'est avérée non-optimale [276, 277] (et revu dans [34, 79, 265, 272, 278]).

### **1.8.3 Le grade de différenciation tumoral**

Le pronostic de la patiente varie également en fonction du grade histologique de la tumeur. Environ 90% des patientes diagnostiquées avec une tumeur de G1 survivent au moins cinq ans après leur traitement (chirurgie et/ou chimiothérapie). Le taux diminue à 85% pour les patientes affligées de tumeurs de G2 et chute à seulement 30% pour celles ayant des tumeurs de G3 [279] (et revu dans [79, 272, 280]).

### **1.8.4 Le stade de la maladie**

Tout comme le résiduum, le stade de la maladie est l'un des principaux facteurs pronostiques de l'EOC puisque ce dernier est inversement proportionnel à la survie des patientes (revu dans [34, 35, 79, 225, 265, 272, 277, 280]). En effet, le taux de survie des patientes cinq ans après leur diagnostic chute de 80-90% pour les SI, à 70% pour les SII, à 40% pour les SIII pour atteindre moins de 25% chez les patientes diagnostiquées avec une maladie de stade IV [278, 281-283].

### **1.8.5 Le type histopathologique**

L'histopathologie de la tumeur a également été montrée comme étant associée à la survie des patientes (revu dans [15, 34, 79, 138, 272, 277, 280]). Globalement, ce sont les tumeurs séreuses et indifférenciées qui confèrent un pronostic plus sombre aux patientes qui les développent. Cependant, les patientes qui présentent un EOC de stade IV d'histopathologie mucineuse ou à cellules claires ont une survie encore plus limitée associée à leur faible réponse à la chimiothérapie [137, 284].

### **1.8.6 Le statut des gènes *BRCA***

La présence de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2*, semble elle aussi affecter le pronostic des patientes qui les portent. En fait, plusieurs études ont montré l'effet protecteur de ses mutations sur la survie des patientes [285-290] bien que quelques rares études ont présenté des résultats contradictoires [291, 292]. La survie accrue des patientes porteuses de ces mutations découle, entre autres, du fait qu'elle répondent mieux au traitement de chimiothérapie [286, 289].

## **1.9 DESCRIPTION DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE L'EOC**

En plus des connaissances et des observations du comportement clinique de l'EOC, des études au niveau moléculaire ont été effectuées afin de caractériser les dessous de ce cancer. Comme la plupart des cellules normales desquelles émergent les différents cancers, les cellules de l'OSE subissent des altérations génétiques et épigénétiques sous-jacentes à leur transformation en EOC.

C'est par différentes analyses génétiques tel que l'hybridation génomique comparative (CGH), la perte d'hétérozigocité (LOH), le caryotypage classique ou spectral (SKY) et l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) que divers groupes ont pu mettre en évidence la perte, le gain ou la translocation de régions chromosomiques

contenant des gènes dont l'inactivation ou la dérégulation d'expression jouent un rôle dans la tumorigenèse ovarienne. Cependant, l'étude du caryotype des cellules de l'EOC montre un haut degré de complexité puisque, dans la majorité des cas, de multiples réarrangements chromosomiques sont présents suggérant une forte instabilité génomique des cellules de l'EOC [293]. Le défi est donc de déterminer quelles aberrations ont un rôle primordial à jouer dans le développement de l'EOC et lesquelles ne se retrouvent altérées que par contiguïté chromosomique. Les régions des chromosomes 7p, 7q, 9p, 11q, 13q et 17p sont perdues à des stades précoces d'EOC [294, 295] tandis que plusieurs autres régions localisées sur les chromosomes 1p, 1q, 3p, 6p, 6q, 9q, 11p, 12p, 12q, 13p, 16q, 17p, 19q, Xp sont modifiées au cours de la progression de la maladie [218, 293, 296-301] (revu dans [122, 302, 303]). Des amplifications de régions chromosomiques ont également été mises en évidence pour les chromosomes 1q, 3q, 5p, 7q 8q, 12p, 17q, 20p et 20q [304, 305] (revu dans [122, 302, 303]).

L'altération d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs a aussi été mise en évidence puisque les oncogènes tels que *cMYC*, *KRAS*, *ERBB2*, *EGFR*, *cFMS*, *PIK3* et *AKT2* ont été vu mutés, amplifiés et/ou surexprimés chez les tumeurs malignes ovariennes. Les patientes qui présentent une expression incontrôlée de certains de ces gènes et de leurs protéines ont une survie plus courte que les autres (revu dans [26, 306-308]). Toutefois, contrairement à ce qui est constaté pour le cancer du colon, l'altération des gènes menant au développement de l'EOC ne semble pas survenir selon un patron spécifique et chronologique (revu dans [122, 309, 310]) Dans l'EOC, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dont *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *ARHI* et *TGFBR2* se présentent également avec une expression altérée ou encore sous une forme non-fonctionnelle du produit de leur gène (et revu dans [26, 122, 123, 308, 311]). Par exemple, plus de 50% des tumeurs de stade élevé présentent une mutation dans le gène de *TP53* empêchant ce gardien du cycle cellulaire de veiller adéquatement à ses fonctions. Aussi, les mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2* semblent être sous-jacentes à la plupart des cancer familiaux.



Des modifications épigénétiques sont également responsables de la dérégulation de l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs. À première vue, la présence des mutations de *BRCA1* et *BRCA2* dans les formes héréditaires de l'EOC laissait supposer que ces gènes, composés de 22 exons qui s'étendent sur environ 100kB, pourraient être affectés par des mutations dans les EOC sporadiques. Malgré les efforts fournis pour les mettre en lumière, seuls de très rares cas d'EOC sporadiques montrent une altération des séquences géniques de ces suppresseurs de tumeur (revu dans [123, 129, 312]). Cependant, l'implication de *BRCA1* dans l'EOC sporadique semble cruciale puisque son expression est réduite ou absente dans une proportion des tumeurs pouvant atteindre 90% et ce, de tant au niveau de l'ARN que de la protéine [313-316] (et revu dans [123]). Certaines évidences suggèrent que l'altération de *BRCA1* s'effectue par un processus épigénétique de méthylation de son promoteur chez une certaine proportion des EOC sporadiques ayant ou non perdu un allèle de ce gène [316-318] (et revu dans [123]). Aussi, d'autres évidences suggèrent une altération dans la régulation transcriptionnelle par l'activateur Gabp (GA-binding protein ou Nrf2), membre de la famille des facteurs de transcription ETS, et les répresseur Ets2 et Id4 [319, 320] (et revu dans [123]). Brca1 joue un rôle significatif dans le maintien de la stabilité génomique puisqu'il interagit directement ou indirectement avec plusieurs protéines aux fonctions diverses incluant des suppresseur de tumeurs (ex. Brca2, p53, Rb et Atm), des oncogènes (ex. c-Myc, caséine kinase II et E2f), des régulateurs du cycle cellulaire (cyclines et Cdk), des activateurs transcriptionnels (polymérase à ARN II, RHA, histone déacétylase), mais est aussi des protéines requises dans la réparation de l'ADN (Rad50 et Rad51) et la reconnaissance de dommages à l'ADN (complexe associé à *BRCA1*) (revu dans [123, 129, 312]). L'altération de son expression dans l'EOC favorise donc l'instabilité génomique qui contribue à la progression tumorale. C'est également en partie due à l'hyperméthylation de sa région promotrice que l'expression de *ARHI* est diminuée dans l'EOC [321, 322] (et revu dans [303]). Initialement, les études de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou l'électrophorèse capillaire à haute performance (HPCE) permettaient l'identification des sites de méthylation sur les promoteurs de ces gènes suppresseurs de tumeurs (revu dans [323]). Plus tard, ce

sont des techniques de PCR spécifiques aux méthylations ou de séquençage effectués à la suite d'un traitement de l'ADN qui en ont permis l'étude (revu dans [323]). Cependant, à l'ère des micropuces à ADN, l'identification de gain ou de perte de sections chromosomiques de même que les modifications épigénétiques peuvent maintenant être effectuées à grande échelle et sur plusieurs chromosomes simultanément à l'aide des micropuces (voir par exemple [305]).

Afin de pouvoir survivre, proliférer, migrer et envahir leur hôte, les cellules de l'EOC sécrètent et expriment des récepteurs pour différentes molécules bioactives. Ces dernières peuvent se présenter sous forme d'hormones dont la gonadotropine, l'œstrogène et la progestérone et leurs récepteurs respectifs. Elles prennent aussi la forme de facteurs de croissance auxquels répondent des cellules ovariennes tels le Hgf, le Tgf $\alpha$ , le Fgf et l'Egf qui stimulent la prolifération, altèrent la survie ou affectent la différenciation des cellules de l'OSE et de l'EOC. Elles se présentent également sous forme de cytokines dont l'Il-1, Il-6, m-Csf, gm-Csf qui contribuent aussi à la prolifération, à la migration et/ou à la formation de métastases des cellules de l'EOC (revu dans [26]).

L'indépendance aux facteurs de croissance est une caractéristique des cellules tumorales que possèdent aussi les cellules de l'EOC. En fait, l'altération de la quantité des récepteurs ou des facteurs de croissance favorise la prolifération des cellules tumorales. Ce phénomène peut être induit par des oncogènes viraux qui encodent des facteurs de croissance ou leurs récepteurs altérés bien qu'aucun exemple de ce genre n'est été retrouvé dans le développement de l'EOC. La prolifération tumorale peut également s'effectuer grâce à l'établissement d'une boucle autocrine de stimulation de la croissance ou même par une amplification de la région génique contenant l'information génétique du facteur de croissance ou de son récepteur. Par exemple, il a été montré que les cellules de l'EOC sécrètent et répondent au Tgf $\alpha$  de même qu'au m-Csf, ce qui entraîne une boucle d'auto-stimulation de croissance (revu dans boente [26, 122, 308, 324, 325]). La sécrétion de m-Csf par les cellules tumorales permet le recrutement des macrophages qui, à leur tour, sécrètent des

facteurs de croissances pour les cellules de l'EOC donc l'Il-1, l'Il-6 et le Tnf- $\alpha$  (revu dans [26, 122, 308, 324, 325]). Enfin, le récepteur *ERBB2*, de la famille des récepteurs à l'EGF, est surexprimé dû à l'amplification de la région contenant son information génétique dans 25 à 30% des EOC (revu dans boente [26, 122, 308, 324, 325]). Dans une proportion similaire d'EOC, une amplification génique des oncogènes *c-MYC* et *AKT2* a été observée. *ERBB1*, un autre membre de la famille des récepteurs à l'EGF, est lui aussi surexprimé dans plus de 75% des EOC de stades avancés et confère un pronostic sombre aux patientes (revu dans [26, 122, 308, 324, 325]). Finalement, par un mécanisme opposé, mais dont le but ultime est de favoriser la prolifération cellulaire, les cellules de l'EOC acquièrent une insensibilité au TGF $\beta$  soit par une réduction de la quantité de son récepteur, par l'expression d'une forme tronquée de ce dernier ou par la diminution de la production et/ou de l'activation de Tgf $\beta$  (revu dans [26, 122, 308, 324, 325]). Bref, les cellules tumorales s'arment et se protègent de tous les côtés afin de pouvoir proliférer et envahir leur hôte.

### 1.10 LES MODÈLES D'ÉTUDE DE L'EOC

Afin d'étudier l'EOC, différents systèmes modèles sont utilisés. Tout d'abord, le tissu de la tumeur originale qui provient de la patiente atteinte d'EOC. Ce dernier représente sans doute le modèle le plus représentatif de la maladie, mais son utilisation est quelque peu restreinte par son accessibilité, sa difficulté de propagation de même que l'impossibilité d'introduire ou d'ajouter du matériel génétique pour en étudier les effets. Contrairement à d'autres cancers comme celui de la prostate ou du sein où le tissu stromal est abondant, l'EOC est constitué majoritairement de cellules tumorales, mais aussi d'une faible proportion de cellules stromales et du système immunitaire. L'utilisation du tissu de l'EOC est donc adéquate pour étudier les événements qui se produisent dans les cellules tumorales, sans une trop grande influence des cellules non-épithéliales.

Cependant, des efforts ont été fournis afin de développer un système modèle qui permettrait la propagation des cellules tumorales. C'est d'ailleurs grâce à ces recherches qu'est née la culture primaire des cellules d'EOC. Ces cultures primaires dérivent de la tumeur originale et sont isolées par une simple technique de grattage du tissu tumoral ou par digestion de celui-ci à l'aide de la collagénase [326, 327]. Puisque les cellules malignes sont plus résistantes que les cellules normales, au fil des passages cellulaires, la culture développée donne un avantage de pureté et de reproductibilité. Ce système modèle s'est avéré représentatif de la tumeur originale tant au niveau des marqueurs qu'il exprime qu'au niveau de leur patron génétique [327]. Ces cultures sont enrichies en cellules épithéliales tumorales et permettent la propagation des cellules tumorales bien que leur fragilité entrave leur utilisation à long terme.

De ces cultures primaires peut surgir, suite à une immortalisation spontanée ou induite, un autre système modèle appelé lignée cellulaire. En plus de reproduire tous les avantages des cultures primaires, la robustesse des lignées cellulaires permet leur utilisation à long terme en plus de rendre possible l'insertion ou la suppression de matériel génétique pour en évaluer les effets sur la cellule. Une étude de micropuces à ADN à grande échelle connue sous le nom de 'NCI60 panel' montre un maintien du patron d'expression génique de 60 lignées cellulaires dérivées de tumeurs de sources diverses avec le tissu tumoral duquel elles proviennent. De plus, le profil d'expression génique montre également des similarités plus prononcées entre les lignées cellulaires qui dérivent d'un même organe en comparaison à celles qui proviennent des autres organes [328]. Au laboratoire, il a été montré que les caractéristiques de croissance *in vitro* des lignées cellulaires ovariennes miment le comportement clinique de la tumeur originale [329]. Malgré leurs nombreux passages en culture, les cellules des lignées cellulaires montrent des caractéristiques cytologiques et génétiques également représentatives de la tumeur originale dont les mutations dans des gènes impliqués dans l'EOC tels *TP53*, *CDNK2A*, *TGFBR2* et *BRCA* [330, 331]. Toutefois, les conditions artificielles dans lesquelles se trouvent les cellules en culture de même que l'absence de l'influence du microenvironnement

présent chez la patiente (cellules stromales, cellules immunitaires, hormones et autres molécules bioactives), font en sorte que les modèles de culture cellulaire sont sensiblement différents de la tumeur originale [332]

Plus récemment, un modèle de culture cellulaire tridimensionnel a été développé dans le but d'amalgamer les conditions de culture cellulaire et la croissance tridimensionnelle où des interactions cellules-cellules plus complexes que la culture en monocouche sont permises [333, 334]. Suite à une analyse du profil d'expression génique, l'expression de certains gènes dans les cultures sphéroïdes s'est montrée plus représentative de la tumeur originale comparativement aux cultures cellulaires en monocouche [334]. Cependant, leur utilisation est quelque peu limitée par leur courte durée de vie (quelques jours). Ce modèle peut donc compléter l'utilisation des lignées cellulaires lors de l'étude des interactions cellules-cellules ou l'analyse de la diffusion des molécules à l'intérieur des tumeurs. À cet effet, ce modèle s'avère un outil intéressant pour effectuer des essais de toxicité des drogues.

Jusqu'à tout récemment, aucun modèle murin ne pouvait reproduire efficacement l'EOC et, par le fait même aider à l'élucidation les événements précoces à son développement. En utilisant l'antigène grand T du virus SV40 sous l'influence du promoteur de MISIIR (Mullerian Inhibitory Substance type II receptor) spécifique aux épithéliums du système reproductif, un groupe de chercheurs a développé le premier modèle murin de l'EOC [335]. Les souris développent des tumeurs ovariennes bilatérales qui envahissent l'épiploon et forment de l'ascite. Les cellules de ces tumeurs expriment la Krt19, ont une morphologie épithéliale et peuvent former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunosupprimées. Des modèles murins ont également été développés à l'aide d'une mutation activatrice de *KRAS* [336] ou en inhibant l'expression de p53 et Rb [337]. Ce système modèle permet l'étude des événements précoces du développement de l'EOC, sa dissémination de même que l'influence de divers agents bioactifs ou de drogues sur le comportement de l'EOC. Les modèles murins sont toutefois dispendieux et la latence dans l'apparition des tumeurs est de quelques mois (3 à 4 mois).

## 1.11 OBJECTIFS DU PROJET DE DOCTORAT

En oncologie, il est bien documenté que l'altération du fonctionnement normal des gènes joue un rôle important dans le développement du cancer. Ces modifications peuvent survenir tant au niveau génétique qu'épigénétique. Dans le premier cas, ce sont des aberrations du génome (ex. mutations, réarrangements, amplifications ou perte d'allèles) qui résultent en l'altération du nombre de copie(s) du gène ou une modification des fonctions normales du produit de ce dernier. Dans le second cas, les changements dans les fonctions normales des produits géniques ont lieu sans altération de leur séquence d'ADN, mais surviennent plutôt au niveau de leur expression par des mécanismes telle que la modification des niveaux de méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones. Ces événements épigénétiques conduisent à l'inhibition de l'expression d'un gène due à une accessibilité restreinte de l'ADN de son promoteur pour les facteurs de transcription ou à l'expression accrue du gène par une activation positive de ses régulateurs transcriptionnels. Les changements, tant génétiques qu'épigénétiques, conduisent à la dérégulation des gènes impliqués dans l'initiation et la progression du cancer. Ces fonctions touchées peuvent être requises dans la progression dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation d'ADN, la fonction télomérique, la prolifération, l'angiogenèse de même que dans la migration et l'adhésion cellulaire [338]. Il y a de cela quelques années, les chercheurs devaient se concentrer sur un nombre restreint de gènes, soit leurs gènes d'intérêt, puisque les techniques pour identifier de nouvelles variations d'expression étaient laborieuses (ex. PCR par étalage différentiel). Cependant, quelques temps avant mon arrivée au laboratoire, l'ère de la génomique voyait le jour. Le début de cette nouvelle ère a été marqué, entre autre, par l'apparition des micropuces à ADN qui permettent l'étude à grande échelle du transcriptome de la cellule de façon relativement simple et efficace.

L'hypothèse de mon projet de doctorat s'est donc fondée sur deux concepts principaux. Le premier soutient que l'expression différentielle des gènes reflète les modifications survenues au niveau épigénétique et nous renseigne sur les changements qui se produisent lors de la carcinogenèse. Le second concept est basé

sur l'intérêt de comparer les tumeurs LMP et TOV puisque ces deux classes de tumeurs malignes sont composées de cellules en prolifération, mais dont l'évolution clinique est opposée. La première possède une nature indolente et est associée à un bon pronostic tandis que l'autre évolue de façon agressive, invasive, métastatique et généralement létale. Ces deux concepts rassemblés m'ont occupée durant mes années de recherche au doctorat où j'ai vérifié si les différences épigénétiques entre les LMP et les TOV pouvaient permettre une meilleure compréhension de l'EOC en plus de servir d'outil de criblage pour l'identification de gènes dont la modulation de l'expression donnerait un indice sur le pronostic de la patiente atteinte d'EOC.

### **1.11.1 Chapitre II : Le criblage moléculaire des tumeurs épithéliales de l'ovaire**

Le premier objectif de mon projet consistait donc à déterminer et à rassembler les meilleures conditions afin d'évaluer les différences d'expression génique des tumeurs LMP et TOV. Tout d'abord, nous devions déterminer le système modèle le plus propice à l'étude de l'EOC de même que la plateforme la plus adéquate à utiliser afin de mesurer l'expression génique. Le chapitre II de la présente thèse reflète ces deux volets de mon projet de recherche.

Nous avons comparé les LMP aux TOV de G3 puisque ceux-ci représentent les extrêmes de la malignité. De cette façon, si seuls des changements subtils au niveau du transcriptome existaient entre les LMP et les TOV, la comparaison des extrêmes de malignité nous permettrait probablement de mettre en lumière les modulations d'expression génique les plus robustes. De plus, puisqu'une variation biologique existe entre les différentes patientes, nous avons déterminé des critères d'inclusions pour homogénéiser notre échantillonnage. Cela favorise l'obtention d'un patron d'expression différentiel représentatif de la malignité plutôt qu'influencé par tout autre facteur que nous aurions pu éliminer. Nous avons donc ciblé les patientes qui n'avaient pas reçu de traitements de chimiothérapie avant la chirurgie. Nous avons également choisi de n'utiliser que les tumeurs présentant la même histopathologie.

D'ailleurs, ce choix s'est avéré judicieux puisqu'au cours des années subséquentes, des études de micropuces à ADN ont montré que les diverses histopathologies présentaient un patron d'expression génique distinct ([25, 339, 340]). Nous avons opté pour l'histopathologie séreuse qui est la plus fréquente chez les LMP. Finalement, nous avons utilisé deux systèmes modèles, soit le tissu tumoral et la culture primaire, puisque chacun d'entre eux apportait ses avantages et inconvénients (voir section 1.9).

Il existe deux plateformes principales pour la génération des micropuces qui se distinguent essentiellement par leur synthèse et par l'hybridation des échantillons. La première utilise la synthèse d'oligonucléotides directement sur le support solide par un procédé nommé photolithographie qui est mis en marché par la compagnie Affymetrix Inc. (Santa Clara, CA) ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Pour chacune des sondes synthétisées pour un même gène ou EST, un homologue muté est également produit afin d'évaluer la spécificité du signal. La seconde plateforme utilise des brins d'ADNc ou de courts oligonucléotides qui sont mis sur un support solide de membrane de nylon, de puces en silicone ou de lames de verre traitées. Quelle que soit la plateforme utilisée, l'ADN mis sur la puce sert à l'hybridation des ADNc marqués à l'aide de colorants fluorescents dont la biotine, le Cy3 et le Cy5. Suite à l'hybridation de l'échantillon marqué et aux lavages, l'intensité de la fluorescence dictée par l'abondance de transcrits présents dans l'échantillon est intégrée et quantifiée par ordinateur (revu dans [341]). La technologie d'Affymetrix est celle qui a été choisie par notre laboratoire et cette décision a été motivée, entre autre, par le fait que chaque échantillon est hybridé sur une micropuce unique qui dicte son propre signal. Dans la seconde technologie, deux échantillons sont hybridés sur la même micropuce, l'un étant l'échantillon d'intérêt marqué (Cy3) et le second étant un ARN contrôle marqué d'un second colorant (Cy5). L'échantillon contenant le plus de transcrits présente une fluorescence supérieure à l'autre. Toutefois, la réciproque de l'expérience doit également être faite dans le but d'éviter des modulations d'expression dues à l'incorporation non-équivalente des deux colorants. En plus de la nécessité de l'hybridation de deux micropuces, cette technologie était également



limitée par l'absence, au moment de l'élaboration de mon projet, d'un ARN de contrôle universel permettant la comparaison des résultats entre les différents laboratoires.

### **1.11.2 Chapitre II, IV et V : Analyses statistiques / bioinformatiques et validation des résultats de micropuces à ADN**

Le deuxième objectif de mon projet de recherche consistait à déterminer quels étaient les algorithmes et/ou les outils biostatistiques et bioinformatiques disponibles les plus adéquats pour évaluer les différences d'expression génique entre les LMP et les TOV. De plus, la maîtrise de leur utilisation et de l'interprétation des résultats générés par ces outils biostatistiques devait être acquise. Nous devions également vérifier si les résultats générés par les analyses de micropuces à ADN reflètent effectivement ce qui se passe au niveau de l'EOC. La détermination et la maîtrise de la technique de validation ont fait partie des buts à atteindre pour la complétion de mon projet de doctorat. Les résultats de ces efforts d'analyse et de validation sont décrits, en partie, dans le chapitre II de cette thèse.

À l'ère des micropuces à ADN, un nouveau défi s'est présenté aux biostatisticiens, bioinformaticiens et autres scientifiques puisque les analyses de micropuces à ADN nécessitent la comparaison de petits groupes d'échantillons liés à une multitude de données. Comme pour toute nouvelle technologie, les outils d'analyses et d'interprétations se sont développés et se sont perfectionnés petit à petit, selon les besoins des utilisateurs. Initialement, par manque d'outils ou d'algorithmes, les comparaisons entre les échantillons s'effectuaient majoritairement par des comparaisons de ratios d'expression (fold-change) (ex. [329]). Par la suite, deux approches se sont dessinées : la découverte de classe et la prédiction de classe. Dans la découverte de classe, les algorithmes définissent des groupes parmi les échantillons dont la modulation génique est similaire. Parmi les outils développés pour cette analyse non-supervisée se retrouve l'appariement hiérarchique (hierarchical clustering, HC) et les cartes d'auto-organisation (Self-Organizing Maps, SOM) [342].

Dans la prédiction de classe, les algorithmes comparent entre eux les groupes préalablement définis. Ceci consiste en une analyse supervisée des échantillons. Parmi les outils disponibles pour ce type d'étude se retrouvent la corrélation métrique (signal-to-noise, S2N), les tests paramétriques (test de Student) et les tests non-paramétriques (U de Mann-Withney). L'analyse des résultats de micropuces a été facilitée par l'élaboration de divers programmes et logiciels dont SAM (significant analysis of microarray) ([www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/](http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/)) [343], GeneSpring (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) et Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Depuis lors, une multitude d'outils ont permis d'améliorer l'efficacité d'analyse des données en intégrant plusieurs fonctions dont celles de l'analyse de différentes plateformes de micropuces à ADN, l'incorporation de listes de sondes spécifiques à diverses familles de gènes ou de voies de signalisation, l'ajout de divers algorithmes statistiques (paramétriques et non-paramétriques), de comparaison ou encore de normalisation. De plus, des algorithmes permettent désormais une intégration des candidats sélectionnés à des voies de signalisation (ex. logiciel Pathway-Assist et GO analysis intégré dans R) de même qu'à la survie de patientes (ex. Survival intégré dans R). Ces outils ont permis l'étendue des possibilités d'analyses et des connaissances générées par les données de micropuces à ADN. Pour mon projet de recherche, l'analyse par prédiction de classes était la plus appropriée puisque nous désirions identifier une signature moléculaire spécifique aux classes LMP et TOV. Nous avons utilisé les algorithmes de S2N, de SAM et le test non-paramétrique de Mann-Withney.

La validation des candidats sélectionnés par les analyses statistiques est nécessaire afin de déterminer si les modulation d'expression sont réelles. Aussi, puisque le coût associé à la génération des micropuces est élevé, la vérification de l'expression différentielle de certains gènes sur un grand échantillonnage ne serait permise qu'à un très faible pourcentage de chercheurs et l'utilisation clinique des marqueurs en serait donc compromise. Afin de valider la modulation d'expression de nos candidats, nous avons opté pour le PCR quantitatif (qPCR) couplé à l'utilisation du colorant intercalant 'SybrGreen' et à un algorithme de quantification relative [344]. Ensemble, ces outils

rendent la technique simple efficace et relativement peu dispendieuse (revu dans [345]). Bien que plusieurs candidats aient été validés par la suite, une partie d'entre eux sont présentés au Chapitre II.

### **1.11.3 Chapitre III, IV et V : Essais de marqueurs pronostiques et diagnostiques**

Enfin, après avoir obtenu une signature génique des tumeurs LMP et TOV, nous devons déterminer la puissance de certains gènes candidats identifiés au niveau de la biologie du cancer. De plus, dans une optique de recherche translationnelle, nous devons évaluer leur utilisation potentielle au niveau clinique afin d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'EOC. Ceci étant soutenu par l'existence d'une différence flagrante de malignité et d'agressivité entre les LMP et les TOV. Nous avons donc, par deux techniques différentes, sélectionné les candidats à évaluer pour répondre à cet objectif. Tout d'abord, certains candidats ont été choisis individuellement puisqu'ils présentaient une fonction biologique intéressante reliée ou non à l'EOC et que des anticorps commerciaux étaient disponibles pour leur étude. Les résultats de cette analyse de candidats individuels et indépendants sont présentés dans le chapitre III de cette thèse. Enfin, dans une optique plus globale et après analyse minutieuse des gènes sélectionnés, nous avons repéré certains gènes qui étaient reliés à des voies de signalisation communes. Nous avons donc fait ressortir la totalité, ou une portion des membres de la voie, qui présentait ou non une différence d'expression au niveau de l'ARN afin d'évaluer leur expression protéique. Les chapitres IV et V sont le reflet de certaines des analyses effectuées dans cet optique.

## CHAPITRE II

### **Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling**

**Véronique Ouellet<sup>1</sup>, Diane M. Provencher<sup>1,2</sup>, Christine M. Maugard<sup>1,3</sup>, Cécile Le Page<sup>1</sup>, Fengge Ren<sup>1</sup>, Christian Lussier<sup>4</sup>, Jaroslav Novak<sup>5</sup>, Bing Ge<sup>5</sup>, Thomas J. Hudson<sup>5,6,7</sup>, Patricia N. Tonin<sup>6,7,8</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,3</sup>.**

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)/ Institut du cancer de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>2</sup>Division of gynecologic oncology /Université de Montréal, Montreal, Canada,

<sup>3</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>4</sup>Department of pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Canada;

<sup>5</sup>McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Canada;

<sup>6</sup>Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada;

<sup>7</sup>The Research Institute of McGill University Health Centre, Montreal, Canada;

<sup>8</sup>Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada.

Article publié dans :

***Oncogene*, Jul 7;24(29):4672-87, 2005**

**Keywords :** borderline tumors, epithelial ovarian cancer, microarray analysis

*\* V. Ouellet est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. C.M. Maugard, C. Le Page et F. Ren ont participé à l'établissement des techniques d'analyse. J. Novak a procédé à la normalisation des données, B. Ge a fourni un soutien technique pour la génération des micropuces à ADN. C. Lussier a effectué à la révision de la pathologie des échantillons. T.J. Hudson, D.M. Provencher, P.N. Tonin et A-M. Mes-Masson ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

---

Véronique Ouellet

---

Dr. Anne-Marie Mes-Masson

Directrice de recherche

## RÉSUMÉ

Les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP) représentent environ 20% des tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire. Les patientes atteintes de LMP ont un pronostic supérieur à celui des patientes souffrant de tumeurs invasives de l'ovaire (TOV). La définition de la relation entre les LMP et les TOV demeure un objectif important pour favoriser une connaissance des voies moléculaires contribuant au pronostic des patientes tout en permettant l'identification de marqueurs moléculaires du cancer épithélial de l'ovaire (EOC). Pour ce faire, les profil d'expression génique de tissus tumoraux et de cultures primaires LMP et TOV ont été établis à l'aide de micropuces à ADN. Trois méthodes statistiques de prédiction de classe ont été utilisées afin de sélectionner des gènes candidats distinctifs des LMP et des TOV. Les deux systèmes modèles utilisés dans l'étude se sont montrés appropriés puisque les gènes candidats sélectionnés par chacun d'eux a permis la reclassification adéquate des échantillons dans la catégorie LMP ou TOV. L'expression du transcrit a été validée par PCR quantitatif pour une portion des gènes candidats sélectionnés (*CAS*, *CCNE1*, *LGALS8*, *ITGβ3*, *ATP1B1*, *FLIP*, *KRT7* et *KRT19*). Puis, des analyses d'immunohistochimie sur divers candidats (*CAS*, *TNFR1A*, *FLIP*, *CKS1* and *CCNE1*) ont montré une expression différentielle au niveau protéique permettant la distinction entre les LMP et les TOV. Les résultats présentés ici définissent un profil d'expression génique distinctif des LMP et des TOV et identifient des gènes candidats qui permettront ultérieurement d'approfondir la compréhension de la biologie de l'EOC.

## ABSTRACT

Tumors of low malignant potential (LMP) represent 20% of epithelial ovarian cancers (EOCs) and are associated with a better prognosis than the invasive tumors (TOV). Defining the relationship between LMPs and TOVs remains an important goal towards understanding the molecular pathways that contribute to prognosis, as well as providing molecular markers, for these EOCs. To this end, DNA microarray analyses were performed either in a primary culture or a tumor tissue model system and selected candidate genes showing a distinctive expression profile between LMPs and TOVs were identified using a class prediction approach based on three statistical methods of analysis. Both model systems appear relevant as candidate genes identified by either model allowed the proper reclassification of samples as either LMPs or TOVs. Selected candidate genes (*CAS*, *CCNE1*, *LGALS8*, *ITGβ3*, *ATP1B1*, *FLIP*, *KRT7* and *KRT19*) were validated by real-time quantitative PCR analysis and show differential expression between LMPs and TOVs. Immunohistochemistry analyses showed that the two tumor classes were distinguishable by their expression of *CAS*, *TNFR1A*, *FLIP*, *CKS1* and *CCNE1*. These results define signature patterns for gene expression of LMPs and TOVs and identify gene candidates that warrant further study to deepen our understanding of the biology of EOC.

## INTRODUCTION

In women, ovarian cancer is the fourth leading cause of deaths related to cancer and represents the most lethal gynecologic malignancy with a 5 years survival of 30-40% (Auersperg *et al.*, 2001). Generally asymptomatic, over 70% of women are diagnosed with advanced disease. The most common pathology is epithelial ovarian cancer (EOC), which is classified by several criteria. Tumors are subdivided in three major classes: benign (BOV), low malignant potential or borderline (LMP) and invasive disease (TOV). Histologically, BOV tumors show no stratification and do not present atypical cells. LMPs show epithelial proliferation with stratification and cytologic atypia with no stromal invasion, although microinvasion can be observed (Tavassoli, 1988). In contrast, TOVs exhibit a high mitotic index, cytologic atypia and stromal invasion (Burger *et al.*, 2000; Dietel and Hauptmann, 2000). Several histopathological subtypes are recognized including: serous, mucinous, endometrioid, clear cell and Brenner, as well as mixed and undifferentiated histopathologies. Grade defines the differentiation of tumors and varies from B, for LMPs tumors, and increases from grades 1 to 3 as TOVs appear less well differentiated. Tumors of stage I are confined to the ovaries while stage IV disease presents with distant metastasis (de Souza and Friedlander, 1992).

LMPs represent 20% of malignant epithelial tumors and 60% of the tumors seen in young women (<40 years) (Trope and Kaern, 1998). The major histopathological subtype of LMPs is serous and these tumors are generally much less aggressive than TOVs. In serous borderline disease, the 5-year survival is 90-95% for early stage disease and 55%-70% in stage III disease [reviewed in (Seidman and Kurman, 2000)]. However, from 7-15% of LMPs can recur, generally as borderline disease, but upon recurrence the prognosis is similar to that of invasive carcinoma [reviewed in (Seidman and Kurman, 2002)]. Recurrent borderline disease may be associated with aneuploidy, high mitotic activity, microinvasion and/or a micropapillary serous carcinoma subtype (Dietel and Hauptmann, 2000; Link *et al.*, 1996a; Seidman and Kurman, 2002). The LMP disease is not well characterized at the molecular level and

this probably underlies several issues related to these tumors. While there remains a debate as to whether LMPs represent an early precursor of invasive disease, more recent evidence supports a dualistic model that separates LMPs and TOVs along separate oncogenic pathways. The notion of a separate LMP disease is supported by the observation that specific LMP loss of heterozygosity at chromosome Xq is not observed in low grade tumors (Cheng *et al.*, 1996). In addition, the clonality of LMPs has been called into question by the observation that random X inactivation occurs within LMPs (Gu *et al.*, 2001). Additional molecular evidence also supports the notion that LMP disease does not progress to invasive tumors but represents a separate disease entity (Link *et al.*, 1996b; Ortiz *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2003a; Singer *et al.*, 2003b).

The diagnosis of LMP has to be precise since conservative surgery is usually sufficient to control the disease without the need for chemotherapy (Gotlieb *et al.*, 1998; Trope and Kaern, 1998). However, the histological criteria allowing the distinction of LMPs from BOVs and TOVs are not always sharply defined. A misclassification may result in a sub-optimal or sometimes overly aggressive therapeutic approach for the patient. In addition, defining the molecular relationship between ovarian LMPs and TOVs is an important strategy to understand the biology of the disease, and in particular may provide insights into the molecular pathways that impact negatively on prognosis as well as providing molecular markers to better define these EOCs.

While several groups have conducted expression profiling studies in invasive ovarian cancer (reviewed in (Le Page *et al.*, 2004)), little attention has focused on gene profiling of LMPs by DNA microarray (Lee *et al.*, 2004), partly due to the relative scarcity of these samples which only represents 20% of all EOCs. In this study, we used a DNA microarray approach to define molecular differences based on gene expression between LMPs and TOVs of the serous histopathological subtype. Two model systems were used for this analysis: tumor tissues and primary cultures derived from fresh tumor tissues. For each model system, we selected candidates by applying



class prediction methods using three different statistical analyses. Each statistical method selected candidate genes allowing the distinction between the LMPs and TOVs and the proper reclassification of individual samples. Furthermore, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis was performed on a subset of these candidates to validate the microarray data. Finally, we extended the analysis to address the protein expression of a limited number of candidates identified in our analysis using an immunohistochemical assay on clinical specimens representing both the borderline and invasive disease.

## RESULTS

### **Distinction between LMPs and TOVs tumor tissues using gene expression**

We used the Affymetrix GeneCHIP HuGeneFL microarray to establish gene expression pattern of LMPs and TOVs. Samples were from chemotherapy naïve patients and were further selected according to their malignancy (grade B for LMPs or grade 3 for TOVs) and serous histopathologic subtype (Table 1). We used a total of 6 LMPs and 12 TOVs as the training set to identify differences between the two tumor classes using a pre-processed dataset comprised of 4447 probe sets. To identify the differential expression patterns between LMPs and TOVs, we performed three statistical tests that have been used independently in the analysis of expression microarrays: a signal-to-noise metric, a modified T-test (SAM) and the Mann-Whitney U test (Golub *et al.*, 1999; Troyanskaya *et al.*, 2002; Tusher *et al.*, 2001) (Figure 1). Over 200 candidate genes were identified by the signal-to-noise ratio (Figure 1A) and Mann-Whitney test ( $p=0.005$ ) (Figure 1B). The two analyses identified 183 common genes. Figure 1C presents expression of 186 candidate genes selected with the SAM software. Among those 186 candidates, 150 were also selected by the signal-to-noise analysis and 158 by the Mann-Whitney test. In Figure 1D, expression values of the 137 genes commons to all three statistical analysis are represented. These common genes were re-grouped according to their biological functions using the NIH-DAVID GoCHART tool (Figure 1E). Complete gene lists for all statistical analyses are provided in Supplementary Table 2 (available at ([www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html](http://www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html))). The majority of the candidate genes are required in processes like nucleic acid or protein metabolism, transport, cell proliferation, signal transduction, biogenesis and catabolism.

### **Distinction between LMPs and TOVs primary cultures using gene expression**

We performed similar analyses using a training set of primary cultures derived from 6 LMPs and 8 TOVs independent samples. In comparison to tumor tissues, this model system has been demonstrated to be enriched in tumor cells (Lounis *et al.*, 1994;

Tonin *et al.*, 2001). After the pre-processing of the data, 3865 genes served in the subsequent analysis. Figure 2A, provides the expression results for the 194 genes (~5%) selected by the signal-to-noise analysis while Figure 2B presents the profile for the 174 genes selected using the Mann-Whitney U test ( $p=0.02$ ). Among these candidates, 147 were common to both analyses. Figure 2C, represents profiles for the 146 genes selected with SAM including the 133 genes common with the signal-to-noise analysis (Figure 2A) and the 121 common with the Mann-Whitney U test (Figure 2B). Figure 2D represents the expression of the 116 genes common between the three statistical analyses. Complete gene lists for all statistical analyses are provided in Supplementary Table 3 (available at [www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html](http://www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html)). Genes were regrouped based on major biological processes are presented in Figure 2E and included protein and nucleic acid metabolisms as well as cell proliferation, signal transduction and organogenesis. The majority of these cellular processes were also observed in tumor tissues analysis (Figure 1D) supporting their role in carcinogenesis.

### **Model system comparison**

Comparison between the restricted set of common genes (~100 for each model) selected in the primary culture or tumor tissue model systems (Figure 1D and 2D) identified only seven genes common to both lists: cellular apoptosis susceptibility (*CAS*), cyclin E1 (*CCNE1*), chromobox homolog 1 (*CBX1*), CDC28 protein kinase 2 (*CKS2*), apical protein (*APXL*), capping protein (*CAPG*) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (*HNRPM*). To further compare the two model systems, we extracted gene expression data from tissue culture samples for the common candidates identified in the tumor model and *vice versa* (Figure 3A and 3B). This allowed us to determine that the differential expression of common candidates selected in one model continued to discriminate LMPs from TOVs in the alternate model.

### **Use of the candidate genes for class prediction**

The selection of candidate genes that allow distinction between the LMPs and the TOVs could be used to either re-classify samples, using the weighted voting score, from the original training set or to classify new samples. In Figure 4 we present the prediction strength calculated upon re-classification of the training sets for tumor tissues (Figure 4A) and primary cultures (Figure 4B). A positive value represents assignment to the LMP class and a negative value corresponds to assignment to the TOV class. The candidate genes selected by each statistical test (signal-to-noise, SAM and U) allowed the correct classification (over 0.3 for LMPs and below -0.3 for TOVs) of all samples either in tumor tissues or primary cultures. In general, we observed that the common genes (137 for tumor tissues or 116 for primary cultures) appeared to classify samples with a higher prediction strength than each of the 3 statistical methods independently.

We also determined whether candidates identified in one model system could successfully be used to classify samples in the alternate model system. Interestingly, tumor tissue candidates were unable to distinguish the LMPs in primary cultures as all samples were classified as TOVs. In contrast, primary culture candidates retained the ability to classify tissue samples with 13 correctly assigned, one sample incorrectly assigned (an LMP sample), and four samples were not classifiable (both LMP and malignant samples).

To further test the strength of the selected candidates, we used the common tissue specific candidates to classify ovarian tumor samples from publicly available datasets where profiling was accomplished using ovarian tumor tissue arrayed on the Affymetrix HuGeneFL (Schwartz *et al.*, 2002). Of these 113 tumor tissues where public datasets were available, 100% were correctly classified, irrespective of the different histopathological subtypes (55 serous, 10 mucinous, 33 endometrioid, 8 clear cell and 9 mixed cell), differences in tumor grades (grades 1-4) and disease presentation (Stages 1-IV) included in the analysis. The candidates derived from the analysis of primary cultures of LMP and TOV tumors correctly predicted 85 solid

tumors, but failed to predict the classification of 25 samples and misclassified 3 samples. We also used the common candidates from primary culture to classify ovarian cultures arrayed on the Affymetrix U95 (Matei *et al.*, 2002). Despite the fact that only a portion of the candidates (95/116) are appropriately represented on the U95 array, all 21 primary cultures derived from TOVs were appropriately classified with a high prediction strength.

### **RT-qPCR validation of candidate genes**

PCR was performed to validate the biological relevance of a subset of the common genes (Figure 1D and 2D) that appeared to differentiate LMPs from TOVs by microarray analysis. The selection of candidate genes was biased towards genes previously implicated in carcinogenesis. Figure 5 presents the relative expression ratio (R) of each gene, based on the Pfaffl method of quantification, in tumor tissues (Figure 5A-D) and in primary cultures (Figure 5E-H), using *ERK1* as an internal control. The RT-qPCR was performed on a subset of the samples that served in the microarray analysis. The level of mRNA showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between LMPs and TOVs for *CCNE1* ( $p = 0.002$ ), *KRT19* ( $p = 0.01$ ), *KRT7* ( $p = 0.02$ ), *ATP1B1* ( $p = 0.001$ ) and *FLIP* ( $p = 0.05$ ) while near significance was reached with *CAS* ( $p = 0.07$ ), *ITGB3* ( $p = 0.08$ ) and *LGALS8* ( $p = 0.09$ ) (Figure 5). These results confirmed those obtained by microarray analysis in either tumor tissues or primary cultures. However, we also performed RT-qPCR analysis for *CKS1*, *RHEB2* and *GPI* on tumor tissue samples and these genes failed to demonstrate a significant difference between LMPs and TOVs (data not shown). Similarly, *TNFR1A*, *ELF2*, *CAS* and *CCNE*, all differentially expressed by microarray in primary cultures, did not produce statistically significant differences by RT-qPCR when comparing LMPs and TOVs (data not shown). Therefore, we were able to confirm the differential expression of a subset candidate genes identified by microarray, although the correlation was not supported by RT-qPCR results for a number of candidates.

### **Immunohistochemistry**

In order to define if the corresponding protein expression of the candidate genes could serve as a molecular marker to distinguish LMPs from TOVs, we performed immunohistochemistry (IHC) on the tumor tissue of 12 LMPs and 12 TOVs. Tissues were scored for both the extent and intensity of staining. Characteristic staining as well as numerical calculations of expression are presented in Figure 6. Significant differences between LMPs and TOVs were observed for *CCNE1* ( $p=0.08$ ), *CAS* ( $p=0.005$ ), *CKS1* ( $p=0.0005$ ), *FLIP* ( $p<0.0001$ ), and *TNFR1A* ( $p=0.0003$ ) protein expression. However, while these candidates exhibited significant differences in expression when entire groups were compared, within individual samples variations were observed and no marker alone could correctly predict the assignment of LMP and TOV samples. The level of Krt19 and Krt7 protein were also monitored, and although clear differences were seen by microarray and RT-qPCR analyses, no significant differences were noted by IHC ( $p=0.62$  and  $p=0.20$  respectively).

## DISCUSSION

Based on Affymetrix HuGeneFL microarray datasets, we selected candidate genes defining differential gene expression between LMPs and TOVs using different statistical approaches in both tumor tissue and primary culture model systems. In both model systems, our candidate genes allowed the proper classification of all samples used in this study. In addition, the selected candidates were able to classify tumors from published data, including other histopathology subtypes, reinforcing the usefulness and the validity of the selected candidates. While candidates selected in both model systems were largely different, seven genes were common to both tumor tissues and primary cultures. Interestingly, these seven genes allowed the proper classification of all samples used in this study and correctly classified 86% of the samples from an independent public dataset (Schwartz *et al.*, 2002). We also assessed the differential expression of a subset of genes by RT-qPCR analysis, with over half of the candidates displaying statistically significant difference between LMPs and TOVs. The lack of significance for the remaining candidates tested may be due to probe set selection on the Affymetrix array, the low expression level of some genes or to the technical limitation imposed by the RT-qPCR technique which does not allow the distinction of less than 2 fold difference in gene expression. Attempts to reclassify LMP or TOV samples using the RT-qPCR data provide limited success as only 64% of samples derived from primary cultures and 67% of samples derived from tumor tissues being correctly classified. These low reclassification scores were mainly due to unclassifiable samples while only a small number of samples were incorrectly assigned (14% for primary cultures and 0% in tumor tissues). This suggests that classification by RT-qPCR is attainable although further refinements of candidates may permit a more robust reclassification of samples. We also identified protein expression patterns for a limited number of candidates using IHC. While overall differences between LMPs and TOVs were observed for some candidates, the use of one marker was not sufficient to clearly assign individual samples into either class, and probably the combination of several optimally chosen markers will ultimately be needed to allow the clear assignment of LMPs and TOVs. For both

model systems, selected candidates could be grouped according to function, with high expression of genes involved nucleic acid and protein metabolism, cell proliferation and signal transduction in the TOVs. This is consistent with the fact that TOVs have higher proliferation rate than LMPs (Halperin *et al.*, 2001; Kitakata *et al.*, 2002).

Common candidate genes identified in tumor tissues were cross-referenced to available literature on gene differentially expressed in EOC identified either by microarray analysis or by other techniques. Of a total of 137 genes, 43 have previously been described in EOC (Table 2). Among these genes, 35 were identified by microarray analysis, 11 were identified by other RNA based detection techniques and 20 were studied at the protein level. The expression level of 37 genes was concordant with previously reported results while the direction of expression was discrepant and non-informative for 6 and 9 genes respectively. Likewise, in the primary culture model, 26 genes have already been identified by other groups as differentially expressed in ovarian malignancy either by microarray analysis or by other techniques (summarized in Table 3). These candidates were identified by either microarray analysis (14 genes/ESTs), by other RNA monitoring techniques (6 genes) or studied at the protein level (14 genes), and shown to be differentially expressed in EOC. The direction of differential expression matched published results for 15 genes identified while 10 were uninformative and 6 showed differential expression opposite to reported results (Table 3).

In the present study we compared both tumor tissues and primary cultures derived from a fresh tumor tissues. The first model is probably more representative of the disease but presents contamination of stromal cells and/or infiltrating cells. In contrast, the primary culture model is enriched of tumor cells (Lounis *et al.*, 1994) from which we can extract high quality RNA, but the culture condition and loss of microenvironment interaction may influence the genetic expression. Cross comparison between the models suggest little overlap in the actual candidates, although the primary culture selected candidates in particular allow a better distinction between tissues derived from LMPs and TOVs. Within the candidates that



were common to both model systems (seven genes), the trend of expression was similar except for *APXL*. Similarly, cross comparisons of candidates unique to one model system also showed similar trends of expression when assessed in the alternate model, with only a few genes displaying significant differences (including *FLIP*, *SR-BP1*, *GSTP1* and *DUSP4*). While these results demonstrate the general concordance between the two model systems, they also highlight the fact that genes may be modulated by either the microenvironment or the presence of multiple cell types in the case of tumor tissues. Indeed, we noted twice as many candidate genes in tumor tissues versus primary cultures classified in biological processes that may reflect the influence of the microenvironment such as response to external stimulus, response to stress and immune responses. As an example, *NMI*, which is actively transcribed in response to IL2 and IFN $\gamma$  secreted by the immune system cells including activated T and B cells, is more highly expressed in tumor tissues than in primary cultures. Our results also support the notion that primary cultures help define differences in expression present in tumor tissues that may be masked by strong candidates derived from cell types other than the tumor cells themselves and this would also explain why tumor tissue candidates classify primary cultures poorly. Nonetheless, even if a subset of tumor tissue candidates are derived from either epigenetic events associated with stroma, or alterations of cell populations associated with tumor tissues, they remain indirect indicators of fundamental differences in the biology associated with LMPs and TOVs.

A number of the candidate genes identified in this report have already been identified in ovarian cancer and the observed expression profile is consistent with previously reported results. Among those candidates, we count *CAS*, *CCNE1*, *GPI*, *PRSS8* and *CK2B* in the tumor tissue model system and *CAS*, *CCNE1*, *HOXB7*, *LDHB* and *LAMB1* in the primary culture model, which have been studied both at the RNA and protein levels, often in several studies (see Tables 2 and 3). The observed concordance in the expression a larger number of candidates reinforce the implication of these genes in ovarian carcinogenesis as well as supporting the potential role of the additional candidates we identified in EOC. While concordance with published

results was high, notable exceptions were observed. In studies focusing on microarray data, some of these discrepancies could be attributed to differences to the reference group used for comparison with TOVs that often consisted of normal ovarian tissue or normal ovarian cell cultures (either primary cultures or viral oncogene immortalized cell lines) or that only protein levels were assessed, and thus not directly comparable to microarray results.

A number of specific candidates have been prominently featured in previous reports in EOC and other cancers. These include *ITGβ3* and *LGALS8*, both of which appear to be under-expressed in TOVs, by both microarray and RT-qPCR analyses. This is in agreement with a previous report describing the under-expression of the β3 subunit in high grade tumors of the EOC compared to low grade and borderline tumors (Carreiras *et al.*, 1996). In addition, it has been shown that *LGALS8* protein expression is significantly decreased in tumors of the pancreas, colon, liver and larynx (Danguy *et al.*, 2002). A larger number of genes thought to be associated with tumorigenesis have been shown to be over-expressed in TOVs in our microarray analysis. These include *GPI* whose expression correlates with increased motility and metastatic activity of tumor cells (Yanagawa *et al.*, 2004) and whose over-expression in ovarian tumors has previously been reported (Lee *et al.*, 2004).

Of the candidates identified in our study, several cell cycle regulators appear to be of particular interest. These include *Ccne1* (otherwise known as cyclin E), which binds *Cdk2* and is required for the G1 – S phase progression. In agreement with our study of both primary cultures and tumor tissues, *CCNE1* has been shown to be over-expressed in many types of cancer. In particular, *CCNE1* was shown amplified by FISH analysis in different tumor types including EOCs (Schraml *et al.*, 2003). The over-expression of *CCNE1* was observed at the mRNA (30%) and protein (43%) level in ovarian tumors compared to normal ovaries (Sawasaki *et al.*, 2001) and was also associated with a poor prognosis (Farley *et al.*, 2003; Milde-Langosch *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2001; Schraml *et al.*, 2003; Sui *et al.*, 2001a). Moreover, a gradation in *Ccne1* expression from benign to LMPs (50%) and to TOVs (70%) has

also been reported (Sui *et al.*, 2001a). Our results support previous results and contribute to the expectation that *Ccne1* plays a role in EOC. A second cell cycle regulator of particular interest is *Cks1* which favors anaphase through its modulation of the transcription of *CDC20* (Morris *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 1999). *Cdc20* is required to bind and activate the ubiquitin activity of the anaphase promoting complex (APC/C) which targets cyclin B to the proteasome, in turn promoting the end of mitosis. *Cks1* has also been reported to target p27kip, an inhibitor of G1 cyclins, to the ubiquitin-mediated proteolysis allowing progression through the cell cycle (Harper, 2001). *CKS1*<sup>-/-</sup> knock-out mice are unusually small and the cells derived from these mice proliferate slowly in association with the accumulation of p27Kip (Spruck *et al.*, 2001). We observed over-expression of *CKS1* in TOVs in tumor tissues, which correlates with the reported over-expression in colorectal (Shapira *et al.*, 2004), gastric (Masuda *et al.*, 2003), lung (Inui *et al.*, 2003) and fibrosarcomas (Gascoyne *et al.*, 2003). Together, results with *CKS1* and *CCNE1* suggest that the cell cycle can be targeted at different levels in EOC.

Another potential candidate that can contribute to the deregulation of the cell cycle is *CAS* (for Cellular Apoptosis Susceptibility), whose over-expression was observed in TOVs by microarray analysis (in both model systems), RT-qPCR and IHC. *Cas* has a role in both proliferation and apoptosis. *Cas* is required for the recycling of the nuclear transporter importin- $\alpha$  assisted by *Rangef*, *Ranbp* and *Rangap* (Kutay *et al.*, 1997). *RANBP1* as well as *RAN* were also found to be over-expressed in TOVs compared to LMPs in the tumor tissue model system further supporting a role for this pathway in TOVs. Proteins whose nuclear localization is influenced by importin  $\alpha$  include cell cycle and apoptosis proteins such as Cdk, Cyclin/Cdk complexes, as well as p53, Rb and NF- $\kappa$ B (Brinkmann, 1998). *CAS* has already been shown to be amplified in leukemia, colon and breast cancer by *in situ* hybridization and Southern blot analysis (Brinkmann, 1998). Recently, it was shown by IHC that *Cas* is over-expressed in EOC TOVs compared to LMPs (Brustmann, 2004). *Cas* over-expression has also been observed to be associated with high stage and grade EOC tumors as well as with residual disease (Peiro *et al.*, 2002). By FISH, *CAS* was found to be

amplified in tumors of the serous and endometrioid histopathology sub-types as compared to mucinous and clear cell tumors (Peiro *et al.*, 2002). Together, these observations support the importance of *CAS* de-regulation in EOCs and once again point to the usefulness of the microarray approach.

In conclusion, in the present study we demonstrate the validity of using signature expression patterns to distinguish between low malignant potential and invasive EOCs. The candidates identified are not only useful in defining these two entities, but also provide support for the notion that LMPs are a clearly identifiable entity separate from TOVs. In addition, although LMPs and TOVs share several pathways that are similarly modulated in these cancers with very different prognosis, the differences that define LMPs and TOVs point to key regulators that may influence invasiveness and prognosis and as such provides new insight for the identification for more appropriate therapeutic targets in aggressive EOCs. From a clinical point, a further goal of the molecular characterization of the LMPs will be the identification of molecular markers defining the subset of LMPs which progress to an aggressive disease, and this study provides a starting point to begin to address whether poor prognosis LMPs share more common characteristics and would be characterized as LMPs or TOVs using the candidate genes identified in this study.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and clinical material

Primary cell cultures from EOC samples were established as described (Kruk *et al.*, 1990; Lounis *et al.*, 1994). Cells were maintained in OSE media consisting of 50:50 medium 199:105 (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2.5µg/mL amphotericin B and 50 µg/mL gentamicin (Kruk *et al.*, 1990). Following appropriate consent, tumor samples were collected following surgeries performed at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). Histopathology, grade and stage of tumors were assigned according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria. All samples selected in the study received an additional pathology review by a certified gynecologic pathologist. Only tumors of serous histopathology subtype and from chemotherapy naïve patients were used. Tumor tissues from 6 LMPs and 12 TOVs as well as primary culture from 6 LMPs and 8 TOVs model system were used in the microarray analysis training set while tissues of 12 LMPs and 12 TOVs were used in the immunohistochemistry study. Profiles associated with samples are presented in Table 1. For the LMP disease, only one patient (991) is known to have recurred with ovarian disease of the same grade and histopathology.

### RNA extraction

Total RNA was extracted with TRIzol™ reagent (Gibco / BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY). RNA was either extracted directly from the homogenized tumor tissue or from the tumor cells grown to 80% confluency in 100mm petri dishes. The quality of the RNA was assessed using a 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Mississauga, ON) according to the manufacturer's protocol.

### **Microarray analysis**

The hybridization assays and data collection of expression values were performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, Canada). Briefly, 20 µg of total RNA from each sample was reverse transcribed using oligo-dT primer containing a T7 RNA polymerase-binding site. An *in vitro* transcription was performed on this cDNA and the resulting cRNA was biotinylated via incorporation of biotinylated dUTP and dCTP. DNA from samples was fragmented in 40 mM Tris acetate, 100 mM potassium acetate, and 30 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8.1) at 95°C in order to reduce secondary structure. 15 µg of cRNA was hybridized to an Affymetrix HuGeneFL microarray, washed, stained and scanned with a Hewlett Packard Gene Array scanner. Raw values were assigned by Affymetrix GeneChip software (Mas 4) for each probe set from the scanned image with an accompanying reliability score of Present (P), Marginal (M) or Ambiguous (A).

### **Pre-processing of data**

To allow inter-array comparisons, raw data were normalized for each array by dividing the value obtained for each probe set by the average of the expression values of the whole set and then multiplying the resulting value by 100 as previously described (Novak *et al.*, 2002). After normalization, we considered all values below 20 as technical noise and increased to 20 all expression values below this threshold. All probe sets having an expression value of 20 across all samples in addition to probe sets where an A call was present in all samples were discarded. The log<sub>10</sub> of all remaining values were then calculated and used in all subsequent analyses. Both the raw and normalized datasets are available at <http://www.genomequebec.mcgill.ca/ovarian/>.

### **Statistical analysis**

Candidate genes that allow the distinction between the two *a priori* defined classes of samples under study, i.e. class 1 (LMP) and class 2 (TOV), were selected according to three different statistical tests: a signal-to-noise metric, a modified T-test using SAM and a non-parametric test. The signal-to-noise ratio  $S2N = (\mu_1 - \mu_2) / (\sigma_1 + \sigma_2)$  has

been described and tested where  $\mu$  represents the mean and  $\sigma$  the standard deviation of either class 1 or 2 (Golub *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 2001). The top 5% were considered for further analysis. The modified T-test was computed with the Significance Analysis of Microarray (SAM) as described (<http://www-stat-class.stanford.edu/SAM/SAMServlet>) (Tusher *et al.*, 2001). We performed 1000 permutations in an unpaired data set for each comparison. In order to limit the false discovery rate (FDR) and thus number of false positive genes, a threshold  $\Delta$  was chosen in order to limit the false discovery rate (FDR), to preserve the sensitivity of the test. The non-parametric test of Mann-Whitney (U) using GeneSpring™ software (Silicon Genetics, Redwood City, CA) was also performed (Troyanskaya *et al.*, 2002). Candidate genes were first selected to give a difference of expression with a significance of at least 0.05 thus providing a number of candidates roughly equal to the previous two analyses. DAVID tools GoChart (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>) was used to annotate and classify candidate genes selected by the various algorithms according to major biological processes.

### **Class prediction of samples**

To confirm the predictive value of our set of candidate genes a weighted voting score was used to reclassify samples from our training set as LMPs or TOVs (Golub *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 2001). To predict the class of samples derived from public datasets with our set of candidates (Matei *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2002), a K-nearest neighborhood analysis was computed with GeneSpring™ software (Silicon Genetics, Redwood City, CA).

### **RNA amplification procedure (RAMP)**

For linear amplification by RAMP (Alethia Biotherapeutics, Montreal, Qc), first-strand cDNA was synthesized from 100 ng of total RNA using Thermoscript reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) followed by RNA hydrolysis with RNase A and RNase H. A specialized oligonucleotide mixture comprising a 5'-sequence tag and a randomized 3'-sequence was hybridized to the cDNA molecules, and the cDNA was extended using a DNA polymerase enzyme and

the oligonucleotide as template. Subsequently, the complement to the oligonucleotide sequence tag was added to the 3'-ends of cDNA molecules. Thereafter, an oligonucleotide primer containing the T7 RNA polymerase promoter sequence was added to the cDNAs via the sequence tag and *in vitro* transcription was performed using MegaScript Kit (Ambion Inc., Austin, TX). To further increase the amplification yield, the transcribed RNA was converted to first-strand cDNA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) followed by second-strand DNA synthesis using the T7 RNA polymerase promoter primer. *In vitro* transcription (Ambion Inc., Austin, TX) was again performed and the amplified RNA purified using RNeasy columns (QIAGEN Inc., Mississauga, ON). The RAMP RNA produced is (+) sense.

### **RT-qPCR**

cDNA synthesis was done according to protocols provided with the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). RT-PCR was performed on 2 µg of total RNA using 2.5 µL of the random hexamer solution. Samples were diluted 1/50 in water prior to RT-qPCR. Appropriate PCR conditions (temperature, specificity) were determined using conventional PCR. Positive and negative controls were introduced in all experiments. Amplicons were digested with appropriate restriction enzymes to confirm the specificity of the amplification.

RT-qPCR was performed using the Rotor-gene 3000 Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Research, Montreal Biotech Inc., Montreal, Qc). Quantitect™ SYBR Green PCR (QIAGEN Inc., Mississauga, ON) was used for labeling in a final volume of 25 µL containing 5 µL of sample cDNA and 10 pg of the different primers and reactions performed as described by the manufacturer. Experiments were repeated at least twice. Serial dilutions (1:5) were performed to generate a standard curve for each gene tested in order to define the efficiency of the RT-qPCR reaction and a melt curve was done to confirm the specificity of the reaction. The primers are listed in Supplementary Table 1 (available at



([www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html](http://www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html)). We used the Pfaffl analysis method to measure the relative quantity of gene expression (Pfaffl, 2001). The algorithm is defined by  $R = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{ptarget}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{pref}}(\text{control-sample})}$ . Where R is the relative expression ratio, E the efficiency of the PCR reaction, and  $\Delta C_{\text{p}}$  the difference of the Ct (crossing point of the sample at a giving threshold). The reference gene, *ERK1*, was selected based on its stable expression in all samples in both model systems in microarray analysis and further RT-qPCR confirmed its appropriateness since no significant statistical difference was noted in either tumor tissue ( $p=0.93$ ) or primary culture ( $p = 0.30$ ). Our first sample served as the reference sample in each experiment. The mean value of the Ct from replicates were taken to calculate the R. A Mann-Whitney non-parametric test was further computed for each experiment by using the Statview™ software (SAS, San Francisco, CA) in order to verify that the difference of expression between the two classes of samples was statistically significant.

### **Immunohistochemistry**

The following antibodies were used in immunohistochemistry: anti-CAS goat polyclonal antibody sc-1709 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-CCNE1 rabbit polyclonal antibody sc-198 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-CKS1 goat polyclonal antibody sc-12986 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-TNFR1 rabbit polyclonal antibody sc-7895 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-FLIPs/L rabbit polyclonal sc-8347 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-KRT7 mouse monoclonal antibody Ab-2 (clone OV-TL 12/30) Neomarkers (Medicorp, Montreal, Qc) and anti-KRT19 mouse monoclonal antibody Ab-3 (Medicorp, Montreal, Qc).

Formalin fixed, paraffin embedded tumor specimens were sectioned and stained by an immunoperoxidase method. Briefly, tissue sections were heated at 60°C during 30 min., deparaffinized in toluene and rehydrated in a gradient of ethanol. Following a treatment with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to eliminate endogenous peroxidase activity, slides were submerged in boiling citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0) (J.T. Baker

Philipsburg, NJ) for 15 min unmask antigen. The sections were blocked with a protein blocking serum-free reagent (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) and incubated with the different antibodies for 60 min. at room temperature. The optimal concentration for each primary antibody was determined by serial dilutions. Tissues were incubated with the secondary biotinylated antibody (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) or with the rabbit anti-goat biotin-conjugated antibody (1:300) (sc-2774, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 20 min. followed by incubation with streptavidin-peroxydase complex (Dako Diagnostics Canada Inc.) for 20 min. at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a substrate for peroxydase, nuclei were counterstained with hematoxylin and all staining was observed by light microscopy at 20X magnification. Substitution of the primary antibody with phosphate buffered saline served as a negative control. Representative malignant zones (minimum of three) were scored according to the extent (as a % of total malignant cells) and intensity (value of 0 for absence, 1 for low, 2 for moderate and 3 for high intensity) of staining. All slides were independently analyzed in a blind study by two independent observers. Statistical analyses were performed using the Mann-Withney U test.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Louise Champoux, Manon de Ladurantaye, Lise Portelance, Stéphanie Girard, Daniel Vincent and Kristina Martinu for technical assistance. We appreciate the assistance of Marie-Hélène Dufresne and Marie-Claude Guyot for immunohistochemistry, and Mario Fillion for linear amplifications of RNA. We thank Dr. A. Alobaid for thoughtful comments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (*CIHR*) to Drs A.-M.M.-M., P.N.T., D.M.P. and T.J.H. We recognize also the Fondation Jocelyn Gauvin for initial assistance in this research. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (*FRSQ*). V.O. was supported by studentships from the *CIHR* and Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal. Dr F.R. was supported by a Wyeth-*CIHR* sponsored fellowship and Dr C.M.M by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale and a Bourse d'excellence from the Ministère de l'Éducation du Québec. Dr P.N.T. is a recipient of a Frazer, Monat and Mc Pherson Scholarship and the Stewart Fellowship in Research/Clinical Hematology and Oncology. Dr T.J.H is recipient of an Investigator Award from *CIHR* and a Clinician-scientist Award in Translational Research from the Burroughs Wellcome Fund. Dr D.M.P. is a recipient of a Chercheur-Clinicien Senior, and Dr A.-M.M.-M. is a recipient of a Chercheur National, all fellowships provided by the *FRSQ*.

**REFERENCES**

- Adib TR, Henderson S, Perrett C, Hewitt D, Bourmpoulia D, Ledermann J and Boshoff C. (2004). *Br J Cancer*, **90**, 686-92.
- Anttila M, Kosma VM, Ji H, Wei-Ling X, Puolakka J, Juhola M, Saarikoski S and Syrjanen K. (1998). *J Clin Oncol*, **16**, 2591-600.
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK and Leung PC. (2001). *Endocr Rev*, **22**, 255-88.
- Bayani J, Brenton JD, Macgregor PF, Beheshti B, Albert M, Nallainathan D, Karaskova J, Rosen B, Murphy J, Laframboise S, Zanke B and Squire JA. (2002). *Cancer Res*, **62**, 3466-76.
- Blaustein A, Kaganowicz A and Wells J. (1982). *Cancer*, **49**, 722-6.
- Boran N, Kayikcioglu F, Yalvac S, Tulunay G, Ekinci U and Kose MF. (2000). *Gynecol Obstet Invest*, **49**, 272-4.
- Bose CK and Mukherjea M. (1994). *Cancer Lett*, **77**, 39-43.
- Boss EA, Peters WH, Roelofs HM, Boonstra H, Steegers EA and Massuger LF. (2001). *Eur J Gynaecol Oncol*, **22**, 427-32.
- Brinkmann U. (1998). *Am J Hum Genet*, **62**, 509-13.
- Brustmann H. (2004). *Gynecol Oncol*, **92**, 268-76.
- Burger CW, Prinssen HM, Baak JP, Wagenaar N and Kenemans P. (2000). *Int J Gynecol Cancer*, **10**, 181-197.
- Carreiras F, Denoux Y, Staedel C, Lehmann M, Sichel F and Gauduchon P. (1996). *Gynecol Oncol*, **62**, 260-7.
- Casey RC, Oegema TR, Jr., Skubitz KM, Pambuccian SE, Grindle SM and Skubitz AP. (2003). *Clin Exp Metastasis*, **20**, 143-52.
- Cheng PC, Gosewehr JA, Kim TM, Velicescu M, Wan M, Zheng J, Felix JC, Cofer KF, Luo P, Biela BH, Godorov G and Dubeau L. (1996). *Journal Natl Cancer Inst.*, **88**, 510-8.
- Courjal F, Louason G, Speiser P, Katsaros D, Zeillinger R and Theillet C. (1996). *Int J Cancer*, **69**, 247-53.
- Danguy A, Camby I and Kiss R. (2002). *Biochim Biophys Acta*, **1572**, 285-93.

- Davidson B, Berner A, Nesland JM, Risberg B, Berner HS, Trope CG, Kristensen GB, Bryne M and Ann Florenes V. (2000). *J Pathol*, **192**, 460-9.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B, Trope CG and Florenes VA. (2003). *Clin Cancer Res*, **9**, 2248-59.
- Davies BR, Worsley SD and Ponder BA. (1998). *Histopathology*, **32**, 69-80.
- de Souza PL and Friedlander ML. (1992). *Hematol Oncol Clin North Am*, **6**, 761-82.
- Di Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, Sismondi P and Comoglio PM. (1994). *Int J Cancer*, **58**, 658-62.
- Dietel M and Hauptmann S. (2000). *Virchows Arch*, **436**, 403-12.
- Dore M, Cote LC, Mitchell A and Sirois J. (1998). *J Histochem Cytochem*, **46**, 77-84.
- Farley J, Smith LM, Darcy KM, Sobel E, O'Connor D, Henderson B, Morrison LE and Birrer MJ. (2003). *Cancer Res*, **63**, 1235-41.
- Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H and Tamaya T. (1997). *Cancer Lett*, **115**, 207-12.
- Garzetti GG, Ciavattini A, Muzzioli M and Romanini C. (1999). *Cancer*, **85**, 2226-31.
- Gascoyne DM, Hixon ML, Gualberto A and Vivanco MD. (2003). *Cell Cycle*, **2**, 238-45.
- Giuntoli RL, 2nd, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R and Voynow JA. (1998). *Cancer Res*, **58**, 5546-50.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD and Lander ES. (1999). *Science*, **286**, 531-7.
- Goodman GE, Hellstrom I, Brodzinsky L, Nicaise C, Kulander B, Hummel D and Hellstrom KE. (1990). *J Clin Oncol*, **8**, 1083-92.
- Gotlieb WH, Flikker S, Davidson B, Korach Y, Kopolovic J and Ben-Baruch G. (1998). *Cancer*, **82**, 141-6.
- Gu J, Roth LM, Younger C, Michael H, Abdul-Karim FW, Zhang S, Ulbright TM, Eble JN and Cheng L. (2001). *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1147-52.
- Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK and DuBois RN. (2003). *Cancer Res*, **63**, 906-11.

- Halperin R, Hadas E, Bukovsky I and Schneider D. (1999). *Eur J Gynaecol Oncol*, **20**, 40-4.
- Halperin R, Zehavi S, Dar P, Habler L, Hadas E, Bukovsky I and Schneider D. (2001). *Eur J Gynaecol Oncol*, **22**, 292-6.
- Harlozinska-Szmyrka A, Slesak B, Richter R, Rabczynski J and Cislo M. (1986). *Cancer Detect Prev*, **9**, 347-58.
- Harper JW. (2001). *Curr Biol*, **11**, R431-5.
- Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, Nishimura S, Suzuki T and Kawamura N. (2004). *Hum Pathol*, **35**, 165-75.
- Hefler L, Tempfer C, Heinze G, Mayerhofer K, Breitenecker G, Leodolter S, Reinthaller A and Kainz C. (1999). *Br J Cancer*, **81**, 855-9.
- Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ and Morin PJ. (2000). *Cancer Res*, **60**, 6281-7.
- Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC and Davis BJ. (2002). *Gynecol Oncol*, **86**, 69-78.
- Huntsman D, Resau JH, Klineberg E and Auersperg N. (1999). *Am J Pathol*, **155**, 343-8.
- Hutchinson S, Luo LY, Yousef GM, Soosaipillai A and Diamandis EP. (2003). *Clin Chem*, **49**, 746-51.
- Inui N, Kitagawa K, Miwa S, Hattori T, Chida K, Nakamura H and Kitagawa M. (2003). *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 978-84.
- Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan BY, Gasson JC and Chang DD. (2000). *Cancer Res*, **60**, 6744-9.
- Kamarainen M, Leivo I, Koistinen R, Julkunen M, Karvonen U, Rutanen EM and Seppala M. (1996). *Am J Pathol*, **148**, 1435-43.
- Kastelic L, Turk B, Kopitar-Jerala N, Stolfa A, Rainer S, Turk V and Lah TT. (1994). *Cancer Lett*, **82**, 81-8.
- Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW and Mok SC. (2002). *Jama*, **287**, 1671-9.
- Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M and Mukaida N. (2002). *Cancer Res*, **62**, 6682-7.

- Kohlberger P, Muller-Klingspor V, Heinzl H, Obermair A, Breitenecker G and Leodolter S. (2002). *Anticancer Res*, **22**, 3541-4.
- Korneeva I, Caputo TA and Witkin SS. (2002). *Int J Cancer*, **102**, 483-6.
- Kruk PA, Maines-Bandiera SL and Auersperg N. (1990). *Lab. Invest.*, **63**, 132-6.
- Kudoh K, Kikuchi Y, Kita T, Tode T, Takano M, Hirata J, Mano Y, Yamamoto K and Nagata I. (1999). *Gynecol Obstet Invest*, **47**, 52-7.
- Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R and Gorlich D. (1997). *Cell*, **90**, 1061-71.
- Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Kastelic L, Babnik J, Stolfa A, Rainer S and Turk V. (1992). *Cancer Lett*, **61**, 243-53.
- Lancaster JM, Dressman HK, Whitaker RS, Havrilesky L, Gray J, Marks JR, Nevins JR and Berchuck A. (2004). *J Soc Gynecol Investig*, **11**, 51-9.
- Lancaster JM, Sayer R, Blanchette C, Calingaert B, Whitaker R, Schildkraut J, Marks J and Berchuck A. (2003). *Clin Cancer Res*, **9**, 762-6.
- Lau KM, Mok SC and Ho SM. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5722-7.
- Le Page C, Provencher D, Maugard CM, Ouellet V and Mes-Masson AM. (2004). *Expert Rev Mol Diagn*, **4**, 157-67.
- Lee BC, Cha K, Avraham S and Avraham HK. (2004). *Int J Oncol*, **24**, 847-51.
- Li S, Miner K, Fannin R, Carl Barrett J and Davis BJ. (2004). *Gynecol Oncol*, **92**, 622-7.
- Link CJ, Jr., Kohn E and Reed E. (1996a). *Gynecol Oncol*, **60**, 347-54.
- Link CJ, Reed E, Sarosy G and Kohn EC. (1996b). *Am J Med.*, **101**, 217-225.
- Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot MJ and Mes-Masson AM. (1994). *Exp. Cell Res.*, **215**, 303-9.
- Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Schmandt R, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB and Bast RC, Jr. (2004). *Clin Cancer Res*, **10**, 3291-300.
- Maggiore P, Lorenzato A, Fracchioli S, Costa B, Castagnaro M, Arisio R, Katsaros D, Massobrio M, Comoglio PM and Flavia Di Renzo M. (2003). *Exp Cell Res*, **288**, 382-9.

- Mandelin E, Lassus H, Seppala M, Leminen A, Gustafsson JA, Cheng G, Butzow R and Koistinen R. (2003). *Cancer Res*, **63**, 6258-64.
- Manderson EN, Mes-Masson AM, Novak J, Lee PD, Provencher D, Hudson TJ and Tonin PN. (2002). *Genome Res*, **12**, 112-21.
- Marone M, Scambia G, Giannitelli C, Ferrandina G, Masciullo V, Bellacosa A, Benedetti-Panici P and Mancuso S. (1998). *Int J Cancer*, **75**, 34-9.
- Martoglio AM, Tom BD, Starkey M, Corps AN, Charnock-Jones DS and Smith SK. (2000). *Mol Med*, **6**, 750-65.
- Masuda TA, Inoue H, Nishida K, Sonoda H, Yoshikawa Y, Kakeji Y, Utsunomiya T and Mori M. (2003). *Clin Cancer Res*, **9**, 5693-8.
- Matei D, Graeber TG, Baldwin RL, Karlan BY, Rao J and Chang DD. (2002). *Oncogene*, **21**, 6289-98.
- Milde-Langosch K, Hagen M, Bamberger AM and Loning T. (2003). *Int J Gynecol Pathol*, **22**, 168-74.
- Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y and Zarnegar R. (1994). *Oncogene*, **9**, 2045-52.
- Mok SC, Chao J, Skates S, Wong K, Yiu GK, Muto MG, Berkowitz RS and Cramer DW. (2001). *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1458-64.
- Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH and Reed SI. (2003). *Nature*, **423**, 1009-13.
- Naora H, Yang YQ, Montz FJ, Seidman JD, Kurman RJ and Roden RB. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4060-5.
- Nash MA, Deavers MT and Freedman RS. (2002). *Clin Cancer Res*, **8**, 1754-60.
- Negus RP, Stamp GW, Hadley J and Balkwill FR. (1997). *Am J Pathol*, **150**, 1723-34.
- Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, Allavena P, Sozzani S, Mantovani A and Balkwill FR. (1995). *J Clin Invest*, **95**, 2391-6.
- Negus RP, Turner L, Burke F and Balkwill FR. (1998). *J Leukoc Biol*, **63**, 758-65.
- Nijman HW, van Diest PJ, Poort-Keesom RJ, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Kummer A, Meijer CJ, Melief CJ, Hilgers J and Kenemans P. (2001). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **94**, 114-20.



- Novak JP, Sladek R and Hudson TJ. (2002). *Genomics*, **79**, 104-13.
- Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Takagi T and Nakamura Y. (2000). *Cancer Res*, **60**, 5007-11.
- Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C, Muto MG, Deavers M, Silva EG, Berkowitz RS, Mok SC and Gershenson DM. (2001). *Cancer Res*, **61**, 7264-7.
- Patra D, Wang SX, Kumagai A and Dunphy WG. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 36839-42.
- Peiro G, Diebold J and Lohrs U. (2002). *Am J Clin Pathol*, **118**, 922-9.
- Pfaffl MW. (2001). *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Presneau N, Mes-Masson AM, Ge B, Provencher D, Hudson TJ and Tonin PN. (2003). *Oncogene*, **22**, 1568-79.
- Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov JP, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES and Golub TR. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15149-54.
- Roberts D, Williams SJ, Cvetkovic D, Weinstein JK, Godwin AK, Johnson SW and Hamilton TC. (2002). *DNA Cell Biol*, **21**, 11-9.
- Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Yee H, Sorich J, Speyer JL and Newcomb EW. (2001). *Hum Pathol*, **32**, 808-13.
- Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, Goto T, Sakamoto H, Miyake K, Koyamatsu Y, Akiya T, Iwabuchi H, Muroya T, Ochiai K, Tanaka T, Kikuchi Y and Tenjin Y. (2001). *Hum Cell*, **14**, 305-15.
- Sasano H, Suzuki T, Niikura H, Kaga K, Sato S, Yajima A, Rainey WE and Nagura H. (1996). *Mod Pathol*, **9**, 386-91.
- Sawasaki T, Shigemasa K, Shiroyama Y, Kusuda T, Fujii T, Parmley TH, O'Brien TJ and Ohama K. (2001). *J Soc Gynecol Investig*, **8**, 179-85.
- Sawiris GP, Sherman-Baust CA, Becker KG, Cheadle C, Teichberg D and Morin PJ. (2002). *Cancer Res*, **62**, 2923-8.
- Schneider D, Halperin R, Langer R, Bukovsky I and Herman A. (1997). *Gynecol Oncol*, **66**, 399-404.
- Schraml P, Bucher C, Bissig H, Nocito A, Haas P, Wilber K, Seelig S, Kononen J, Mihatsch MJ, Dirnhofner S and Sauter G. (2003). *J Pathol*, **200**, 375-82.

- Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, Hassell L, Baldwin RL, Karlan BY and Hood L. (1999). *Gene*, **238**, 375-85.
- Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, Reed H, Ellenson LH, Giordano TJ, Fearon ER, Hanash SM and Cho KR. (2002). *Cancer Res*, **62**, 4722-9.
- Seidman JD and Kurman RJ. (2000). *Hum Pathol*, **31**, 539-57.
- Seidman JD and Kurman RJ. (2002). *Cancer*, **95**, 675-6.
- Shapira M, Ben-Izhak O, Bishara B, Futerman B, Minkov I, Krausz MM, Pagano M and Hershko DD. (2004). *Cancer*, **100**, 1615-21.
- Shridhar V, Lee J, Pandita A, Iturria S, Avula R, Staub J, Morrissey M, Calhoun E, Sen A, Kalli K, Keeney G, Roche P, Cliby W, Lu K, Schmandt R, Mills GB, Bast RC, Jr., James CD, Couch FJ, Hartmann LC, Lillie J and Smith DI. (2001). *Cancer Res*, **61**, 5895-904.
- Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK and Shih Ie M. (2002). *Am J Pathol*, **160**, 1223-8.
- Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ and Shih Ie M. (2003a). *J Natl Cancer Inst*, **95**, 484-6.
- Singer G, Shih Ie M, Truskinovsky A, Umudum H and Kurman RJ. (2003b). *Int J Gynecol Pathol*, **22**, 37-41.
- Slotman BJ, Baak JP and Rao BR. (1991). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **38**, 221-7.
- Slotman BJ, Nauta JJ and Rao BR. (1990). *Cancer*, **66**, 740-4.
- Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW and Reed SI. (2001). *Mol Cell*, **7**, 639-50.
- Stone B, Schummer M, Paley PJ, Thompson L, Stewart J, Ford M, Crawford M, Urban N, O'Briant K and Nelson BH. (2003). *Int J Cancer*, **104**, 73-84.
- Sui L, Dong Y, Ohno M, Sugimoto K, Tai Y, Hando T and Tokuda M. (2001a). *Gynecol Oncol*, **83**, 56-63.
- Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tai Y and Tokuda M. (2001b). *Clin Cancer Res*, **7**, 4130-5.

- Sui L, Tokuda M, Ohno M, Hatase O and Hando T. (1999). *Gynecol Oncol*, **73**, 202-9.
- Tamada Y, Iida S, Aoki D, Nozawa S and Irimura T. (1999). *Oncol Res*, **11**, 233-41.
- Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Yamakawa T, Morishita H and Terao T. (2003). *Cancer*, **98**, 424-30.
- Tapper J, Kettunen E, El-Rifai W, Seppala M, Andersson LC and Knuutila S. (2001). *Cancer Genet Cytogenet*, **128**, 1-6.
- Tavassoli. (1988). *Mod. Pathology*, **1**, 407-414.
- Tiniakos DG, Yu H and Liapis H. (1998). *Hum Pathol*, **29**, 1250-4.
- Tonin PN, Hudson TJ, Rodier F, Bossolasco M, Lee PD, Novak J, Manderson EN, Provencher D and Mes-Masson AM. (2001). *Oncogene*, **20**, b.
- Trope C and Kaern J. (1998). *Semin Oncol*, **25**, 372-80.
- Troyanskaya OG, Garber ME, Brown PO, Botstein D and Altman RB. (2002). *Bioinformatics*, **18**, 1454-61.
- Tusher VG, Tibshirani R and Chu G. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5116-21.
- Wang K, Gan L, Jeffery E, Gayle M, Gown AM, Skelly M, Nelson PS, Ng WV, Schummer M, Hood L and Mulligan J. (1999). *Gene*, **229**, 101-8.
- Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, Lockhart DJ, Burger RA and Hampton GM. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1176-81.
- Wong KK, Cheng RS and Mok SC. (2001). *Biotechniques*, **30**, 670-5.
- Yanagawa T, Watanabe H, Takeuchi T, Fujimoto S, Kurihara H and Takagishi K. (2004). *Lab Invest*, **84**, 513-22.
- Yu H, Diamandis EP, Levesque M, Asa SL, Monne M and Croce CM. (1995). *Cancer Res*, **55**, 1603-6.
- Yuce K, Baykal C, Genc C, Al A and Ayhan A. (2001). *Eur J Gynaecol Oncol*, **22**, 228-32.
- Zheng J, Wan M, Zweizig S, Velicescu M, Yu MC and Dubeau L. (1993). *Cancer Res*, **53**, 4138-42.

**Table 1 : Model system and tumor descriptors of tested samples**

Sample	Primary culture passage used	Tumor grade	Tumor stage	Analysis
LMP206	-	B	IIIC	HuFL, IHC
TOV513G	-	3	IIIC	HuFL, IHC
TOV540	8	3	IIIC	HuFL, IHC
LMP720G	14	B	IIIA	HuFL, IHC
TOV730EP	4	3	IIIC	HuFL
LMP793D	-	B	IIIC	HuFL
TOV800 EP	-	3	IIIC	HuFL
LMP845	-	B	IIIC	HuFL, IHC
LMP849G	-	B	IIIC	IHC
TOV881	3	3	IIIC	HuFL, IHC
TOV884D	3	3	IIIC	IHC
TOV892	5	3	IIIC	HuFL
TOV908D	5	3	IIIC	HuFL, IHC
LMP916	3	B	IIIA	HuFL, IHC
LMP920D	6	B	IIIA	HuFL, IHC
TOV952G	-	3	IIIC	IHC
TOV959G	5	3	IIIC	HuFL, IHC
TOV960EP	5	3	IIIC	HuFL
TOV974G	-	2	IIIC	IHC
LMP984	5	B	IB	HuFL, IHC
TOV986EP	-	2	IIIC	HuFL, IHC
LMP991G	5	B	IB	HuFL, IHC
TOV993EP	-	3	IIIC	HuFL, IHC
LMP1010D	4	B	IB	HuFL, IHC
LMP1010G	-	B	IB	HuFL
TOV1054D	-	3	IB	HuFL, IHC
TOV1054 G	-	3	IB	HuFL, IHC
LMP1064D	-	B	IA	IHC
LMP1068D	-	B	IIIC	IHC
TOV1095 D	-	3	IIIC	IHC
TOV1095G	-	3	IIIC	IHC
TOV1108D	-	3	IIIC	IHC
TOV1118D	-	3	IIIC	IHC
TOV1142D	-	3	IIIC	IHC
TOV1150D	-	3	IIC	IHC
TOV1150G	-	3	IIC	IHC
TOV1217EP	-	3	IIIC	IHC

LMP = tumor of low malignancy potential

TOV = primary invasive epithelial ovarian tumors

- = not applicable

**Table 2: Tumor tissues analysis common genes compared to previously reported result for EOC.**

GeneBank	Gene symbol	Chromosome location	Expression in tumor tissue	Expression in MA data	Expression in published results	Quantification technique*	Reference
X15729	DDX5 HLR1	17q21	+	+	+	IS, Q-RT-PCR	Stone <i>et al.</i> , 2003
S82297 J00105	B2M	15q21-q22.2	+	+	+	IHC	Nyman <i>et al.</i> , 2001
570348	ITGB3 GP3A CD61	17q21.32	-	-	-	IHC	Carreiras <i>et al.</i> , 1996
U33286	CSE1L CAS	20q13	+	+	+	IHC, FISH	Brustmann <i>et al.</i> , 2004 ; Peiro <i>et al.</i> , 2002
M74093	CCNE1	19q12	+	+	+	IHC, SQ-PCR, SB, NB, FISH	Schraml <i>et al.</i> , 2003; Milde-Langosch <i>et al.</i> , 2003; Farley <i>et al.</i> , 2003; Sun <i>et al.</i> , 2001; Rosenberg <i>et al.</i> , 2001; Sawaris <i>et al.</i> , 2002; Sun <i>et al.</i> , 1999; Marone <i>et al.</i> , 1998; Courjal <i>et al.</i> , 1996
U03100	CTNNA1	5q31	+	-	-	IHC	Anttila <i>et al.</i> , 1998; Davies <i>et al.</i> , 1998
J03473	ADPRT PARP PPOL	1q41-q42	+	+	+	IHC, SQ-RT-PCR	Davidson <i>et al.</i> , 2000; Fujimoto <i>et al.</i> , 1997
HG721-IT4828	PAEP PP14 GdA GdS	9q34	-	-	-	IHC	Mandelin <i>et al.</i> , 2003
D00762	PSMA3 IHC8 PSC3	14q23	+	+	+	IHC, IS	Kamaramen <i>et al.</i> , 1996
M63180	TARS	5p13-cen	+	-	-	MA	Wong <i>et al.</i> , 2001
Z25535	NUP153	6pter-p22.1	+	+	+	MA	Sawaris <i>et al.</i> , 2002
X61100	NDUF51	2q33-q34	+	+	+	MA	Presneau <i>et al.</i> , 2003
M21142			+	+	+	MA	Manderson <i>et al.</i> , 2002; Martoglio <i>et al.</i> , 2000
L33881	PRKCI	Xq21.3	+	+	+	MA	Ono <i>et al.</i> , 2000
X54941	CKS1	8q21	+	+	+	MA	Adib, <i>et al.</i> , 2004
J03827	NSE1 YB1 DBPB	1p34	+	-	-	MA	Adib, <i>et al.</i> , 2004
U30825	SFRS9 SRp30c	12	+	+	+	MA	Ismail <i>et al.</i> , 2000
M36341	ARF4	3p21.2-p21.1	+	+	+	MA	Manderson <i>et al.</i> , 2002
M22538	NDUFV2	18p11.31-p11.2	+	+	+	MA	Manderson <i>et al.</i> , 2002; Shridhar <i>et al.</i> , 2001; Martoglio <i>et al.</i> , 2000
D87989	UGTREL1 SLC35B1	17	+	+	+	MA	Manderson <i>et al.</i> , 2002; Shridhar <i>et al.</i> , 2001; Martoglio <i>et al.</i> , 2000
X70394	ZNF146 OZF	19q13.1	+	-	-	MA	Presneau <i>et al.</i> , 2003
X15341	COX6A1	12q24.2	+	+	+	MA	Wang <i>et al.</i> , 1999
Y00318			+	-	-	MA	Ono <i>et al.</i> , 2000
V00599	TUBB M40	6p21.3	+	-	-	MA	Matei <i>et al.</i> , 2002
U59309	FH1	1q42.1	+	-	-	MA	Sakamoto <i>et al.</i> , 2001
M86400	YWHAZ 14-3-3-ZETA	2p25.2-p25.1	+	+	+	MA	Ismail <i>et al.</i> , 2000
L41351	PRSS8	16p11.2	+	+	+	MA, IHC, Q-PCR	Wong <i>et al.</i> , 2001; Mok <i>et al.</i> , 2001
X07438	RBPC CRBP	3	-	-	-	MA, SSH	Ono <i>et al.</i> , 2000; Adib, <i>et al.</i> , 2004
M90657	TM4SF1 TAAL6 M351	3q21-q25	+	+	+	MA, IHC	Roberts <i>et al.</i> , 2002
M22877	HCS CYCS	7	+	+	+	MA, ELISA	Wang <i>et al.</i> , 1999; Goodman <i>et al.</i> , 1990
U65928	COP55 JAB1 SGN5	8	+	+	+	MA	Bayani <i>et al.</i> , 2002
L11284	MAP2K1 MEK1	15q22.1-q22.33	+	+	+	MA, IHC	Ono <i>et al.</i> , 2000; Martoglio <i>et al.</i> , 2000; Korneeva <i>et al.</i> , 2002
M38690	CD9 MIC3	12p13	+	+	+	MA, IHC	Sawaris <i>et al.</i> , 2002
M59979	PTGS1 COX1 PGI1S1	9q32-q33.3	+	+	+	MA, IHC, WB	Wang <i>et al.</i> , 1999; Welsh <i>et al.</i> , 2001; Dore <i>et al.</i> , 1998
U20758	SPP1 OPN ETA1	4q21-q25	+	+	+	MA, IHC, Q-PCR	Adib, <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2001; Lu <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2002
X02182	LDHA	11p15.4	+	+	+	MA, IHC, WB, IS	Bayani <i>et al.</i> , 2002; Timiakos <i>et al.</i> , 1998
K03515	GPIIIB PGI AMP NLK	19q13.1	+	+	+	MA, LDH activity	Sawaris <i>et al.</i> , 2002; Schneider <i>et al.</i> , 1997; Yucca <i>et al.</i> , 2001; Rowan <i>et al.</i> , 2000; Halpern <i>et al.</i> , 1999; Kudoh <i>et al.</i> , 1999; Boise <i>et al.</i> , 1994
U37518	TNFSF10 TRAIL APO2L	3q26	+	+	+	MA, NB, SQ-RT-PCR	Wang <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2004
M14219	DCN PG II PG40	12q23	+	+	+	MA, Q-RT-PCR	Lancaster <i>et al.</i> , 2004; Lancaster <i>et al.</i> , 2003
X76223			+	+	+	RT-PCR	Nash <i>et al.</i> , 2002
U78095	SPINT2 HAI2	19q13.1	+	+	+	MA, RT-PCR, IHC, WB	Wang <i>et al.</i> , 1999; Bayani <i>et al.</i> , 2002; Shridhar <i>et al.</i> , 2001; Casey <i>et al.</i> , 2003; Nash <i>et al.</i> , 2002
X57152	CSNK2B CK2B	6p21.3	+	+	+	MA, SAGE	Shridhar <i>et al.</i> , 2001; Hough <i>et al.</i> , 2000
U46692	CSTB STFB	21q22.3	+	+	+	MA, SQ-RT-PCR	Welsh <i>et al.</i> , 2001; Hough <i>et al.</i> , 2000; Tnanka <i>et al.</i> , 2003 Jul 15;98(2):424-30
			+	+	+	MA, WB	Ono <i>et al.</i> , 2000; Wong <i>et al.</i> , 2001
			+	+	+	WB	Kastelic <i>et al.</i> , 1994; Lah <i>et al.</i> , 1992

+ = overexpressed in TOVs

- = underexpressed in TOVs

\* Quantification technique refers to the technique used by other groups to assess the expression of the candidate gene

MA = microarray analysis

WB = Western blot

SB = Southern blot

NB = Northern blot

IS = in situ hybridization

PCR = polymerase chain reaction

Q-RT-PCR and SQ-RT-PCR = quantitative (Q) and semi-quantitative (SQ) reverse transcriptase PCR

SAGE = Serial analysis of gene expression

As = antisense oligonucleotide

FISH = fluorescence in situ hybridization

IHC = immunohistochemistry

SSH = suppression subtractive hybridization

**Table 3: Primary culture analysis common genes compared to previously reported result for EOC.**

Genebank	Gene Symbol(s)	Chromosome location	Expression in tumor tissue MA data	Expression in published results	Quantification technique*	Reference
U21090	POLD2	7	+	+	MA	Ono <i>et al.</i> , 2000
U33286	CSEIL CAS	20q13	+	+	IHC	Brustmann <i>et al.</i> , 2004 ; Peiro <i>et al.</i> , 2002
X12876	KRT18	12q13	+	+	MA	Adib. <i>et al.</i> , 2004
M74093	CCNE1	19q12	+	+	IHC, SQ-PCR, SB, NB, FISH	Schraml <i>et al.</i> , 2003; Milde-Langosch <i>et al.</i> , 2003; Farley <i>et al.</i> , 2003; Sui <i>et al.</i> , 2001; Rosenberg <i>et al.</i> , 2001; Sawins <i>et al.</i> , 2002; Sui <i>et al.</i> , 1999; Marone <i>et al.</i> , 1998; Courjal <i>et al.</i> , 1996
X74929	KRT8	12q13	+	+	MA	Welsh <i>et al.</i> , 2001; Adib <i>et al.</i> , 2004; Shrdhar <i>et al.</i> , 2001; Wang <i>et al.</i> , 1999
Y00503	KRT19	17q21	+	+	MA	Welsh <i>et al.</i> , 2001; Adib <i>et al.</i> , 2004
				-	MA	Ismail <i>et al.</i> , 2000
M16937	HOXB7 HOXC2	17q21-q22	+	+	RT-PCR, WB, ELISA	Naora, <i>et al.</i> , 2001
HG2259	TUBA	12	+	-	MA	Sawins <i>et al.</i> , 2002;
M61916	LAMB1	7q22	+	+	IHC	Kohlberger <i>et al.</i> , 2002
X13794	LDHB	12p12.2-p12.1	+	+	LDH activity	Schneider <i>et al.</i> , 1997; Yuce <i>et al.</i> , 2001; Boran <i>et al.</i> , 2000; Halperin <i>et al.</i> , 1999
M13955	KRT7 SCL	12q12-q21	+	+	MA	Welsh <i>et al.</i> , 2001
U65579	NDUFS8 TYKY	11q13	+	+	MA	Martoglio <i>et al.</i> , 2000; Manderson <i>et al.</i> , 2002; Shrdhar <i>et al.</i> , 2001
X87176	HSD17B4 DBP	5q21	+	+	IHC	Sasano <i>et al.</i> , 1996
M23263	AR DHTR	Xq11.2-q12	-	-	RT-PCR, IHC	Lau <i>et al.</i> , 1999; Slotman <i>et al.</i> , 1991; Slotman <i>et al.</i> , 1990
J04177	COL1A1	1p21	-	+	MA	Matei <i>et al.</i> , 2002; Ismail <i>et al.</i> , 2000
U25988	PSG11 PSG13	19q13.2	-	+	IHC	Blaustein <i>et al.</i> , 1982
HG2147	MUC3		-	-	NB, RT-PCR	Giuntoli <i>et al.</i> , 1998; Tamada <i>et al.</i> , 1999
M24485	GSTP1 GST3 FAFES3	11q13	-	+	MA, ELISA	Martoglio <i>et al.</i> , 2000; Boss <i>et al.</i> , 2001
D87017	IGL@	22q11.1-q11.2	-	-	MA	Shrdhar <i>et al.</i> , 2001
				+	MA	Adib <i>et al.</i> , 2004
X53416	FLNA FLN1 ABP280	Xq28	-	-	MA	Sawins <i>et al.</i> , 2002;
S52969	MMP2 CLG4A	16	-	+	IHC	Garzetti <i>et al.</i> , 1999
U67092	ATM	11	-	-	IHC	Hashiguchi <i>et al.</i> , 2004
HG4069- HT4339_s_at	SCYA2 MCP1 MCAF	17	-	-	IHC	Negus <i>et al.</i> , 1998
				+	MA, ELISA, RT-PCR, IS	Hefler <i>et al.</i> , 1999; Negus <i>et al.</i> , 1997; Negus <i>et al.</i> , 1995
X68733	SERPINA3 AACT	14q32.1	-	+	IHC	Harlozinska-Szmyrka <i>et al.</i> , 1986; Hutchinson <i>et al.</i> , 2003; Yu <i>et al.</i> , 1995
HG4272- HT4542	MET HGFR RCCP2	7q31	-	-	IF	Huntsman <i>et al.</i> , 1999
				+	MA, SB, WB, RT-PCR, IHC, IS	Maggiara <i>et al.</i> , 2003; Tapper <i>et al.</i> , 2001; Di Renzo <i>et al.</i> , 1994; Moghul <i>et al.</i> , 1994
U32907	P37NB	7q22.1- 7q31.33	-	+	MA	Ismail <i>et al.</i> , 2000

+ = overexpressed in TOVs

- = underexpressed in TOVs

\* Quantification technique refers to the technique used by other groups to assessed the expression of the candidate gene

MA = microarray analysis

WB = Western blot

SB = Southern blot

NB = Northern blot

IS = in situ hybridization

PCR = polymerase chain reaction

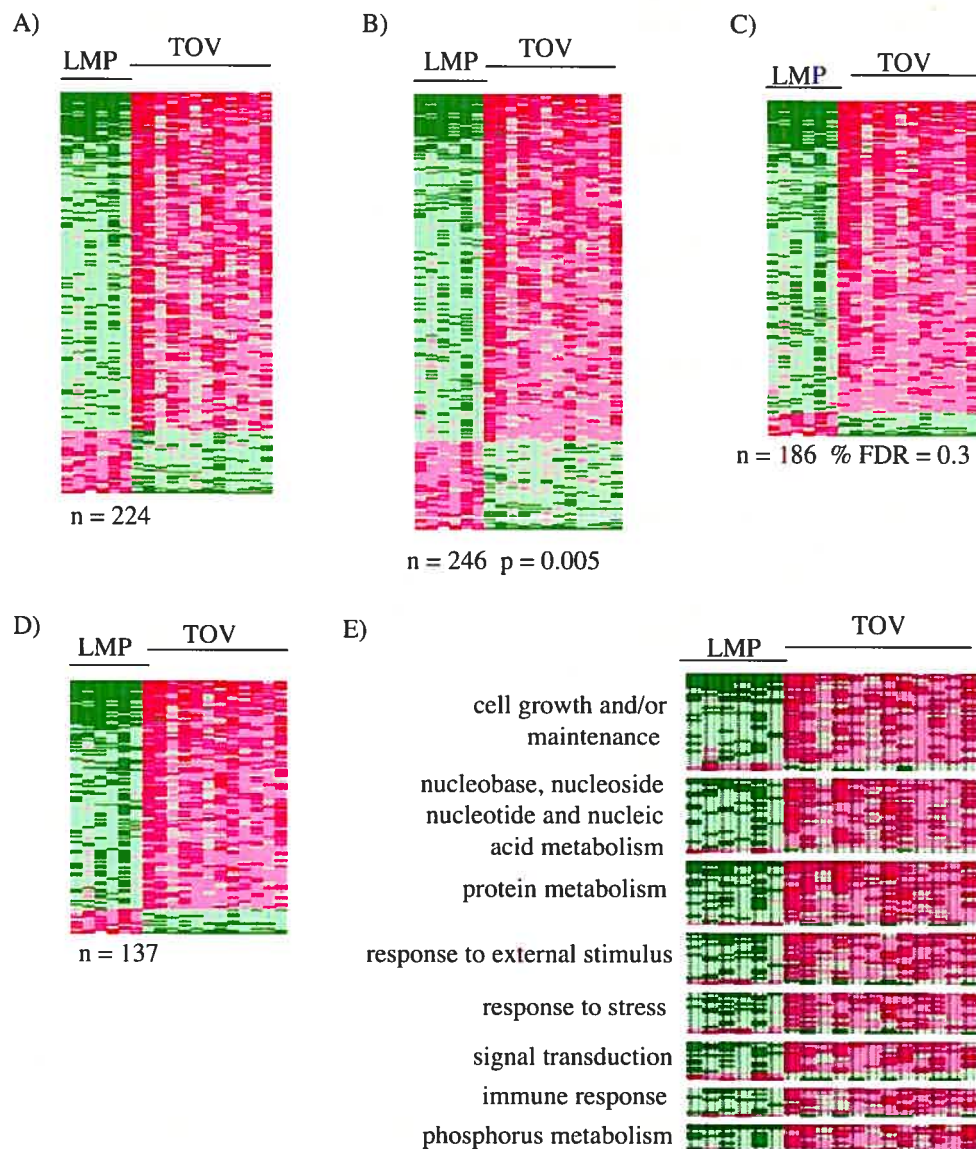
RT-PCR = reverse transcriptase PCR

SQ-PCR = semi-quantitative reverse transcriptase PCR

FISH = fluorescence *in situ* hybridization

IHC = immunohistochemistry

IF = immunofluorescence

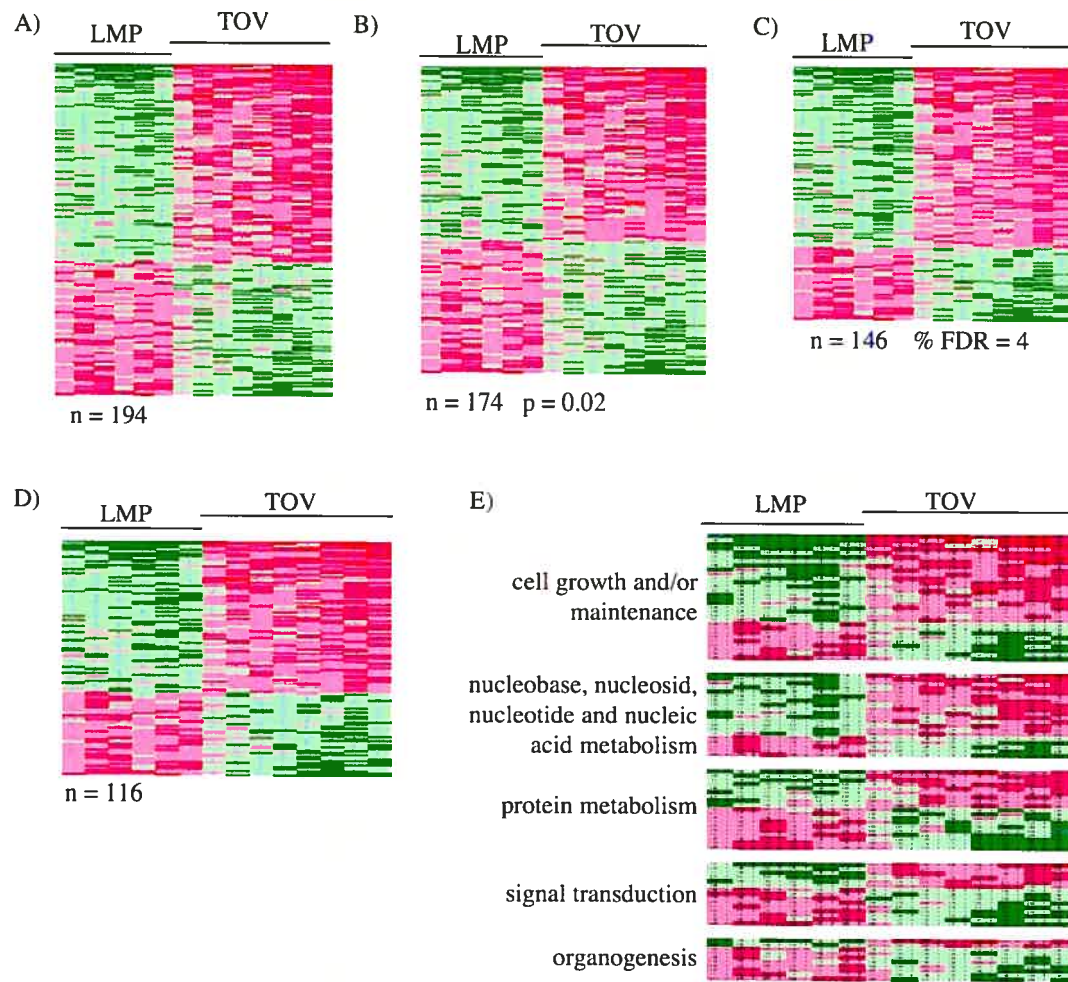


**Figure 1 Gene expression profile of low (LMP) and high (TOV) malignancy potential tumors using class prediction methods applied to HuFL microarray datasets in the tumor tissue model system.**

**Figure 1 Gene expression profile of low (LMP) and high (TOV) malignancy potential tumors using class prediction methods applied to HuFL microarray datasets in the tumor tissue model system.**

Each row corresponds to a gene/EST and each column corresponds to a tumor tissue sample. Expression levels greater than the average of the mean of each class are shaded in red and those below the average of the mean are shaded in green. Shades progress in incremental values of one standard deviation (sum of the standard deviation of each class). Candidate genes were selected using either: A) the Signal-to-noise ratio , B) the Mann-Whitney's U test, C) d score performed using the Significant Analysis of Microarray software), D) candidate genes selected simultaneously by all three statistical methods. Common genes represented in panel D were resorted by major biological processes based on functions described in the NIH-DAVID GoChart tool (E). Complete gene lists and array values are available in **Supplementary Figure 1 A - E** (available at [www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html](http://www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html)).



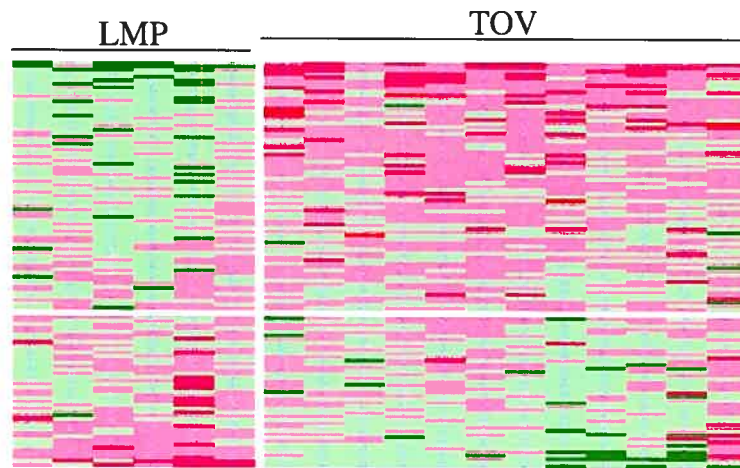


**Figure 2 Gene expression profile of low (LMP) and high (TOV) malignancy potential tumors using class prediction methods applied to HuFL microarray datasets in the primary culture model system.**

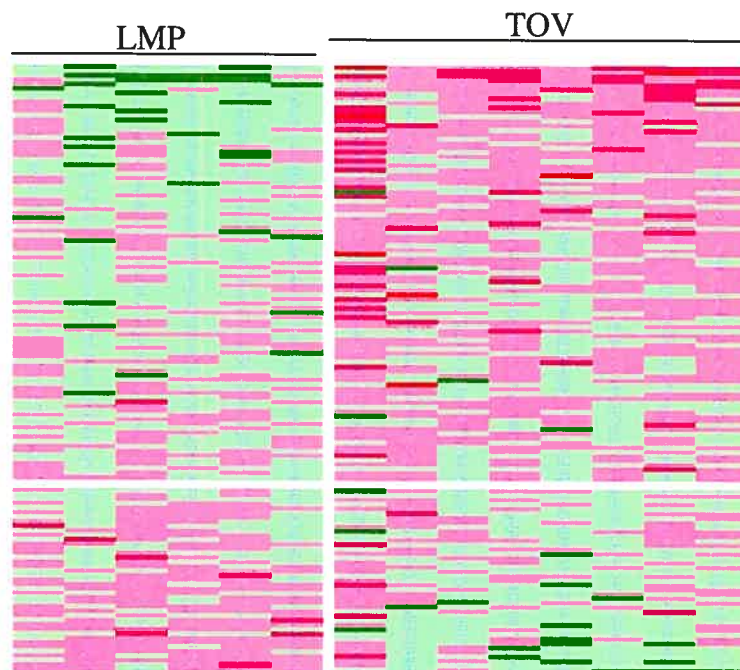
**Figure 2 Gene expression profile of low (LMP) and high (TOV) malignancy potential tumors using class prediction methods applied to HuFL microarray datasets in the primary culture model system.**

Each row corresponds to a gene/EST and each column corresponds to a primary culture sample. Expression levels greater than the average of the mean of each class are shaded in red and those below the average of the mean are shaded in green. Shades progress in incremental values of one standard deviation (sum of the standard deviation of each class). Candidate genes selected using either: A) the Signal-to-noise ratio, B) the Mann-Whitney's U test, C) d score performed using the Significant Analysis of Microarray software, D) candidate genes selected simultaneously by all three statistical methods. Common genes represented in panel D were resorted by major biological processes based on functions described in the NIH-DAVID GoChart tool (E). Complete gene lists and array values are available in Supplementary Figure 2A-E (available at [www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html](http://www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html)).

A)



B)

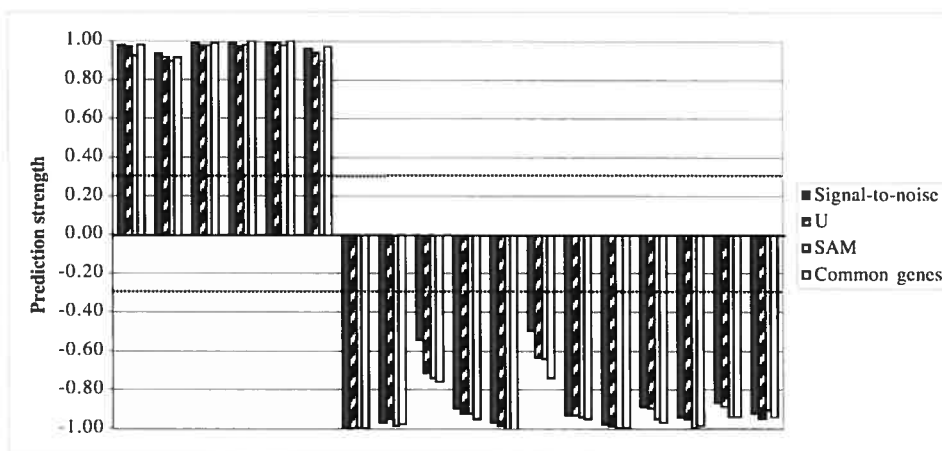


**Figure 3** Common candidates identified by class prediction to stratify LMPs and TOVs were used to retrieve the corresponding expression in the alternate model system.

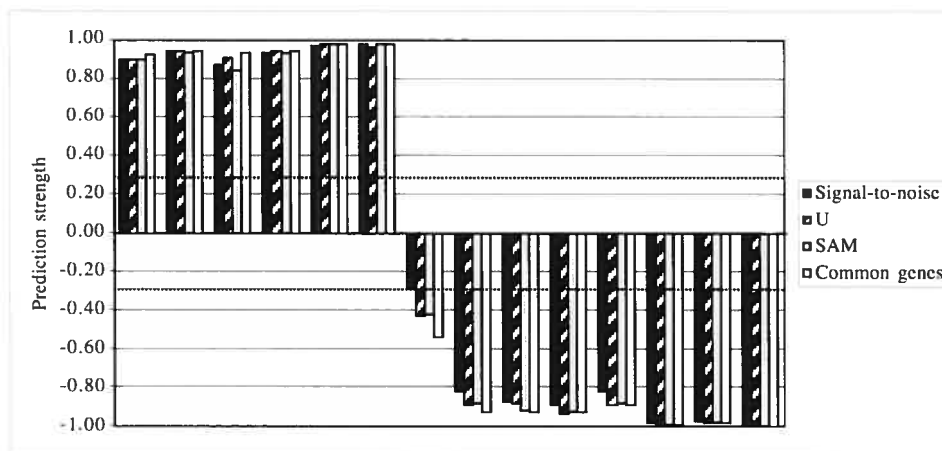
**Figure 3 Common candidates identified by class prediction to stratify LMPs and TOVs were used to retrieve the corresponding expression in the alternate model system.**

Each row corresponds to a gene/EST and each column corresponds to a tumor sample. Expression levels greater than the average of the mean of each class are shaded in red and those below the average of the mean are shaded in green. Shades progress in incremental values of one standard deviation. A) Candidates genes selected in the primary culture model system colored according to their expression in tumor tissue. B) Candidates genes selected in the tumor tissue model system colored according to their expression in primary culture. Note that general trends in expression patterns for class prediction are maintained between both model systems, although prediction strengths are different. Complete gene lists and array values are available in Supplementary Figure 3A-B (available at [www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html](http://www.nature.com/onc/journal/v24/n29/supinfo/1208214s1.html?url=/onc/journal/v24/n29/abs/1208214a.html)).

A)



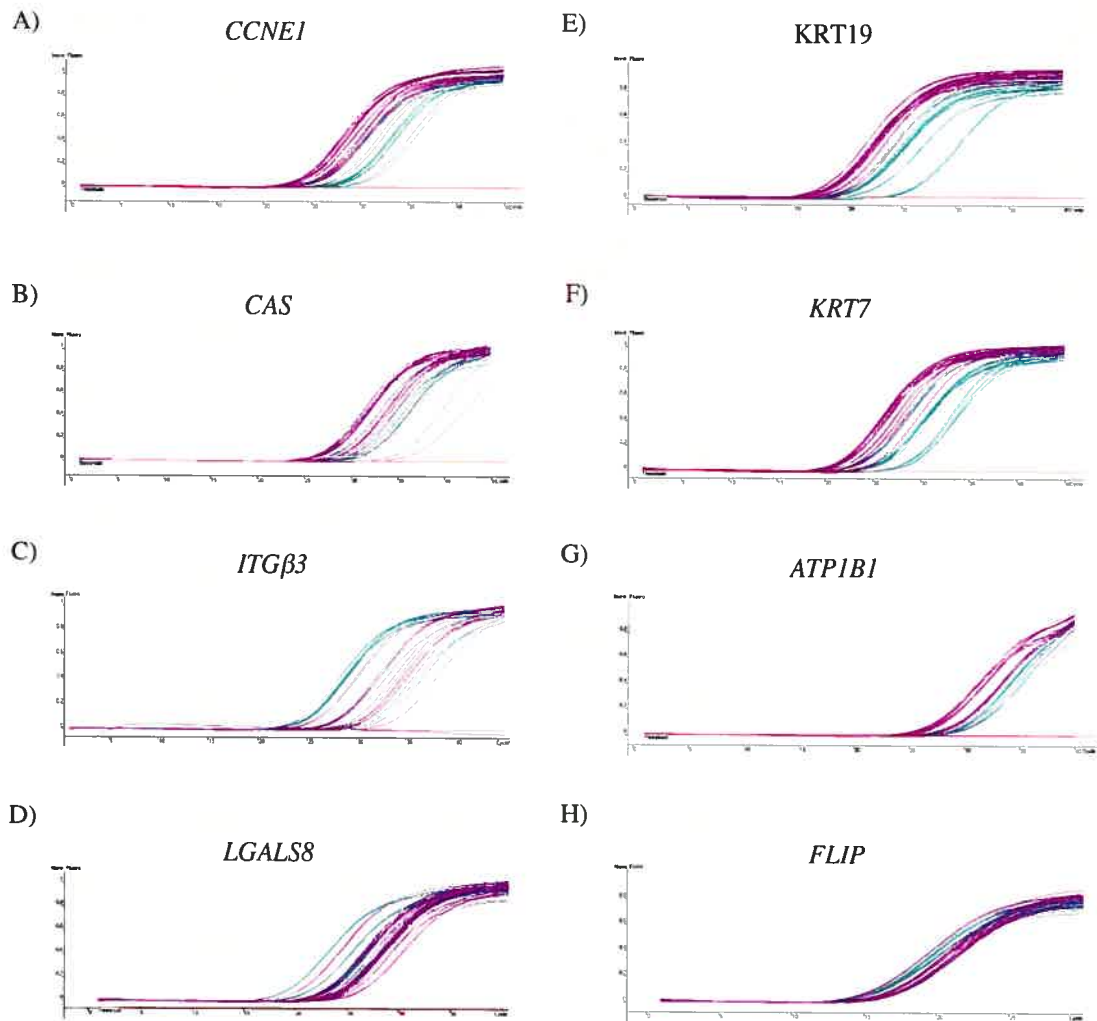
B)



**Figure 4 Prediction strength for the reclassification of the tumors included in the starting set.**

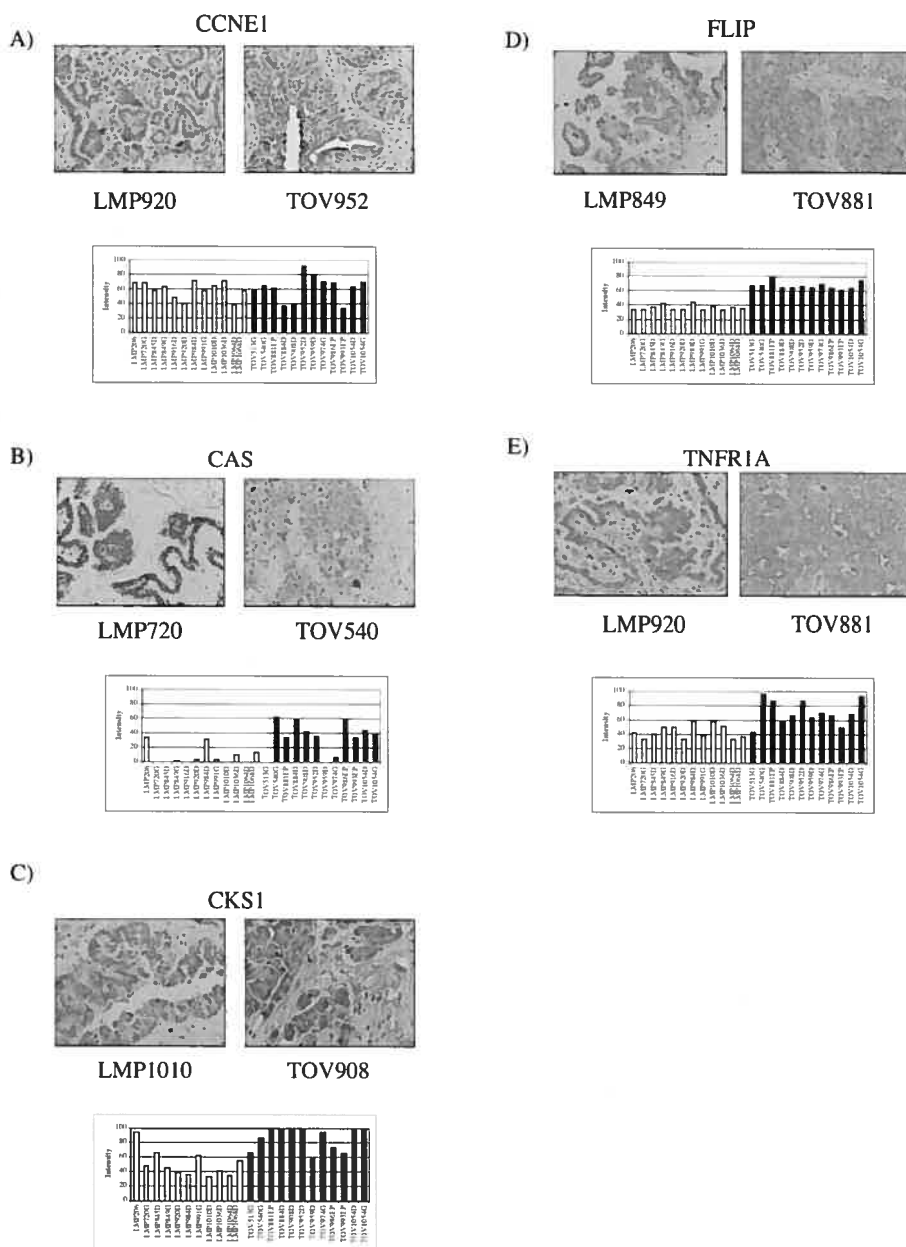
**Figure 4 Prediction strength for the reclassification of the tumors included in the starting set.**

A) The prediction strengths of candidates selected in the tumor tissue model were calculated as described (Golub *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 2001) for each set of candidate genes selected by the different statistical methods. In an n-way cross-validation, individual samples are removed each in turn from the training set and are tested against the remaining n-1. Samples are represented by a series of columns (first six LMPs, remaining TOVs) representing different candidate sets. Similar analyses were performed for candidates selected in the primary culture model (B). Samples are represented by a series of columns (first six LMPs, remaining TOVs) representing different candidate sets. Note that in both model systems all samples are correctly classified and that prediction strengths are higher for the common candidates, especially in samples showing lower prediction values.



**Figure 5 Validation of the candidate genes by RT-qPCR. The analysis was done using the Pfaffl analysis method using ERK1 as the internal control gene and statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test.**

The candidates tested were: A) *CCNE1* ( $p=0.002$ ) B) *CAS* ( $p=0.07$ ), C) *ITG3*  $\beta$  ( $p=0.08$ ), D) *LGALS8* ( $p=0.09$ ), E) *KRT19* ( $p=0.01$ ), F) *KRT7* ( $p=0.02$ ), G) *ATP1B1* ( $p=0.01$ ), H) *FLIP* ( $p=0.05$ ). Panels A to D represent candidates selected and tested in the tumor tissue model system. Panels E to H represent candidates selected and tested in the primary culture model system. LMPs are represented in green and TOVs are colored in purple.



**Figure 6 Protein expression of the candidate genes assessed by immunohistochemistry.** Representative images of the immunoperoxidase stained slides are represented (20X magnification). Staining was quantified based on both relative intensity and extent of staining and the results are presented graphically for each tissue. Statistical analysis was performed based on the Mann-Whitney's U test. Candidate genes tested were: A) *CCNE1* ( $p= 0.08$ ), B) *CAS* ( $p= 0.005$ ), C) *CKS1* ( $p=0.0005$ ), D) *FLIP* ( $p<0.0001$ ) and E) *TNFR1A* ( $p= 0.0003$ ). Candidate genes were identified either in the tumor tissue model (*CCNE1*, *CAS* and *CKS1*) or in primary cultures (*CCNE1*, *CAS*, *FLIP*, *TNFR1A*).



### CHAPITRE III

**Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer**

**Véronique Ouellet<sup>1</sup>, Marie-Claude Guyot<sup>1</sup>, Cécile Le Page<sup>1</sup>, Abdelali Filali-Mouhim<sup>1</sup>, Christian Lussier<sup>2</sup>, Patricia N. Tonin<sup>3,4,5</sup> Diane M. Provencher<sup>1,6</sup> and Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,7</sup>.**

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal/ Institut du cancer de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>3</sup>Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada.

<sup>4</sup>Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada;

<sup>5</sup>The Research Institute of McGill University Health Centre, Montreal, Canada;

<sup>6</sup>Division of Gynecologic Oncology /Université de Montréal, Montreal, Canada,

<sup>7</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montreal, Canada.

Article publié dans:

**Int. J. Cancer, Aug 1;119(3):599-607, 2006**

**Keywords :** serous epithelial ovarian cancer, low malignant potential borderline tumors, diagnostic and prognostic markers

*\* V. Ouellet est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. C. Le Page et M-C Guyot ont participé à la relecture des lames d'immunohistochimie. A. Filali-Mouhim a contribué à l'analyse statistique. C. Lussier a effectué à la révision de la pathologie des échantillons. D.M. Provencher, P.N. Tonin et A-M. Mes-Masson ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

---

Véronique Ouellet

---

Dr. Anne-Marie Mes-Masson

Directrice de recherche

## RÉSUMÉ

Les profils moléculaires constituent une approche puissante afin d'identifier des marqueurs cliniques potentiels pour le diagnostic et le pronostic des patientes en plus de fournir une meilleure compréhension de la biologie du cancer épithélial de l'ovaire (EOC). Suite à des analyses de micropuces à ADN effectuées à l'aide de la micropuce HuFL, nous avons identifié précédemment des gènes distinctifs des tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP) et des tumeurs invasives (TOV). Dans la présente étude, nous avons utilisé l'immunohistochimie afin de déterminer l'expression protéique d'une portion des gènes candidats identifiés (Ahr, Paep, Ran, Met, Mek1, Ccne1, Ccd20, Cks1 and Cas). Pour cette analyse, nous avons utilisé un microétalage de tissus composé de 235 tumeurs ovariennes de divers grades (0 à 3) et stades (I à IV). Toute les protéines étudiées ont montré une expression protéique différentielle entre les LMP et les TOV. Des différences d'expression significatives entre les LMP et les TOV de grade 1 ont été obtenues pour la Ccne1 et Ran ( $p < 0.01$ ). De plus, Ccne1, Ran, Cdc20 et Cks1 ont montré une différence d'expression associée au stade de la maladie. Bien que la forte expression de la Ccne1 ait déjà été associée au pronostic sombre des patientes atteintes d'EOC, les analyses présentées dans cette étude montrent que le niveau protéique de Ran ou de Cdc20 semble plus fortement associé au mauvais pronostic des patientes que celui de la Ccne1. L'application de ces biomarqueurs dans le diagnostic initial de même que dans le nomogramme des patientes atteintes d'EOC pourrait se montrer intéressant dans la prise en charge des patientes.

## ABSTRACT

Molecular profiling is a powerful approach to identify potential clinical markers for diagnosis and prognosis as well as providing a better understanding of the biology of epithelial ovarian cancer. Based on the analysis of HuFL expression data, we have previously identified genes that distinguish low malignant potential and invasive serous epithelial ovarian tumors. In this study, we used immunohistochemistry to monitor a subset of differently expressed candidates (Ahr, Paep, Ran, Met, Mek1, Ccne1, Ccd20, Cks1 and Cas). A tissue array composed of 235 serous tumors of different grades (0 to 3) and stages (I to IV) was used in this analysis. All markers assayed presented differential protein expression between serous tumors of low and high grade. Significant differences in Ccne1 and Ran expression were observed in a comparison of low malignant potential and grade 1 tumor samples ( $p < 0.01$ ). In addition, irrespective of the grade, Ccne1, Ran, Cdc20 and Cks1 showed significant differences of expression in association with the clinical stage of disease. While high level of Ccne1 have previously been associated with poor outcomes, here we found that high level of either Ran or Cdc20 appear to be more tightly associated with a poor prognosis ( $p < 0.001$ , 0.03, respectively). The application of these biomarkers in both the initial diagnosis and prognostic attributes of patients with epithelial ovarian tumors should prove to be useful in patient management.

## INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecological malignancy. Among the different histopathological subtypes present in ovarian tumors, serous is the most frequent and the second most lethal<sup>1, 2</sup>. EOC tumors can be subdivided in three distinct groups: benign, borderline or low malignant potential (LMP) and invasive ovarian tumors (TOV). Benign tumors are characterized by the proliferation of a single layer of cells without cellular atypia. LMPs and TOVs show epithelial proliferation as multilayers and present cytologic atypia. However LMPs are morphologically distinct from TOVs as they present no invasion of the ovarian stroma although microinvasion can be observed<sup>3-5</sup>. EOCs are graded according to degree of differentiation: LMPs (referred to as either grade B or grade 0) are minimal deviation from their benign counterpart while well differentiated tumors are grade 1 (G1), moderately differentiated are grade 2 (G2), and poorly differentiated are grade 3 (G3) carcinomas. Four stages are used according to the volume and extent of tumor spread. Stage I tumors are limited to one or both ovaries, stage II tumors are associated with pelvic extension, stage III tumors are characterized by spreading outside the pelvis into the abdominal cavity and patients with stage IV tumors present distant metastasis<sup>1,6</sup>.

Approximately 20% of malignant epithelial tumors are LMPs. Serous LMPs are the most frequent subtype and have a better prognosis than serous TOVs. The five-year survival rate of LMP patients reaches 90-95% in early stage disease and 55-70% for stage III disease compared to 30-40% for G3 TOVs<sup>7</sup>. A portion of the LMPs that are considered as high risk LMPs present a micropapillary structure, a stromal microinvasion or invasive implant and correlate to a worse prognosis compared to patients lacking these features<sup>5,8,9</sup>. Recurrence, seen in less than 15% of patients with LMPs, generally remain LMPs although in rarer cases the disease becomes more invasive with a prognosis similar to that of TOVs<sup>10</sup>.

In EOC several protein markers show differential expression between tumors of high and low grade including Ccne1, CtnnB1, WT1, p53, c-Kit, Bcl2, Her-2, Muc1, Krt7, clusterin, p21<sup>11-15</sup>. However, none of these markers present differential expression between tumors of G0 and those of G1, the two most differentiated types of tumors. While many markers have been described, they have not been extensively exploited clinically, either for diagnosis or therapeutics. Few markers to date have been shown to correlate with the prognosis of patients with EOC. These markers, including Her-2, Ccne1, p27, bikunin, IGF-2, p53, p21 and Pgr, were assessed either by ELISA or immunohistochemistry<sup>16-23</sup> (and reviewed in<sup>24</sup>). However, no analysis on the sensitivity and specificity of these markers were performed in these studies.

In an earlier study using cDNA microarrays to define the molecular profile of LMPs and G3 TOVs<sup>25</sup>, candidate genes capable of discriminating between these two classes of EOCs were identified and differential gene expression was validated for a subset of candidates using quantitative PCR. Based on the notion that this differential gene expression may be reflected in protein expression levels, here we report an extensive immunohistochemical analysis of a subset of these candidate genes. For this purpose, we built a serous epithelial ovarian tumor tissue array composed of 235 specimens of G0, G1, G2 and G3. Immunohistochemistry results were related to various clinical parameters in order to determine their usefulness in the stratification of EOC tumors.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patient tissue specimens and clinical data**

After obtaining the appropriate consent, tumor samples were collected and banked following surgeries performed within the Division of Gynecologic Oncology at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). Histopathology, tumor grade and stage were reviewed and scored by a pathologist according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) <sup>6</sup>. Clinical data were extracted from the Système d'Archivage des Données en Oncologie (SARDO) that includes entries on initial diagnosis, treatment, toxicity and clinical outcomes. We selected the samples of our tumor bank that corresponded to the following criteria: serous histopathology type, tumors of G0, G1, G2 and G3, all from chemotherapy naïve patients. Samples were collected between 1993 and 2003 and a Gynecologic Oncologist reviewed clinical data for all patients. Among the different grades, the mean age of patients at diagnosis were 50 (G0), 58 (G1), 59 (G2), and 63 (G3) years.

### **Serous epithelial ovarian cancer tissue array**

Tissue samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. A hematoxylin-eosin stained slide allowed the selection of two representative cores of 0.6 mm in diameter <sup>26</sup>. The tissue array was composed of 56 LMPs, 11 tumors of G1, 53 of G2 and 115 of G3 serous EOC. The tissue array was then sectioned, stained with hematoxylin-eosin and received a final pathology review. For immunohistochemistry, the tissue array was cut in 5µm sections and stained with appropriate antibodies and controls.

### **Antibodies**

For immunohistochemistry analysis, the following antibodies were used: anti-Ahr rabbit polyclonal antibody (sc-5579), anti-Cas goat polyclonal antibody (sc-1709), anti-Ccne1 rabbit polyclonal antibody (sc-198), anti-Cdc20 mouse monoclonal (sc-5296), anti-Cks1 goat polyclonal antibody (sc-12986), anti-Glycodelin goat

polyclonal (sc-12290), anti-Mek1 mouse monoclonal (sc-6250), anti-Met rabbit polyclonal (sc-161), and anti-Ran goat polyclonal (sc-1156). All antibodies were purchased from a single manufacturer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

### **Immunohistochemistry**

Tissue arrays were sectioned and stained by an immunoperoxidase method. Briefly, tissue sections were heated at 60°C for 30 min., deparaffinized in toluene and rehydrated in an ethanol gradient. Following a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment to eliminate endogenous peroxidase activity, slides were submerged in boiling citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0) (J.T. Baker Philipsburg, NJ) for 15 min to unmask antigens. The sections were blocked with a protein blocking serum-free reagent (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) and incubated with the different antibodies for 60 min. at room temperature. The optimal concentration for each primary antibody was determined by serial dilutions. Tissues were incubated with either the secondary biotinylated antibody (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) or with the rabbit anti-goat biotin-conjugated antibody (1:300) (sc-2774, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 20 min. followed by incubation with a streptavidin-peroxidase complex (DakoCytomation Inc., Mississauga, Ontario, Canada) for 20. min at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a peroxidase substrate. Nuclei were counterstained with hematoxylin and all sections were observed by light microscopy at 20X magnification. Substitution of the primary antibody with phosphate buffered saline served as a negative control. Protein expression was scored according to the extent (as a percentage of total malignant cells) and intensity (value of 0 for absence, 1 for low, 2 for moderate and 3 for high intensity) of staining based on manual visualization<sup>25</sup>. All slides were independently analyzed in a blind study by two independent observers and inter-rating was >90%. When strong differences in scoring between the two observers occurred the core was re-evaluated to reach a consensus between the two observers. No decrease in staining intensity on older paraffin blocks has been observed.

### **Statistical analysis**

Association between immunohistochemistry staining intensity and clinical variables (grades, stages, status of LMP tumors) was analyzed by logistic regression. Statistical significance of regression coefficients was monitored using Student T test. The grades compared were 0, 1, 2, 3. The LMP tumors were subdivided in two subgroups representing LMPs of low and high risk of recurrence according to the status of micropapillary structure, presence of invasive implants or stromal microinvasion. The stages were separated into two groups: early stage for stage I-II and advanced stage for III-IV. Significance of markers to predict survival of EOC patients was performed using Kaplan-Meier survival curve coupled to log rank test. The threshold of the intensity used in the log rank test was fixed based on the receiver operating characteristics (ROC) curves and according to this value two groups were assigned. ROC curves were developed for determining the optimal threshold of staining intensity that yielded the best possible sensitivity and specificity values of each marker to predict the invasive potential (G0 compared to G1, G2 and G3). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using the STATS (logistic regression), ROC and SURVIVAL (Kaplan-Meier survival analysis, log-rank test, Cox analysis) packages from R version 2.01<sup>27</sup>.



## RESULTS

### Staining of candidate markers protein in tumor tissue

Oligonucleotides microarray analysis were used to select a subset of candidate genes based on their ability to distinguish low grade from high grade EOC tumors and for which commercial antibodies were available (Supplementary Figure 1, available at [www.mrw.interscience.wiley.com/suppmat/0020-7136/suppmat/2007/jws-ijc.21902.tif](http://www.mrw.interscience.wiley.com/suppmat/0020-7136/suppmat/2007/jws-ijc.21902.tif))<sup>25</sup>. In order to study the implication of these candidates in the biology of ovarian cancer and their potential role as diagnostic and prognostic makers, we performed immunohistochemistry using a tissue microarray composed of 235 tumors of serous histopathology. This tissue array was stained using different antibodies representing ten candidates, and the intensity of the staining was monitored. An image of a representative core of each grade of tumors (0 to 3) is presented in Figure 1. Nuclear and cytoplasmic staining was observed using antibodies against Ccne1, Cdc20, Cks1, Cas, Ahr, Paep or Ran proteins (Figure 1). The staining seen for Met protein always involved the cytoplasm, but depending on the sample, could also include either cytoplasmic membrane or nuclear staining (Figure 1), although alterations in the localization of staining did not correlate with any obvious clinical parameter (data not shown). Finally, an exclusive cytoplasmic staining of the Mek1 protein was observed (Figure 1).

### Statistical analyses of the correlation of staining intensity with histological grade

Expression of the different candidate proteins monitored by the frequency and the intensity of the staining was correlated with tumor grade (Table 1). Ccne1 ( $p < 0.001$ ) and Ran ( $p = 0.003$ ) showed statistically differences in staining when tumors of G0 (LMP) were compared to G1. Differential expression of all candidates (except Cas) allowed the discrimination of G0 from G2 and G3. Statistically significant differences in staining were observed when the TOVs of G1 were compared to those of G2 and/or G3 respectively for Ahr ( $p = 0.040, 0.056$ ), Paep ( $p = 0.003, 0.019$ ), Mek1 ( $p = 0.003, 0.016$ ), Cdc20 ( $p = 0.010, 0.008$ ), Cks1 ( $p = 0.023$ , both) and Cas ( $p = 0.033$  for G3). Finally, the TOVs of G2 showed an increase expression of Paep ( $p = 0.030$ )

compared to G3. In this study, 23 samples came from high risk LMP patients and 35 samples came from patients of low risk LMPs. No marker tested in this study allowed the distinction of these two LMP sub-groups (data not shown).

### **Statistical analyses of the correlation of staining intensity and clinical stage**

As the clinical staging reflects tumor spread, we were interested in determining if the staining intensity of the different markers correlated with the stage. We grouped the clinical stages I-II in low stage tumors (23 in LMPs, 17 in TOVs) and clinical stages III-IV as a high stage tumor group (36 in LMPs, and 162 in TOVs). The expression of Ccne1 ( $p < 0.001$ ), Ran ( $p = 0.001$ ), Cdc20 ( $p = 0.016$ ) and Cks1 ( $p = 0.007$ ) showed a statistically significant difference (logistic regression, T test) between early and advanced stage tumors.

### **Ran and Ccne1 are the most specific markers to define the invasiveness of the tumor**

In order to evaluate the prognosis potential of the markers, we determined the threshold of staining intensity by a ROC analysis using the non-invasive tumors (LMPs) as one group and the invasive tumors (TOVs) as the other one. The threshold was fixed in order to give the best trade-off in term of specificity and sensitivity of the marker (Table 2). The specificity represents the fraction of LMPs correctly classified as non-invasive tumors and the sensitivity defined the portion of invasive tumors correctly assigned as TOVs according to the staining intensity. Among the markers, Ccne1 and Ran are the ones that showed the best specificity, while Cks1 and Mek1 showed the best sensitivity (Table 2).

### **Ran and Cdc20 staining correlates with patient outcome**

Using the threshold of intensity determined by ROC analysis, we performed survival analyses based on Kaplan-Meier curve coupled to a log rank test. Using tumors of all grades, the staining of all candidate proteins, except Cas and Ahr, correlated significantly with patient survival ( $p \leq 0.01$  except for Mek where  $p = 0.05$ ). As grade and survival are related, we decided to determine the capacity of the markers to

predict the survival of invasive tumors first in combining G1, G2 and G3 and second considering separately G2 and G3 (G1 tumors were excluded due to the small number of patients). Combining G1, G2 and G3, we were able to demonstrate that high expression of either Ran ( $p < 0.001$ ) or Cdc20 ( $p = 0.03$ ) were significantly correlated with a shorter survival in patients with invasive EOCs (Figure 2 and 3). For the intra-grade analysis in G2 tumors and Cks1 ( $p = 0.009$ ) showed a correlation with the survival while Ran showed a tendency ( $p = 0.06$ ) (Figure 2 and 3). Finally, the prognostic of G3 tumors correlated with the staining of Ran ( $p < 0.001$ ) and Cdc20 ( $p = 0.04$ ) (Figure 2 and 3). We also performed a Cox analysis to determine if the relation between intensity and survival depended of the ROC analysis threshold. Combining G1-G3, Cox analysis showed that high expression of Ran ( $p = 0.009$ ) and Cdc20 ( $p = 0.003$ ) were significantly correlated with poor patient survival.

#### **Ran is a specific and sensitive marker to define the patient outcome**

Based on the threshold of intensity previously set using ROC, we evaluated the specificity and sensitivity of each marker to predict those patients able to survive more than 18 months. When all TOVs were compared, Ccne1 and Ran (0.67 and 0.68 respectively) were the most specific markers to identify patients with a >18 months survival while high Mek1, Paep and Ran provided the highest sensitivity (0.72, 0.76, 0.72 and 0.72 respectively) and correlated with patients with a <18 month survival (Table 2). Within the G0 group of tumors, Ccne1 and Ran were the most specific markers for prognosis (Table 2). We were unable to evaluate the sensitivity of the markers as all patients with G0 tumors have survived to date. Within the G2 tumors, Cas, Ran and Cdc20 were still the most specific markers and Met and Cks1 were the most sensitive (Table 2). Finally, within the G3 tumors, Ahr and Ran were the most specific and Ran, Paep and Mek1 were the most sensitive (Table 2).

## DISCUSSION

Based on our previous molecular profiling study<sup>25</sup>, the purpose of this paper was to identify protein markers whose expression varies with the malignancy potential of ovarian tumors and to correlate these differences in expression to relevant clinical parameters such as tumor grade, stage and patient outcomes.

Since the difference between LMPs (G0) and G1 TOVs is primarily the presence of invasion, the finding of a molecular marker that distinguishes between these two groups of tumors is promising for its potential impact on clinical applications. We found that *Ccne1* and *Ran* expression could be used to stratify G0 and G1 tumors while no markers to date were reported to allow this distinction. However, a study on a larger number of G1 tumors would be necessary to extend and confirm this finding. While all but one candidate (*Cas*) allowed the distinction between G0 and high grade (G2, G3) TOVs, overall most candidates showed little differences in marker expression between G0 and G1 or between G2 and G3 tumors. This may in part be due to the fact that in our microarray analysis we compared LMP tumors to the G3 tumors only, for distinction of aggressiveness<sup>25</sup>. Subtle differences between G0 and G1 or G2 and G3 were not addressed in our previous analysis and may be difficult to identify based on immunohistochemistry that depends on strong differences in order to be significant. Furthermore, it has already been reported that closely related grades are difficult to separate based on their expression profile<sup>15</sup>.

In this study we show that the expression of all ten tested markers, except *Cas* and *Ahr*, correlated with patient survival when all tumors (G0 to G3) were analyzed. This is perhaps not surprising since the outcome of LMP disease is clearly superior. Among invasive tumors (G1 to G3), we demonstrated that only high expression of *Ran* and *Cdc20* were correlated with survival. Additionally, the expression of *Ran*, *Cdc20* and *Cks1* were correlated with patient survival when tumors of the same grade were compared. Importantly, *Ran* was the only marker that correlated with the prognosis of the patient in each comparison. Together, these results are especially

significant as there is a pressing need to define good molecular markers that predict patient outcomes in ovarian cancer, especially as clinical presentation is insufficient for proper stratification.

The differential expression of some proteins may also point to critical underlying alterations that contribute to EOC. For example, Ahr is a transcription factor that contributes to carcinogenesis associated with dioxin and aromatic hydrocarbons<sup>28</sup>. Ahr is implicated in proliferation and cellular differentiation and can be associated with the estrogen receptors ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  leading to estrogenic effects on sensitive cells<sup>29,30</sup>. The only previous study on *AHR* RNA expression in ovarian tumors reports no differences in Ahr when normal ovarian surface epithelia were compared to TOVs<sup>31</sup>. However, the fact that we see variable expression at the protein level appears to correlate with our previous observations of differential expression at the RNA level<sup>25</sup>. The over-expression of Ahr in poorly differentiated tumors is consistent with its known activities which include promoting proliferation as well as activating genes implicated in tumor progression such as *c-FOS* and *VEGF*<sup>29,32</sup>.

Paep, also known as Pp14 or glycodelin, is the major progesterone regulated lipocalin protein found at high levels in the plasma of patient with gynecologic malignancies and expressed by the tumors of reproductive organs<sup>33,34</sup>. In our study, we showed that Paep expression levels distinguished between low and high grades tumors. This result is consistent with the fact that this protein has immunosuppressive and angiogenic properties favoring the growth of the tumors expressing it<sup>35</sup>. However, our results contradict a study showing that G1 serous ovarian tumors express higher levels of glycodelin protein than G2 and G3 tumors<sup>36</sup>, although the source of antibody in that latter study was different from the one used here. While our study involved few G1 tumors, the lower grades LMPs are well represented and generally express less glycodelin.

During malignant transformation, the cell cycle progression is affected at different points and several of the candidates investigated in this report are implicated in this

process (Ccne1, Cks1, Cdc20, Cas). Cyclin E (Ccne1) is required for the G1 – S phase and has been reported to be over-expressed in many types of cancer. Ccne1 was shown to be over-expressed both at the mRNA and protein level in ovarian tumors compared to normal ovaries<sup>37</sup> and was also associated with a poor prognosis<sup>19-22</sup>. These results are consistent with those seen in our analysis where Ccne1 represents the most specific marker for distinguishing non-invasive from invasive tumors and it also correlates with the stage of the disease. However, even though Ccne1 is one of the most specific markers for survival, its sensitivity remains very low (42%) in invasive tumors. In comparison, Ran had a similar specificity but was 30% more sensitive than Ccne1 to predict the survival of the patients. This further reinforces the potency of Ran as a prognosis marker in ovarian cancer.

Cks1 promotes the transition to anaphase through modulation of *CDC20* transcription and favors cell cycle progression<sup>8, 38</sup>. These two proteins have previously been implicated in different types of cancers<sup>15, 39-43</sup>. We observed increased expression of these two proteins in the higher-grade tumors. Cks1 is a sensitive marker for diagnosis and prognosis although its specificity remains low. However, it showed a high significance in the survival of patients with G2 tumors as all patients with low expression of Cks1 are still alive presently. We also demonstrated that expression of Cdc20 correlates with the survival of patients with TOVs. However, its sensitivity and specificity for prognosis is lower than Ran. Cas (for Cellular Apoptosis Susceptibility) is also involved in the cell cycle through the recycling of the transporter importin- $\alpha$ <sup>44</sup> thus affecting the nuclear localization of cell cycle and apoptosis proteins such as Cdk, Cyclin/Cdk complexes, as well as p53, Rb and NF- $\kappa$ B<sup>45</sup>. Here we report a higher expression of Cas in TOVs poorly differentiated compared to highly one. This is in line with previous reports showing that over-expression of Cas is associated with high stage and grade EOC tumors as well as with residual disease<sup>45-47</sup>. Taken together, these results confirm the importance of cell cycle regulation in cancer and point to key regulators for EOC.

Growth factors and hormones lead to proliferation and migration of cells by activating, among other pathways, the MAPK cascade. Mek1 is one of the components involved in this cascade and is known to be activated by Hgf signaling in ovarian cancer<sup>48</sup>. Furthermore, over-expression of Mek1 has been demonstrated to be sufficient to promote proliferation<sup>49</sup>. In our study, we showed that Mek1 was highly expressed in high compared with low grades tumors and that this protein is a sensitive marker for prognosis.

Unexpected nuclear localization in cancer tissue has also been reported for growth factor receptors such as those of the ErbB family and was associated with the proliferative status of the cells<sup>50-56</sup>. Aberrant nuclear localization of membrane receptors in cancer cells may be due to an increase in nuclear core complex activity since nuclear core complex proteins such as Ran are often over-expressed in several types of cancer<sup>57, 58</sup>. Consistent with this hypothesis, we noticed an over-expression of Ran protein in TOVs of all grades compared to LMPs. Ran is a small GTP-binding protein essential for the nucleocytoplasmic transport through the nuclear pore complex and is also involved in nuclear organization and cell cycle progression<sup>58</sup>. Its high expression in ovarian cancer cells also correlates with high stage disease. In addition to its capacity to distinguish between tumors of G0 and G1, Ran presented the highest combination of sensitivity and specificity for diagnosis (LMP or TOV) as well as prognosis.

In conclusion, this study provides another example of the usefulness of DNA microarrays to identify potential tumor markers able to stratify EOC tumors. The use of a serous tissue array composed of different grade tumors allowed the rapid study of different candidate proteins on a large number of samples. Here we show the usefulness of Ahr, Paep, Ran, Met, Mek1, Ccne1, Cdc20, Cks1, and Cas to stratify EOCs based on grade. Moreover, this study is the first to report that Ccne1 and Ran levels can distinguish between two groups of well differentiated tumors (G0 LMPs and G1 TOVs). We also report on the potential use of Cdc20, Cks1, and especially Ran, as prognostic markers in patient with invasive EOC. Our findings suggest that

one or more of these candidate markers may eventually be useful clinically, and may point to important pathways that are de-regulated in EOCs.



## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Louise Champoux, Lise Portelance, Manon de Ladurantaye, Jason Madore, Stéphanie Girard, and Marise Roy for technical assistance. We are grateful to Dr. Christine Maugard for her help in statistical analysis and Dr. Lilia Sanchez for pathology review. We thank Dr. L. Masson for thoughtful comments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (*CIHR*) to Drs A.-M.M.-M., P.N.T. and D.M.P. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (*FRSQ*). V.O. was supported by studentships from the *CIHR* and Canderel fund of the Institut du Cancer de Montréal. Dr D.M.P. is a recipient of a Chercheur-Clinicien Senior and Dr A.-M.M.-M. is a recipient of a Chercheur National, both fellowships provided by the *FRSQ*.

**REFERENCES**

1. de Souza PL, Friedlander ML. Prognostic factors in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6(4):761-82.
2. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003;97(10 Suppl):2631-42.
3. Tavassoli. Serous tumor of low malignant potential with early stromal invasion (serous LMP with microinvasion). *Mod. Pathology* 1988;1(6):407-14.
4. Burger CW, Prinszen HM, Baak JP, Wagenaar N, Kenemans P. The management of borderline epithelial tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10(3):181-97.
5. Dietel M, Hauptmann S. Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Arch* 2000;436(5):403-12.
6. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83 Suppl 1:135-66.
7. Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum Pathol* 2000;31(5):539-57.
8. Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH, Reed SI. Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* 2003;423(6943):1009-13.
9. Longacre TA, McKenney JK, Tazelaar HD, Kempson RL, Hendrickson MR. Ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): outcome-based study of 276 patients with long-term (> or =5-year) follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;29(6):707-23.
10. Seidman JD, Kurman RJ. Treatment of micropapillary serous ovarian carcinoma (the aggressive variant of serous borderline tumors). *Cancer* 2002;95(4):675-6.
11. O'Neill CJ, Deavers MT, Malpica A, Foster H, McCluggage WG. 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):1034-41.

12. Kildal W, Risberg B, Abeler VM, Kristensen GB, Sudbo J, Nesland JM, Danielsen HE. beta-catenin expression, DNA ploidy and clinicopathological features in ovarian cancer: a study in 253 patients. *Eur J Cancer* 2005;41(8):1127-34.

13. Hylander B, Repasky E, Shrikant P, Intengan M, Beck A, Driscoll D, Singhal P, Lele S, Odunsi K. Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005.

14. Gilks CB, Vanderhyden BC, Zhu S, van de Rijn M, Longacre TA. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96(3):684-94.

15. Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag D, Hilpert F, Dimitrov P, Sapinoso LM, Orłowska-Volk M, Bauknecht T, Park TW, Jonat W, Jacobsen A, Sehouli J, Luttes J, et al. Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential. *Oncogene* 2005;24(6):1053-65.

16. Matsuzaki H, Kobayashi H, Yagyu T, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Plasma bikunin as a favorable prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(7):1463-72.

17. Lee P, Rosen DG, Zhu C, Silva EG, Liu J. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96(3):671-7.

18. Sayer RA, Lancaster JM, Pittman J, Gray J, Whitaker R, Marks JR, Berchuck A. High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96(2):355-61.

19. Farley J, Smith LM, Darcy KM, Sobel E, O'Connor D, Henderson B, Morrison LE, Birrer MJ. Cyclin E expression is a significant predictor of survival in advanced, suboptimally debulked ovarian epithelial cancers: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer Res* 2003;63(6):1235-41.

20. Milde-Langosch K, Hagen M, Bamberger AM, Loning T. Expression and prognostic value of the cell-cycle regulatory proteins, Rb, p16MTS1, p21WAF1,

p27KIP1, cyclin E, and cyclin D2, in ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22(2):168-74.

21. Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Yee H, Sorich J, Speyer JL, Newcomb EW. Expression of cell cycle regulators p57(KIP2), cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival. *Hum Pathol* 2001;32(8):808-13.

22. Sui L, Dong Y, Ohno M, Sugimoto K, Tai Y, Hando T, Tokuda M. Implication of malignancy and prognosis of p27(kip1), Cyclin E, and Cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2001;83(1):56-63.

23. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5168-77.

24. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;19(1):3-10.

25. Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM, Le Page C, Ren F, Lussier C, Novak J, Ge B, Hudson TJ, Tonin PN, Mes-Masson AM. Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 2005;24(29):4672-87.

26. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80(12):1943-9.

27. computing Rpfs.

28. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(2):779-82.

29. Pliskova M, Vondracek J, Vojtesek B, Kozubik A, Machala M. Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. *Toxicol Sci* 2005;83(2):246-56.

30. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, et

al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 2003;423(6939):545-50.

31. Khorram O, Garthwaite M, Golos T. Uterine and ovarian aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) mRNA expression in benign and malignant gynaecological conditions. *Mol Hum Reprod* 2002;8(1):75-80.

32. Safe S, Wormke M, Samudio I. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5(3):295-306.

33. Horowitz IR, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S, Ramachandran S. Increased glycodelin levels in gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11(3):173-9.

34. Kamarainen M, Leivo I, Koistinen R, Julkunen M, Karvonen U, Rutanen EM, Seppala M. Normal human ovary and ovarian tumors express glycodelin, a glycoprotein with immunosuppressive and contraceptive properties. *Am J Pathol* 1996;148(5):1435-43.

35. Song M, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA, Parthasarathy S. Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(16):9265-70.

36. Mandelin E, Lassus H, Seppala M, Leminen A, Gustafsson JA, Cheng G, Butzow R, Koistinen R. Glycodelin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival. *Cancer Res* 2003;63(19):6258-64.

37. Sawasaki T, Shigemasa K, Shiroyama Y, Kusuda T, Fujii T, Parmley TH, O'Brien TJ, Ohama K. Cyclin E mRNA overexpression in epithelial ovarian cancers: inverse correlation with p53 protein accumulation. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8(3):179-85.

38. Patra D, Wang SX, Kumagai A, Dunphy WG. The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem* 1999;274(52):36839-42.

39. Shapira M, Ben-Izhak O, Bishara B, Futerman B, Minkov I, Krausz MM, Pagano M, Hershko DD. Alterations in the expression of the cell cycle regulatory protein cyclin kinase subunit 1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 2004;100(8):1615-21.
40. Masuda TA, Inoue H, Nishida K, Sonoda H, Yoshikawa Y, Kakeji Y, Utsunomiya T, Mori M. Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5693-8.
41. Inui N, Kitagawa K, Miwa S, Hattori T, Chida K, Nakamura H, Kitagawa M. High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303(3):978-84.
42. Gascoyne DM, Hixon ML, Gualberto A, Vivanco MD. Loss of mitotic spindle checkpoint activity predisposes to chromosomal instability at early stages of fibrosarcoma development. *Cell Cycle* 2003;2(3):238-45.
43. Kim JM, Sohn HY, Yoon SY, Oh JH, Yang JO, Kim JH, Song KS, Rho SM, Yoo HS, Kim YS, Kim JG, Kim NS. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(2 Pt 1):473-82.
44. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Gorlich D. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 1997;90(6):1061-71.
45. Brinkmann U. CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62(3):509-13.
46. Brustmann H. Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):268-76.
47. Peiro G, Diebold J, Lohrs U. CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene expression in ovarian carcinoma: Correlation with 20q13.2 copy number and cyclin D1, p53, and Rb protein expression. *Am J Clin Pathol* 2002;118(6):922-9.
48. Wong AS, Roskelley CD, Pelech S, Miller D, Leung PC, Auersperg N. Progressive changes in Met-dependent signaling in a human ovarian surface epithelial model of malignant transformation. *Exp Cell Res* 2004;299(1):248-56.

49. Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA. Mek1 alters epidermal growth and differentiation. *Cancer Res* 2004;64(17):6035-40.

50. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3(9):802-8.

51. Wang SC, Lien HC, Xia W, Chen IF, Lo HW, Wang Z, Ali-Seyed M, Lee DF, Bartholomeusz G, Ou-Yang F, Giri DK, Hung MC. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 2004;6(3):251-61.

52. Waugh MG, Hsuan JJ. EGF receptors as transcription factors: ridiculous or sublime? *Nat Cell Biol* 2001;3(9):E209-11.

53. Oksvold M, Huitfeldt H, Stang E, Madhus I. Localizing the EGF receptor. *Nat Cell Biol* 2002;4(2):E22; author reply E22-3.

54. Offterdinger M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 2002;157(6):929-39.

55. Raabe TD, Deadwyler G, Varga JW, Devries GH. Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia* 2004;45(2):197-207.

56. Hughes DP, Thomas DG, Giordano TJ, Baker LH, McDonagh KT. Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and Her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma. *Cancer Res* 2004;64(6):2047-53.

57. Azuma K, Sasada T, Takedatsu H, Shomura H, Koga M, Maeda Y, Yao A, Hirai T, Takabayashi A, Shichijo S, Itoh K. Ran, a small GTPase gene, encodes cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes capable of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(19):6695-702.

58. Di Fiore B, Ciciarello M, Lavia P. Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* 2004;3(3):305-13.

**Table 1: Statistical analyses of candidate expression determined by IHC and association to tumor grade**

Protein	Tumor grade	Mean intensity ±S.D.	Significance, logistic regression					
			0-1	0-2	0-3	1-2	1-3	2-3
Ahr	0	59 ± 16						
	1	54 ± 13	0.396	<b>0.004</b>	<b>0.014</b>	<b>0.040</b>	0.056	0.256
	2	69 ± 20						
	3	66 ± 17						
Paep	0	51 ± 13						
	1	48 ± 17	0.469	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.019</b>	<b>0.030</b>
	2	67 ± 17						
	3	61 ± 16						
Ran	0	65 ± 16						
	1	82 ± 15	<b>0.003</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.621	0.986	0.249
	2	85 ± 16						
	3	82 ± 16						
Met	0	54 ± 12						
	1	60 ± 15	0.224	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.088	0.285	0.068
	2	71 ± 18						
	3	66 ± 17						
Mek1	0	43 ± 11						
	1	44 ± 14	0.807	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.016</b>	0.440
	2	60 ± 16						
	3	58 ± 18						
Ccne1	0	44 ± 12						
	1	70 ± 14	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.231	0.650	0.081
	2	77 ± 16						
	3	72 ± 15						
Cdc20	0	48 ± 11						
	1	42 ± 11	0.110	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.010</b>	<b>0.008</b>	0.680
	2	57 ± 18						
	3	56 ± 17						
Cks1	0	51 ± 13						
	1	52 ± 11	0.940	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.023</b>	<b>0.023</b>	0.443
	2	65 ± 16						
	3	63 ± 14						
Cas	0	65 ± 20						
	1	56 ± 17	0.201	0.936	0.058	0.209	<b>0.033</b>	0.081
	2	65 ± 21						
	3	71 ± 19						

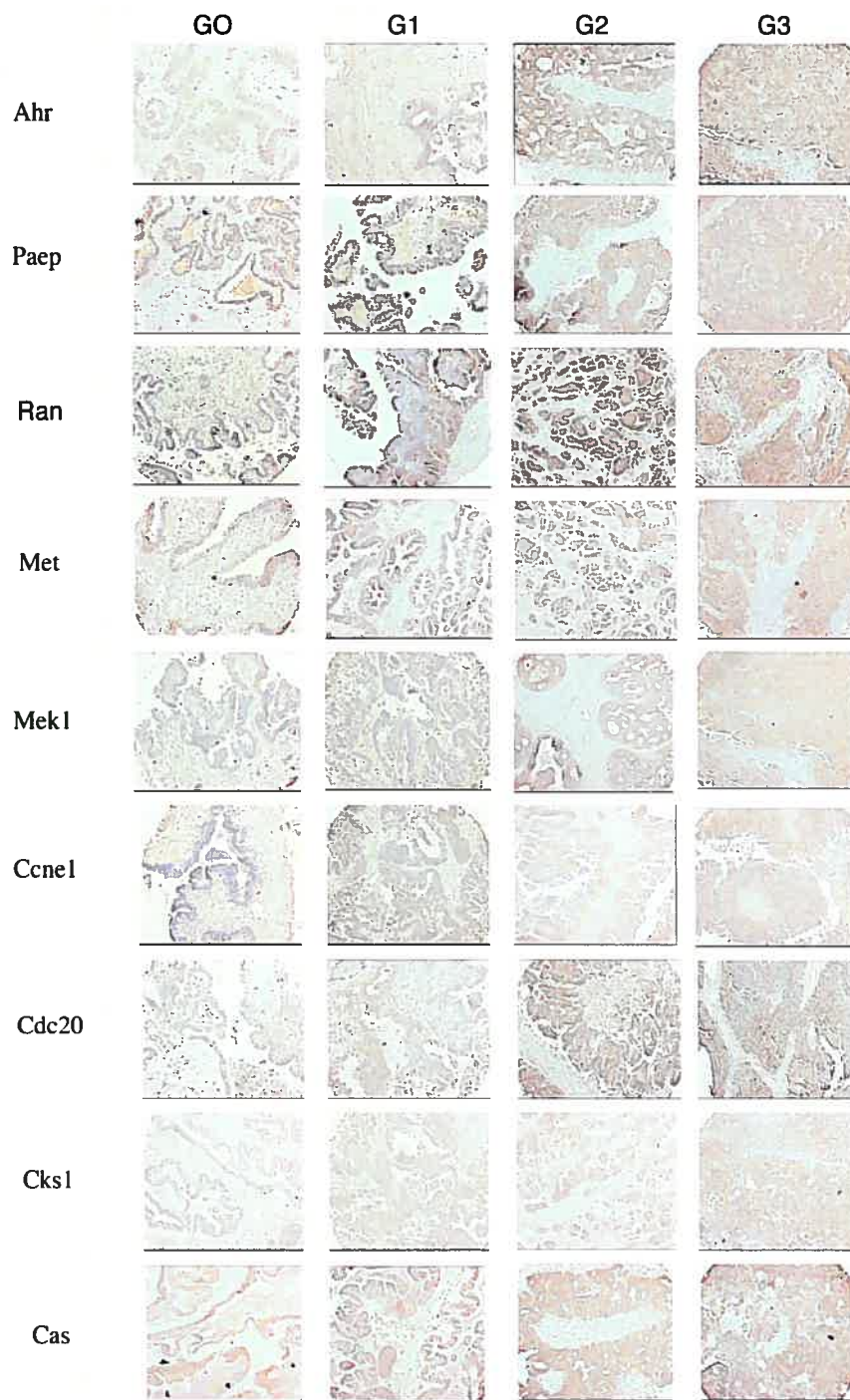
Bold mean that significance is reached



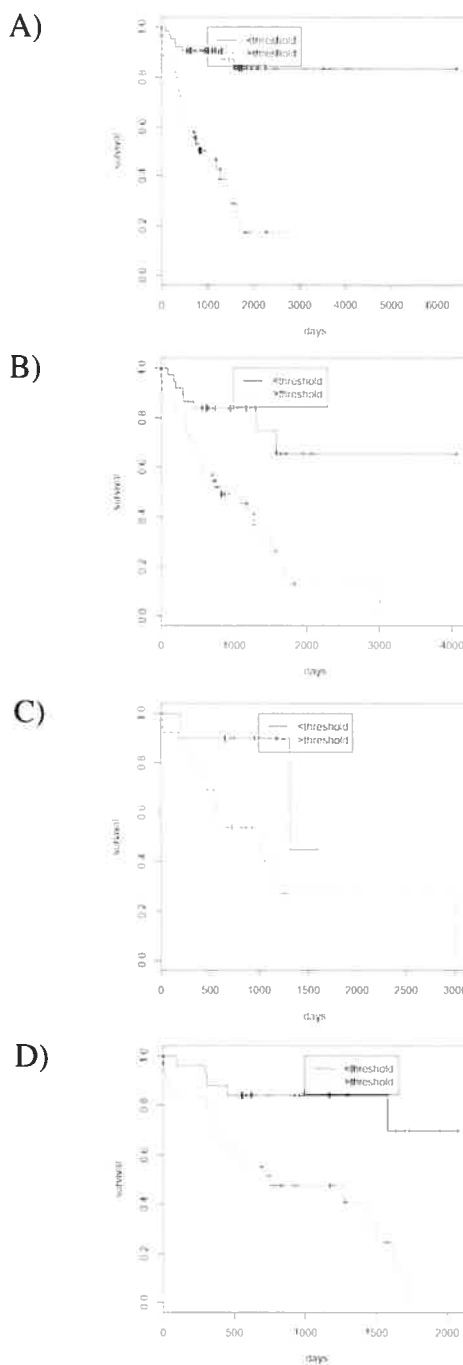
**Table 2 Specificity and sensitivity of the markers for diagnosis and prognosis**

Marker	ROC threshold	Diagnosis				Survival >18 months															
		All tumors (G0, G1, G2, G3)				All invasive tumors (G1, G2, G3)				G0			G2			G3					
		Specificity %	n	Sensitivity %	n	Specificity %	n	Sensitivity %	n	Specificity %	n	Sensitivity %	n	Specificity %	n	Sensitivity %	n				
Mek1	44	67	38/57	74	127/171	38	32/84	76	19/25	69	20/29	NI	NI	0	0/18	83	5/6	32	11/34	78	14/18
Ccne1	72	96	54/56	51	86/172	67	59/86	42	10/24	100	29/29	NI	NI	42	8/19	50	3/6	60	21/35	41	7/17
Met	61	70	37/53	65	111/171	52	44/84	58	14/24	79	22/28	NI	NI	39	7/18	100	5/5	40	14/35	56	10/18
Paep	55	69	37/54	63	110/175	51	44/86	72	18/25	79	23/29	NI	NI	17	3/18	83	5/6	44	16/36	72	13/18
Ran	81	88	49/56	57	100/176	68	57/84	72	18/27	96	27/28	NI	NI	53	9/17	83	5/6	56	20/36	72	13/18
Ahr	65	62	35/56	57	96/171	60	50/84	50	12/24	72	21/29	NI	NI	39	7/18	60	3/5	59	20/34	50	9/18
Cdc20	53	73	40/55	52	91/174	60	52/86	60	15/25	79	23/29	NI	NI	50	9/18	50	3/6	47	17/36	67	12/18
Cas	63	46	26/57	61	106/173	47	40/85	68	17/25	52	15/29	NI	NI	61	11/18	67	4/6	34	12/35	67	12/18
Cks1	54	63	30/48	73	125/172	40	31/78	68	17/25	74	17/23	NI	NI	33	6/18	100	6/6	21	7/34	61	11/18

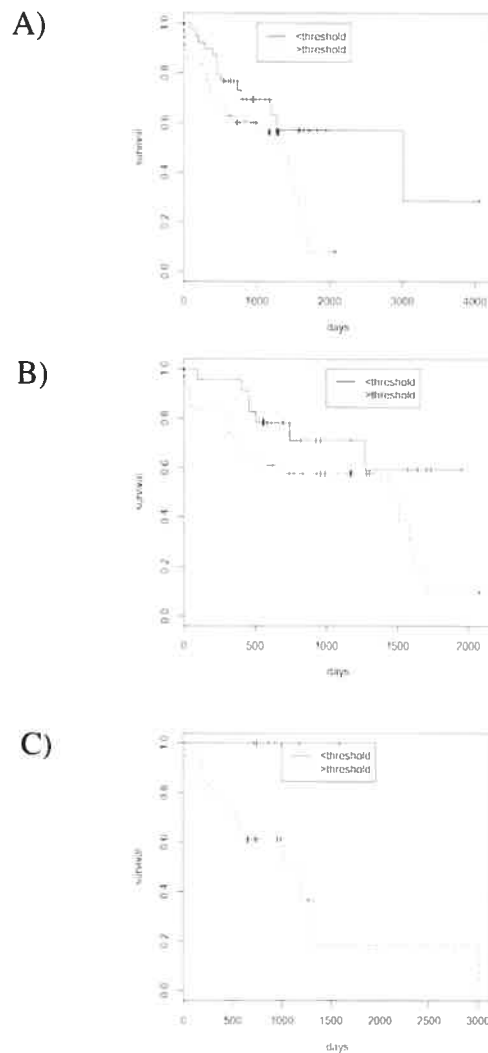
n= number of patient  
 NI= non-informative, all patient survive



**Figure 1** Expression of markers on epithelial ovarian tumors tissues of different grades varying from G0 to G3. Representative images of the immunoperoxidase-stained slides are represented (20X magnification). Staining was quantified based on both relative intensity and extent of staining. The markers Ahr, Paep, Ran, Ccne1, Cdc20, Cks1 and Cas showed a nuclear and cytoplasmic staining; Met displayed a cytoplasmic membrane/cytoplasm or cytoplasm/nucleus staining; Mek1 presented cytoplasmic staining.



**Figure 2 Relation between Ran expression and cumulative survival of patients with EOC.** Kaplan-Meier graphical representation of survival curves demonstrated a poorer survival associated with high expression of Ran either when A) all tumors (G0 to G3) were analyzed ( $p < 0.001$ ), B) invasive (G1 to G3) tumors only ( $p < 0.001$ ) C) G2 tumors only ( $p = 0.06$ ) and D) G3 tumors only ( $p < 0.001$ ). Results are graphically represented as Kaplan-Meier curves. Patients with a follow up of less than 18 months were not used for this analysis. Log rank test was used to verify the significance of the difference in survival.



**Figure 3 Relation between Cdc20 and Cks1 expression and cumulative survival of patients with EOC.** Kaplan-Meier graphical representation of survival curves demonstrated a poorer survival associated with high expression of Cdc20 in A) invasive (G1 to G3) tumors ( $p=0.03$ ) or in B) G3 tumors only ( $p=0.04$ ) and with high expression of C) Cks1 ( $p=0.01$ ) in the G2 tumors only. Results are graphically represented as Kaplan-Meier curves. Patients with a follow up of less than 18 months were not used for this analysis. Log rank test was used to verify the significance of the difference in survival.

## CHAPITRE IV

### The SET complex in serous epithelial ovarian cancer

Véronique Ouellet<sup>1</sup>, Cécile Le Page<sup>1</sup>, Marie-Claude Guyot<sup>1</sup>, Christian Lussier<sup>2</sup>,  
Patricia N. Tonin<sup>3,4,5</sup>, Diane M. Provencher<sup>1,6,7</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,7</sup>.

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)/  
Institut du cancer de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM),  
Montreal, Canada;

<sup>3</sup>Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada;

<sup>4</sup>The Research Institute of McGill University Health Centre, Montreal, Canada;

<sup>5</sup>Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada.

<sup>6</sup>Division of Gynecologic Oncology, Université de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>7</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada;

Article publié dans :

*Int. J. Cancer*, Nov 1;119(9):2119-26, 2006

**Keywords :** serous epithelial ovarian cancer, low malignant potential/borderline tumors, diagnostic and prognostic markers, SET complex, immunohistochemistry

*\* V. Ouellet est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. C. Le Page et M-C Guyot ont participé à la relecture des lames d'immunohistochimie. C. Lussier a effectué à la révision de la pathologie des échantillons. Provencher, P.N. Tonin et A-M. Mes-Masson ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

---

Véronique Ouellet

---

Dr. Anne-Marie Mes-Masson

Directrice de recherche

## RÉSUMÉ

Le cancer épithélial de l'ovaire est de plus en plus considéré comme une maladie chronique puisque les patientes subissent plusieurs périodes de rémissions et de récurrences traitées selon les différentes alternatives thérapeutiques, sans toutefois en guérir totalement. Cette réalité indique le besoin d'une meilleure compréhension des facteurs qui influencent la progression de cette maladie. Dans une analyse antérieure d'expression génique, nous avons identifié des gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP) et les tumeurs invasives (TOV). Dans cette étude, quatre des cinq membres du complexe SET : *SET*, *APE1*, *NM23* and *HMGB2*, étaient fortement exprimés dans les TOV. Afin d'étudier de façon plus approfondie l'expression de ces gènes et du cinquième membre du complexe SET (Pp32), nous avons effectué de l'immunohistochimie sur un microétagage de tissus ovariens contenant 235 tumeurs de divers grades (0 à 3) et stades (I à IV). Une corrélation significative entre le degré de différenciation tumorale et l'expression de tous les membres du complexe SET a été observée ( $p < 0.05$ ). Lorsque toutes les tumeurs sont combinées, une forte expression de Nm23 ( $p = 0.04$ ), Set ( $p = 0.004$ ) et Ape1 ( $p = 0.004$ ) est associée avec le stade de la maladie. Aucun marqueur par lui-même n'a montré d'association avec la survie des patientes. Cependant, la combinaison d'une forte expression de Nm23 dans un contexte de faible expression de Set confère un pronostic supérieur aux patientes ( $p = 0.03$ ) en comparaison avec toutes autres combinaisons d'expression de ces marqueurs. Aussi, la forte expression de Hmgb2 combinée à la faible expression de Ape1 s'est également avérée associée à une survie allongée des patientes ( $p = 0.05$ ). Ces observations suggèrent que l'utilisation d'une stratégie qui tient compte de différents partenaires d'une même voie peut être plus approprié lors de l'élaboration d'un nomogramme permettant la stratification des patientes atteintes d'EOC.

## ABSTRACT

With low cure rates but increasing diverse treatment options that provide variable remission times, ovarian cancer is increasingly being recognized as a chronic disease. This reality indicates the need for a better understanding of factors influencing disease progression. In a previous global analysis of gene expression, we identified genes differentially expressed when comparing serous epithelial ovarian tumors of low and high malignant potential (grade 0 vs grade 3). In this analysis, four out of five members of the SET complex, *SET*, *APE1*, *NM23* and *HMGB2*, were highly expressed in invasive grade 3 tumors. To further investigate the expression of these genes and the fifth member of the SET complex (Pp32), we performed immunohistochemistry, on a tissue array composed of 235 serous tumors of different grades and disease stages. A significant correlation between expression of all Set complex proteins and the tumor differentiation was observed ( $p < 0.05$ ). When combining all tumors, overexpression of Nm23 ( $p = 0.04$ ), Set ( $p = 0.004$ ) and Ape1 ( $p = 0.004$ ) was associated with the clinical stage of the disease. No marker by itself was associated with prognosis. The combination of a high level of Nm23 in the context of a low level of Set compared to all other combinations of these markers did confer a better prognosis ( $p = 0.03$ ). When combined, high expression of Hmgb2 and low expression of Ape1 was also associated with patient prognosis ( $p = 0.05$ ). These findings suggest that a strategy which sums the activities of different partners within a pathway may be more appropriate in designing nomograms for patient stratification.

## INTRODUCTION

Among the gynecologic malignancies, epithelial ovarian cancer (EOC) is infrequent but it is the most lethal due mainly to the absence of symptoms at the earliest stages of the disease<sup>1</sup>. The survival at five years of patient with an advanced stage disease reaches only 30%. EOC is a complex disease and tumors can be subdivided as low malignant potential (LMP) or borderline and invasive (TOV) tumors. Both types of tumors present multilayer proliferation but TOVs show higher level of cellular atypia than LMP tumors. LMP tumors do not possess the capacity to invade the stroma although microinvasion can be observed<sup>2-4</sup>. In EOC, four main histopathology types can be observed (serous, endometrioid, mucinous and clear cell) and the most common type is serous. Malignant tumors of EOC can present different degrees of differentiation. LMPs are the most differentiated tumors and referred as either grade 0 (G0) or B, and TOVs can be well (G1), moderately (G2) or poorly (G3) differentiated. Clinical staging in EOC varies from stage I to IV where stage I represents disease limited to one or both ovaries, stage II is associated with pelvic extension, stage III correspond to spreading within the abdominal cavity and patients with stage IV tumors present liver or distant metastasis<sup>5,6</sup>.

We have previously defined, using Affymetrix gene expression microarray analysis, a molecular signature of serous LMPs and TOVs of G3 either in primary culture or in tumor tissue model system<sup>7</sup>. This signature was established using three different statistical methods (Signal-to-noise ratio, Mann-Whitney U test and Significance Analysis of Microarray) and a subset of genes were validated by quantitative-PCR<sup>7</sup>. Based on this analysis, we found four out of the five members of the SET complex, composed of *NM23* (also known as *NME1*, *NDPKA*, *GAAD*, *PP2A*), *Pp32* (*PHAP1*, *LANP*, *ANP32*, *I1PP2A*), *SET* (*I2PP2A*, *IGAAD*, *PHAP2*), *HMGB2* (*HMG2*) and *APE1* (*APEX*, *REF1*, *HAPI*). This complex is implicated in apoptosis induced by granzyme-A triggered by immune cells (cytotoxic T lymphocytes or NK cells) that recognize either viral infected or tumor cells<sup>8</sup>. Following lymphocyte attack, the tryptase granzyme-A enters cells using membrane holes created by the perforin and



cleaves specific substrates including three members of the SET complex, Set, Hmgb2 and Ape1. The cleavage of these proteins leads to release of the nuclease activity of Nm23 which in turn results in single-stranded cleavage of DNA and caspase-independent apoptosis<sup>9</sup>. The complex is also implicated in response to oxidative stress and DNA repair<sup>10-12</sup>.

In this report, we focused on protein expression of the SET complex proteins in EOC. For this purpose, we used a tissue array composed of 235 serous tumor samples of different grades to evaluate protein expression. The staining intensity was related to tumor grade, disease stage and patient prognosis in order to evaluate their usefulness in the stratification of EOC tumors.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and tissue specimens**

Following appropriate consent, tumor samples were collected through the Division of Gynecologic Oncology at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). An independent pathologist reviewed and scored tumor samples according to the Federation International of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria for histopathology, grade and stage of the disease <sup>6</sup>. Clinical data including diagnosis, treatment and clinical outcomes such as disease free interval and survival rate were extracted from the Système d'Archivage des Données en Oncologie (SARDO). For the study, we focused on samples of serous histopathology obtained from chemotherapy naïve patients.

### **Serous epithelial ovarian cancer tissue array**

Using a hematoxylin-eosin stained slide to guide appropriate sample selection, we arrayed two cores (0.6mm diameter) from each tissue sample. An experienced pathologist reviewed samples. The serous tissue array composed of 56 LMPs, and 179 invasive tumors of G1 (n=11), G2 (n=53) and G3 (n=115) was sectioned, stained with hematoxylin-eosin and received a final pathology review. For immunohistochemistry, the tissue array was cut in 5mm sections and stained with appropriate antibodies and controls.

### **Antibodies**

For immunohistochemistry analysis, the following antibodies were used: anti-I1PP2A goat polyclonal (sc-5652), anti-I2PP2A goat polyclonal (sc-5655) and anti-Ref-1 mouse monoclonal (sc-17774) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The antibody anti-nm23 rabbit polyclonal antibody (RB-116) was purchased from Medicorp (Montreal, Quebec, Canada). The anti-Hmgb2 rabbit polyclonal (556529) was purchased from BD PharMingen (San Diego, CA, USA).

### **Immunohistochemistry**

Tissue arrays were stained by an immunoperoxidase method as described previously<sup>13</sup>. Briefly, tissue sections were heated to 60°C for 30 min., deparaffinized in toluene and rehydrated in an ethanol gradient. Antigen retrieval was performed using a microwave by boiling in citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0). A protein blocking serum-free reagent (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON, Canada) was used followed by incubation with the primary antibody (60 min.) at room temperature. Tissues were incubated with either a secondary biotinylated antibody (DakoCytomation Inc) or with a rabbit anti-goat biotin-conjugated antibody (1:300) (sc-2774, Santa Cruz Biotechnology) for 20 min. followed by incubation with a streptavidin-peroxidase complex (DakoCytomation Inc) for 20 min. at room temperature. Liquid diaminobenzidine was used to visualize the reaction (DakoCytomation Inc) and nuclei were counterstained with hematoxylin. Negative controls were performed using phosphate buffered saline instead of the primary antibody. Protein expression was scored according to the extent (as a percentage of total malignant cells) and intensity (value of 0 for absence, 1 for low, 2 for moderate and 3 for high intensity) of staining based on visualization. All slides were visualized by light microscopy at 20X magnification and scored in a blind study by two independent observers with a correlation of >90%.

### **Statistical analysis**

A Mann-Whitney U test was performed to evaluate the association between immunohistochemistry staining intensity and clinical variables (grades and stages). The clinical stages were divided into two groups: early (stage I-II) and advanced (stage III-IV). Spearman test was performed to evaluate a correlation between protein expression and clinical parameters. Significance of markers to predict relapse and survival of EOC patients was performed using Kaplan-Meier survival curve coupled to a log rank test. The threshold of the intensity used in the log rank test to discriminate the two groups of low or high intensity were fixed based on the receiver operating characteristics (ROC) curves. ROC curves were used to establish the optimal threshold of staining intensity that yielded the best possible sensitivity and

specificity values of each marker to predict the invasive potential (G0 compared to G1, G2 and G3). Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using the SPSS software version 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTS

### Selection of SET complex members

In our previously reported gene expression microarray analyses we compared tumor tissues from six LMPs against 12 TOVs of G3, or primary cultures from six LMPs against eight G3 TOVs <sup>7</sup>. This study allowed us to observe the differential expression of four (*SET*, *APE1*, *NM23* and *HMGB2*) out of five genes included in the SET complex <sup>7</sup>. The fifth member of the complex (*PP32*) could not be assessed by this method since it fell below the sensitivity of the microarray. In tumor tissues, *HMGB2* and *APE1*, and to a lesser extent *NM23* and *SET*, were more highly expressed in TOVs than LMPs <sup>7</sup>.

### Staining of SET complex proteins in tumor tissues and association with histological grade

We evaluated protein expression of SET complex members to determine their usefulness as diagnostic and/or prognostic markers in EOC. To this end, we used a tissue array composed of 235 serous EOC tumors of different grades and stages (Table 1). In Figure 1, pictures of a core from different grades stained with different antibodies are shown. The staining of all proteins was observed in the nucleus and the cytoplasm. Protein expression of the SET complex members was assessed to evaluate their association with tumor differentiation. All markers, except Pp32 ( $p=0.09$ ), showed a significant differential expression between LMPs compared to all other TOVs ( $p<0.001$  for Hmgb2, Set and Ape1 and  $p=0.05$  for Nm23) (Table 2). Two markers, Set and Ape1, showed differential expression even within highly differentiated types of tumors (G0 vs G1) ( $p=0.004$  and  $p=0.02$ , respectively) (Table 2). All proteins presented differential expression between tumors of G0 and those of G3 representing the two extremes in tumor differentiation ( $p<0.001$  for Set, Hmgb2 and Ape1,  $p=0.02$  for Nm23 and  $p=0.04$  for Pp32) (Table 2). Differential expression of Set, Hmgb2 and Ape1 was also observed between tumors of G0 and those of G2 ( $p<0.001$ , all) (Table 2). Tumors of G1 and G2 differentially expressed Nm23 ( $p=0.04$ ), Pp32 ( $p=0.03$ ) and Ape1 ( $p=0.04$ ) (Table 2). In addition to these proteins,

expression of Hmgb2 ( $p=0.01$ ) was also differentially expressed between tumors of G1 and those of G3 ( $p=0.04$  for Nm23,  $p=0.02$  for Pp32 and  $p=0.02$  for Ape1) (Table 2).

### **Association of staining intensity and clinical stage**

The clinical stage is an important factor in EOC to evaluate patient prognosis. We therefore assessed the protein expression of the SET complex members to determine their association with clinical stage using a Mann-Whitney U test. High expression of Nm23 ( $p=0.04$ ), Set ( $p=0.004$ ) and Ape1 ( $p=0.004$ ) was associated with advanced stage when all tumors were included in the analysis (Table 3). However, when the two classes (LMPs and TOVs) were separated, this differential expression was not observed although a trend was noted for Nm23 ( $p=0.06$ ) in LMPs (Table 3).

### **Association of SET complex proteins and patient prognosis**

Finally, we evaluated whether the SET complex proteins were associated with patient outcome. We assessed the staining intensity to predict overall survival of the patients with a minimum of 18 months of follow up. Despite their association with the differentiation of the tumor, none of the SET complex proteins alone was associated with prognosis of patient with invasive EOC ( $p>0.05$ ) (Table 4). However, when we tried all possible two-way combination of SET complex proteins we were able to find combinations that were associated with prognosis. In particular, we noted that high expression of Nm23 with low expression of Set was associated with a better prognosis when compared to all other possible combinations of these two markers ( $p=0.03$ ) (Figure 2A). Furthermore, we observed that high expression of Hmgb2 and low expression of Ape1 was also associated with a better prognosis ( $p=0.05$ ) (Figure 2B). Of the 21 patients that had pair-wise combinations of markers and a better prognosis, only four had high Nm23, high Hmgb2, low Set and low Ape1. We also evaluated the association of staining intensity with disease-free interval representing the time between initial treatment and the first disease relapse defined by the RECIST criteria<sup>14</sup>. When the relapse cut off was set at 18 months, no significant association

was found although Nm23 ( $p=0.08$ ) tended to associate with the disease-free interval (Table 4).

## DISCUSSION

Gene expression microarray analysis based on the comparison of LMPs and G3 TOVs allowed us to identify candidates that are differentially expressed in EOC <sup>7</sup>. Identification of members of SET complex led to the analysis of protein expression of complex members in tumor tissues and their correlation to clinical parameters in serous EOC patients.

The SET complex proteins are ubiquitously expressed either associated with the endoplasmic reticulum or in the nucleus. While cytoplasmic localization rather than specific endoplasmic reticulum localization was assessed here, the cellular localization of the SET complex proteins found in this study is consistent with the literature. The role of the SET complex in cancer can be due to the oxidative stress presents in tumors. Following oxidative stress, SET members are found in the nucleus where cooperation between them was proposed. Set and Pp32 favor DNA accessibility <sup>15-18</sup> which allow recognition of the DNA distortions by Hmgb2 <sup>9</sup>. Nm23 by its glycosylase/lyase activity favors the base excision repair <sup>9</sup> that is executed by Ape1 <sup>12</sup>.

Independently, all proteins included in the SET complex were shown to have clinical significance in different types of cancer. However, to our knowledge, no study to date evaluates expression of the whole protein complex within specific cancer. Spearman test correlations revealed that protein expression of all members are correlated to the expression of Nm23 and Set ( $p < 0.01$ ,  $R > 0.21$ , data not shown) and are overexpressed in TOVs compared to LMPs suggesting their implication in malignancy of EOC. By their granzyme-A attack, natural killer and cytotoxic T lymphocytes can be implicated in tumor cells recognition and elimination. Granzyme-A is known to cleave, among others, the two Nm23 inhibitors, Set and Pp32 thus activating the DNase activity of Nm23 <sup>12</sup>. It would have been interesting to correlate the expression of the proteins with the apoptosis status of the tumors. However, we were not able to evaluate the level of apoptosis induced by Nm23 as



single-stranded nicks in the DNA cannot be visualized in the tissue arrays used in this study by conventional IHC.

Nm23 was shown to be implicated in the formation of nucleotide triphosphate from the nucleotide diphosphate by its nucleotide diphosphate (NDP) kinase activity (reviewed in <sup>19,20</sup>) and its expression was reported to be associated with a higher cell proliferation <sup>21</sup>. As it was reported that TOVs had higher proliferation rate than LMPs, these results are consistent with ours where TOVs overexpressed Nm23 compared to LMPs and G1 tumors <sup>22,23</sup>. The dual and controversial role of Nm23 in cancer progression is unresolved to date. For example, in several cancers including breast <sup>24</sup>, melanoma <sup>25</sup> and liver <sup>26</sup>, Nm23 was demonstrated to be a metastasis suppressor (and reviewed in <sup>27,28</sup>). However, Nm23 act as an oncogene in neuroblastoma <sup>29-31</sup>, leukemia and lymphoma <sup>32,33</sup> but also in tumors of lung <sup>34</sup> and pancreas <sup>35</sup>, colon <sup>36</sup>, where its overexpression is associated with aggressiveness and/or poor patient survival (reviewed in <sup>27,28</sup>). Nm23 also appears to have a role in cell differentiation, although the direction of altered expression is dependent on the cell type (reviewed in <sup>28,37</sup>). In a breast cancer cell line <sup>38</sup> or neural progenitors <sup>39</sup>, overexpression of Nm23 leads to the recovery of normal differentiation functions. In contrast, in a colon cancer cell line <sup>28</sup> as well as in hematopoietic progenitors <sup>40</sup>, lymphoma <sup>41</sup> or leukemia cells <sup>42</sup>, the differentiation process is associated with a decrease of Nm23. In our study, expression of Nm23 was significantly overexpressed in tumors of moderate (G2) and high grade (G3) compared to the low grade (G0 or G1) consistent with the results of other groups where TOVs (G2 and G3) presented higher expression of Nm23 in comparison to LMPs <sup>43</sup> or benign lesions <sup>44,45,46</sup>.

The only other member of the SET complex described in EOC is the DNA binding protein Hmgb2. In a DNA microarray analysis study, *HMGB2* was found to be overexpressed in serous TOVs resistant to chemotherapy <sup>47</sup>. In our study where all samples are from chemotherapy naïve patients, Hmgb2 appeared to be associated with tumor differentiation since it was overexpressed in TOVs of G2 and G3 compared to those of G0 and G1. Our results are consistent with a previously

published study where Hmgb2 was also reported to be associated with malignant tumors compared to benign lesions in gastrointestinal tumors <sup>48</sup>.

Set, a nucleosome assembly protein, and Pp32 were reported to be the specific inhibitors of Nm23 <sup>9</sup>. Set and Pp32 were shown to play a role in the modification of chromatin <sup>18</sup> and the regulation of the half-life of some mRNA (reviewed in <sup>8</sup>). Set prevents DNA demethylation, histone acetylation and is implicated in DNA accessibility to favor DNA repair or activation of transcription <sup>15-18</sup>. High levels of Set are found in Wilms tumors but not in benign renal disease <sup>49</sup> and was reported to be highly expressed in transformed human cell lines compared to normal quiescent or differentiated cells <sup>49</sup>. In our study, the lowest Set expression was associated with the most differentiated low grade tumors and this is consistent with its reported expression in other cancers.

Pp32 is a nuclear phosphoprotein expressed in self-renewing population of cells <sup>50-52</sup>. This protein was also shown to promote activation of caspase-9 after involvement of the mitochondria during apoptosis <sup>53</sup> and to be involved in tumor differentiation <sup>54</sup>. In breast Pp32 was present but not differentially expressed when malignant and benign tumors were compared <sup>55</sup>. However, in prostate, overexpression of Pp32 was reported in moderate and high grade tumors compared to benign lesions <sup>52</sup> and reduction of its expression leads to cell differentiation and reduction in proliferation <sup>54</sup>. Its potent role as a tumor suppressor was also reported as constitutive expression of Pp32 leads to suppression of tumorigenicity caused by oncogenes *in vitro* and *in vivo* <sup>50, 56</sup> while silencing its endogenous expression sensitize the cells to oncogenic transformation <sup>50</sup>. In our analysis, we showed overexpression in low grade tumors (G0 and G1) compared to high grade (G2 or G3) which would be consistent with a suppressive role of Pp32 in EOCs.

The last member of the SET complex, Ape1, is a nucleotide excision repair factor known to be translocated to the nucleus following an oxidative stress where, probably in cooperation with the other SET complex members, it repairs DNA damages using

its base excision repair capability. In cancer, Ape1 activity and protein were reported to be elevated in gliomas<sup>57</sup> while in osteosarcoma, high expression of Ape1 is associated with poor prognosis of the patient<sup>58</sup>. Furthermore, Ape1 repair activity confers resistance to chemotherapy or radiotherapy in gliomas<sup>57</sup>, osteosarcoma<sup>58</sup>, cervical cancer<sup>59</sup> and germ cell cancer<sup>60</sup>. In our analysis, highest Ape1 expression was also associated with the more malignant disease, which is consistent with observations made in other cancers.

In previous studies, two members of the set complex were shown to be associated with patient outcome. In invasive EOCs, high expression of Nm23 was associated with poor patient prognosis<sup>61</sup>, which is in contrast to the observations made by others where low expression of Nm23 is related to a better prognosis of EOC patients although this trend did not reach significance in all analyses<sup>62, 63, 64</sup>. However, other reports, including our, did not show an association between Nm23 expression alone and prognosis<sup>65, 66</sup>. High level of Ape1 is associated with a better prognosis of patients receiving radical radiotherapy in bladder cancer<sup>67</sup>. In our study, individually, members of the SET complex were not associated with patient outcome (survival or disease free interval). In contrast, specific two-way combinations of markers did significantly stratify patients based on prognosis. In particular, tumors expressing high level of Nm23 and low level of Set, or low levels of Ape1 and high levels of Hmgb2, were significantly associated with a better prognosis as compared to all other tumors. It is noteworthy that these analyses allowed us to identify a set of 21 patients with the specified expression profiles associated with a better prognosis, of which only four were found to be in common between the two significant pair-wise analyses. These results suggest that these combinations (high Nm23/low Set and high Hmgb2/low Ape1) act as independent markers of prognosis.

In conclusion, we provide here the first simultaneous study of all members of the Set complex in a cancer context and we demonstrated that protein expression of Nm23, Pp32, Set, Hmgb2 and Ape1 are deregulated and can be related to the differentiation level of the tumors in EOC. This study highlights the advantage of looking at all

members of a pathway and the importance of holistic approach when dealing with a specific pathway since the sum of the deregulation of each member is what generates the downstream effect of the pathway. In particular, this appeared to be reflected in the survival analysis as the combination of two markers, instead of a protein alone, was required to significantly define patient prognosis. Not only do these studies suggest that further investigation of the Set complex in EOC is warranted, but they also point to the usefulness of multiple parameters when defining patient stratification nomograms.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Louise Champoux, Lise Portelance, Manon de Ladurantaye, Marise Roy and Jason Madore for technical assistance. We would like to thank Drs. Drouin, Gauthier, Dubuc-Lissoir and Sauthier, as well as the members of the gynecology-oncology and pathology services of the Hôpital Notre-Dame (CHUM) for tumor procurement. We are grateful to the laboratory members for thoughtful discussions. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (*CIHR*) to Drs A.-M.M.-M., P.N.T. and D.M.P. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (*FRSQ*). V.O. was supported by studentships from the *CIHR* and Canderel fund of the Institut du Cancer de Montréal. Dr D.M.P. is a recipient of a Chercheur-Clinicien Senior and Dr A.-M.M.-M. is a recipient of a Chercheur National, both fellowships provided by the *FRSQ*.

**REFERENCES**

1. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001;22(2):255-88.
2. Tavassoli. Serous tumor of low malignant potential with early stromal invasion (serous LMP with microinvasion). *Mod. Pathology* 1988;1(6):407-14.
3. Burger CW, Prinssen HM, Baak JP, Wagenaar N, Kenemans P. The management of borderline epithelial tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10(3):181-97.
4. Dietel M, Hauptmann S. Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Arch* 2000;436(5):403-12.
5. de Souza PL, Friedlander ML. Prognostic factors in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6(4):761-82.
6. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83 Suppl 1:135-66.
7. Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM, Le Page C, Ren F, Lussier C, Novak J, Ge B, Hudson TJ, Tonin PN, Mes-Masson AM. Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 2005;24(29):4672-87.
8. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003;15(5):553-9.
9. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003;112(5):659-72.
10. Nakamura J, Swenberg JA. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res* 1999;59(11):2522-6.
11. Bennett RA, Wilson DM, 3rd, Wong D, Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(14):7166-9.

12. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, Pommier Y, Lieberman J. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* 2003;4(2):145-53.

13. Ouellet V, Guyot MC, Le Page C, Filali-Mouhim A, Lussier C, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM. Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006;119(3):599-607.

14. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):205-16.

15. Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 2001;104(1):119-30.

16. Shikama N, Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Lee CW, Cairns W, La Thangue NB. Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol Cell Biol* 2000;20(23):8933-43.

17. Cervoni N, Detich N, Seo SB, Chakravarti D, Szyf M. The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem* 2002;277(28):25026-31.

18. Seo SB, Macfarlan T, McNamara P, Hong R, Mukai Y, Heo S, Chakravarti D. Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *J Biol Chem* 2002;277(16):14005-10.

19. Kimura N, Shimada N, Fukuda M, Ishijima Y, Miyazaki H, Ishii A, Takagi Y, Ishikawa N. Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32(3):309-15.

20. Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR, Slegers H. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(6):465-76.

21. Caligo MA, Cipollini G, Fiore L, Calvo S, Basolo F, Collecchi P, Ciardiello F, Pepe S, Petrini M, Bevilacqua G. NM23 gene expression correlates with cell growth rate and S-phase. *Int J Cancer* 1995;60(6):837-42.

22. Halperin R, Zehavi S, Dar P, Habler L, Hadas E, Bukovsky I, Schneider D. Clinical and molecular comparison between borderline serous ovarian tumors and advanced serous papillary ovarian carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;22(4):292-6.

23. Kitakata H, Nemoto-Sasaki Y, Takahashi Y, Kondo T, Mai M, Mukaida N. Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer Res* 2002;62(22):6682-7.

24. Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene* 1993;8(9):2325-33.

25. Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA, Steeg PS. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991;65(1):25-35.

26. Suzuki E, Ota T, Tsukuda K, Okita A, Matsuoka K, Murakami M, Doihara H, Shimizu N. nm23-H1 reduces in vitro cell migration and the liver metastatic potential of colon cancer cells by regulating myosin light chain phosphorylation. *Int J Cancer* 2004;108(2):207-11.

27. Hartsough MT, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32(3):301-8.

28. Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. nm23: unraveling its biological function in cell differentiation. *J Cell Physiol* 2000;182(2):144-9.

29. Hailat N, Keim DR, Melhem RF, Zhu XX, Eckerskorn C, Brodeur GM, Reynolds CP, Seeger RC, Lottspeich F, Strahler JR, et al. High levels of p19/nm23



protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J Clin Invest* 1991;88(1):341-5.

30. Chang CL, Zhu XX, Thoraval DH, Ungar D, Rawwas J, Hora N, Strahler JR, Hanash SM, Radany E. Nm23-H1 mutation in neuroblastoma [letter]. *Nature* 1994;370(6488):335-6.

31. Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, Arboleda MJ, Brodeur GM, Stram D, Slamon DJ, Steeg PS. Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 1993;8(4):855-65.

32. Niitsu N, Okabe-Kado J, Okamoto M, Takagi T, Yoshida T, Aoki S, Hirano M, Honma Y. Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97(5):1202-10.

33. Niitsu N, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Yamamoto-Yamaguchi Y, Umeda M, Honma Y. Prognostic implications of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein in the plasma of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999;94(10):3541-50.

34. Ozeki Y, Takishima K, Mamiya G. Immunohistochemical analysis of nm23/NDP kinase expression in human lung adenocarcinoma: association with tumor progression in Clara cell type. *Jpn J Cancer Res* 1994;85(8):840-6.

35. Nakamori S, Ishikawa O, Ohhigashi H, Kameyama M, Furukawa H, Sasaki Y, Inaji H, Higashiyama M, Imaoka S, Iwanaga T, et al. Expression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 gene product in human pancreatic cancer: an association with lymph node metastasis and tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 1993;11(2):151-8.

36. Royds JA, Cross SS, Silcocks PB, Scholefield JH, Rees RC, Stephenson TJ. Nm23 'anti-metastatic' gene product expression in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994;172(3):261-6.

37. Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32(3):247-58.

38. Howlett AR, Petersen OW, Steeg PS, Bissell MJ. A novel function for the nm23-H1 gene: overexpression in human breast carcinoma cells leads to the

formation of basement membrane and growth arrest. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(24):1838-44.

39. Gervasi F, D'Agnano I, Vossio S, Zupi G, Sacchi A, Lombardi D. nm23 influences proliferation and differentiation of PC12 cells in response to nerve growth factor. *Cell Growth Differ* 1996;7(12):1689-95.

40. Willems R, Van Bockstaele DR, Lardon F, Lenjou M, Nijs G, Snoeck HW, Berneman ZN, Slegers H. Decrease in nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) expression during hematopoietic maturation. *J Biol Chem* 1998;273(22):13663-8.

41. Aryee DN, Simonitsch I, Mosberger I, Kos K, Mann G, Schlogl E, Potschger U, Gadner H, Radaszkiewicz T, Kovar H. Variability of nm23-H1/NDPK-A expression in human lymphomas and its relation to tumour aggressiveness. *Br J Cancer* 1996;74(11):1693-8.

42. Yamashiro S, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Alteration of nm23 gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines. *Oncogene* 1994;9(9):2461-8.

43. Schneider J, Romero H, Ruiz R, Centeno MM, Rodriguez-Escudero FJ. nm23 expression in advanced and borderline ovarian carcinoma. *Anticancer Research* 1996;16(3A):1197-202.

44. Kaya H, Evans MF, Ekicioglu G, Tuzlali S, Kullu S, Foster C. Antimetastasis gene expression and numerical chromosomal abnormalities of chromosomes 1 & 17 in serous tumours of the ovary. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;22(3):240-2.

45. Alaiya AA, Franzen B, Fujioka K, Moberger B, Schedvins K, Silfversvard C, Linder S, Auer G. Phenotypic analysis of ovarian carcinoma: polypeptide expression in benign, borderline and malignant tumors. *Int J Cancer* 1997;73(5):678-83.

46. Harlozinska A, Bar JK, Gerber J. Nm23 Expression In Tissue Sections and Tumor Effusion Cells Of Ovarian Neoplasms. *Int J Cancer*. 1996;69(5):415-19.

47. Bernardini M, Lee CH, Beheshti B, Prasad M, Albert M, Marrano P, Begley H, Shaw P, Covens A, Murphy J, Rosen B, Minkin S, et al. High-resolution

mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 2005;7(6):603-13.

48. Koon N, Schneider-Stock R, Sarlomo-Rikala M, Lasota J, Smolkin M, Petroni G, Zaika A, Boltze C, Meyer F, Andersson L, Knuutila S, Miettinen M, et al. Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut* 2004;53(2):235-40.

49. Carlson SG, Eng E, Kim EG, Perlman EJ, Copeland TD, Ballermann BJ. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(10):1873-80.

50. Bai J, Brody JR, Kadkol SS, Pasternack GR. Tumor suppression and potentiation by manipulation of pp32 expression. *Oncogene* 2001;20(17):2153-60.

51. Brody JR, Kadkol SS, Mahmoud MA, Rebel JM, Pasternack GR. Identification of sequences required for inhibition of oncogene-mediated transformation by pp32. *J Biol Chem* 1999;274(29):20053-5.

52. Kadkol SS, Brody JR, Epstein JI, Kuhajda FP, Pasternack GR. Novel nuclear phosphoprotein pp32 is highly expressed in intermediate- and high-grade prostate cancer. *Prostate* 1998;34(3):231-7.

53. Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 2003;299(5604):223-6.

54. Brody JR, Kadkol SS, Hauer MC, Rajaii F, Lee J, Pasternack GR. pp32 reduction induces differentiation of TSU-Pr1 cells. *Am J Pathol* 2004;164(1):273-83.

55. Kadkol SS, El Naga GA, Brody JR, Bai J, Gusev Y, Dooley WC, Pasternack GR. Expression of pp32 gene family members in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001;68(1):65-73.

56. Chen TH, Brody JR, Romantsev FE, Yu JG, Kayler AE, Voneiff E, Kuhajda FP, Pasternack GR. Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol Biol Cell* 1996;7(12):2045-56.

57. Bobola MS, Blank A, Berger MS, Stevens BA, Silber JR. Apurinic/aprimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. *Clin Cancer Res* 2001;7(11):3510-8.
58. Wang D, Luo M, Kelley MR. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol Cancer Ther* 2004;3(6):679-86.
59. Herring CJ, West CM, Wilks DP, Davidson SE, Hunter RD, Berry P, Forster G, MacKinnon J, Rafferty JA, Elder RH, Hendry JH, Margison GP. Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. *Br J Cancer* 1998;78(9):1128-33.
60. Robertson KA, Bullock HA, Xu Y, Tritt R, Zimmerman E, Ulbright TM, Foster RS, Einhorn LH, Kelley MR. Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer Res* 2001;61(5):2220-5.
61. Schneider J, Pollan M, Jimenez E, Marenbach K, Martinez N, Volm M, Marx D, Meden H. nm23-H1 expression defines a high-risk subpopulation of patients with early-stage epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2000;82(10):1662-70.
62. Srivatsa PJ, Cliby WA, Keeney GL, Dodson MK, Suman VJ, Roche PC, Podratz KC. Elevated nm23 protein expression is correlated with diminished progression-free survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996;60(3):363-72.
63. Tas F, Tuzlali S, Aydiner A, Saip P, Salihoglu Y, Iplikci A, Topuz E. Prognostic role of nm23 gene expression in patients with ovarian cancer. *Am J Clin Oncol* 2002;25(2):164-7.
64. Scambia G, Ferrandina G, Marone M, Benedetti Panici P, Giannitelli C, Piantelli M, Leone A, Mancuso S. nm23 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome and other clinicopathologic and biochemical prognostic parameters. *J Clin Oncol* 1996;14(2):334-42.

65. Baekelandt M, Holm R, Trope CG, Nesland JM, Kristensen GB. The significance of metastasis-related factors cathepsin-D and nm23 in advanced ovarian cancer. *Ann Oncol* 1999;10(11):1335-41.

66. Leary JA, Kerr J, Chenevix-Trench G, Doris CP, Hurst T, Houghton CR, Friedlander ML. Increased expression of the NME1 gene is associated with metastasis in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 1995;64(3):189-95.

67. Sak SC, Harnden P, Johnston CF, Paul AB, Kiltie AE. APE1 and XRCC1 protein expression levels predict cancer-specific survival following radical radiotherapy in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6205-11.

**Table 1 Description of the serous tissue array**

Patient informations				
Diagnosed tumor grade	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Composition of the serous tissue array	56	11	53	115
Mean age $\pm$ S.D. (years)	49 $\pm$ 14	41 $\pm$ 15	60 $\pm$ 12	62 $\pm$ 10
Disease Staging				
Stage I-II (early)	21	1	3	10
Stage III-IV (advanced)	35	10	50	114
Risk of LMPs				
Low	31	-	-	-
High	23	-	-	-
Tumor residuum				
> 2cm	-	6	19	47
< 2cm	-	5	23	44
Disease free interval				
Mean $\pm$ S.D. (months)	52 $\pm$ 36	51 $\pm$ 49	13 $\pm$ 10	16 $\pm$ 12
Censored patient	7 / 36	3 / 6	24 / 30	26 / 48
Survival				
Mean $\pm$ S.D. (months)	58 $\pm$ 33	56 $\pm$ 47	28 $\pm$ 14	28 $\pm$ 16
Censored patient	0 / 41	0 / 7	12 / 35	50 / 62

**Table 2 SET complex protein expressions determined by immunohistochemistry and association to tumor grade**

Protein	Tumor grade	Mean intensity of staining $\pm$ S.D.	Tumor grade comparison						
			p value of a Mann-Whitney U test						
			0-123	0-1	0-2	0-3	1-2	1-3	2-3
Nm23	0	55 $\pm$ 14							
	1	48 $\pm$ 16	<b>0.05</b>	0.18	0.09	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	0.98
	2	62 $\pm$ 19							
	3	61 $\pm$ 18							
Pp32	0	63 $\pm$ 16							
	1	71 $\pm$ 20	0.09	0.16	0.17	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	0.84
	2	60 $\pm$ 15							
	3	58 $\pm$ 14							
Set	0	56 $\pm$ 13							
	1	72 $\pm$ 20	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.94	0.94	0.98
	2	68 $\pm$ 17							
	3	68 $\pm$ 14							
Hmgb2	0	44 $\pm$ 14							
	1	44 $\pm$ 9	<b>&lt;0.001</b>	0.21	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.09	<b>0.001</b>	<b>0.005</b>
	2	56 $\pm$ 20							
	3	66 $\pm$ 20							
Ape1	0	56 $\pm$ 15							
	1	68 $\pm$ 15	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.02</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	0.70
	2	80 $\pm$ 16							
	3	81 $\pm$ 16							

\* bold means that statistical significance is reached

**Table 3 SET complex protein expressions determined by immunohistochemistry and association to disease staging**

Protein	Tumor stage	Staining intensity						p value of the Mann-Whitney U test		
		All tumors		LMPs only		TOVs only		All tumors	LMPs only	TOVs only
		Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.			
Nm23	Early	53	15	50	12	58	18	<b>0.04</b>	<b>0.06</b>	0.58
	Advanced	60	18	58	15	61	19			
Pp32	Early	55	16	57	17	53	15	0.20	0.14	0.24
	Advanced	61	15	66	15	60	15			
Set	Early	60	15	55	10	67	19	<b>0.004</b>	0.62	0.49
	Advanced	67	15	58	15	68	14			
Hmgb2	Early	52	18	44	9	64	21	0.09	0.53	0.62
	Advanced	58	21	45	17	61	20			
Ape1	Early	65	20	55	16	80	17	<b>0.004</b>	0.69	0.97
	Advanced	76	18	56	14	80	16			

\* bold means that statistical significance is reached

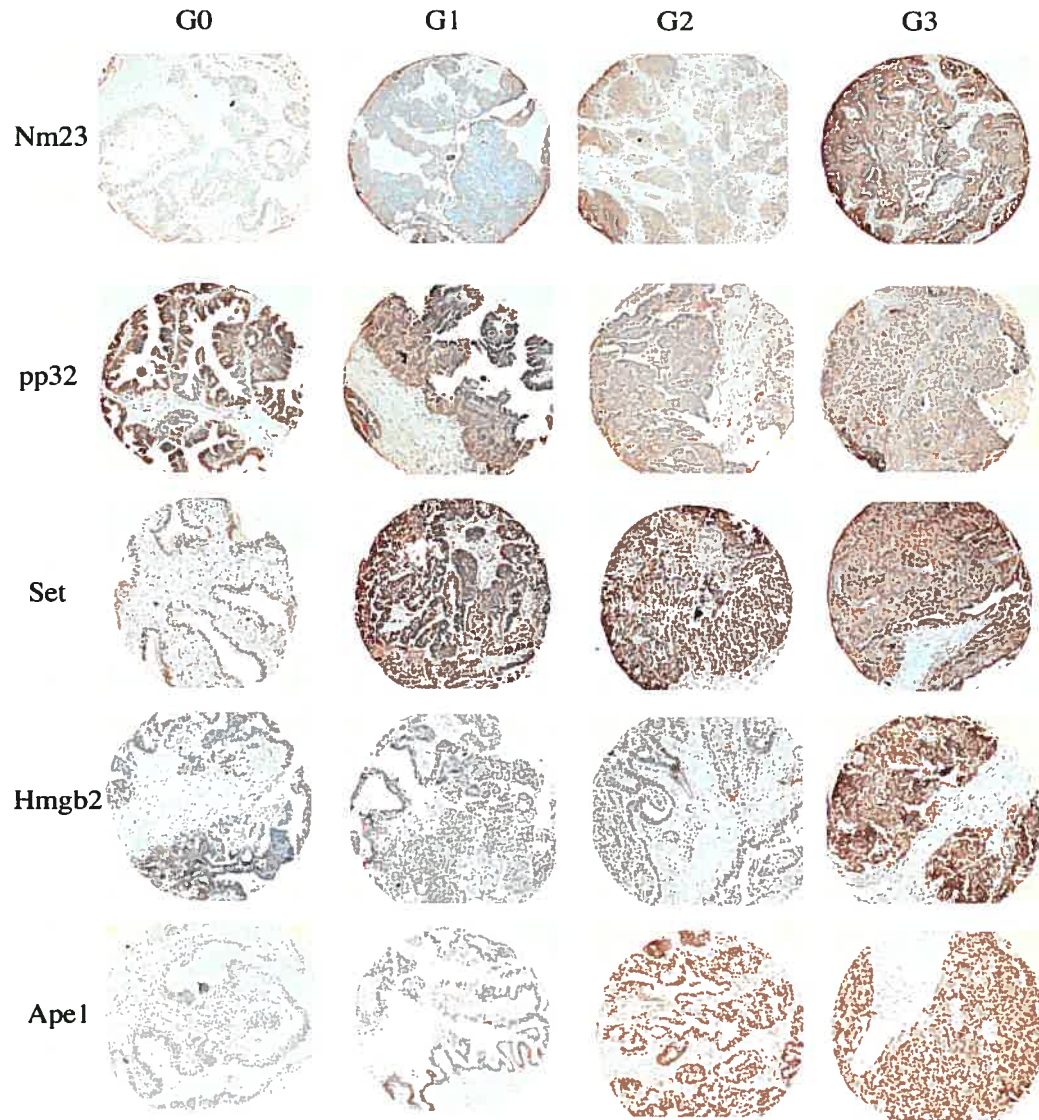
**Table 4 Survival and disease free interval analysis performed using a Kaplan-Meier coupled to a log rank test**

Markers	Survival				Disease free interval				
	G0123	G123	G2	G3	G123	G2	G3	G123*	
Nm23	0.62	0.67	0.47	0.65	0.23	0.58	0.40	0.30	0.34
Pp32	0.38	0.56	0.78	0.83	0.16	0.40	0.51	<b>0.08</b>	0.18
Set	<b>0.06</b>	0.65	0.76	0.80	0.88	0.33	0.58	0.56	0.91
Hmgb2	0.25	0.44	0.68	0.49	0.88	0.56	0.57	0.58	0.77
Ape1	<b>0.03</b>	0.72	0.59	0.80	0.50	0.33	0.44	0.81	0.72

\* Censure was set either at 18 (left) or 24 (right) months

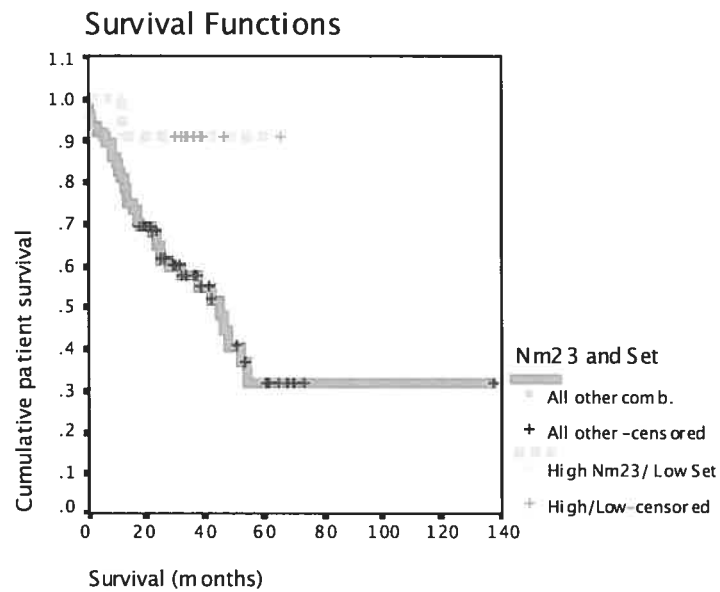
\*\* bold means that statistical significance is reached



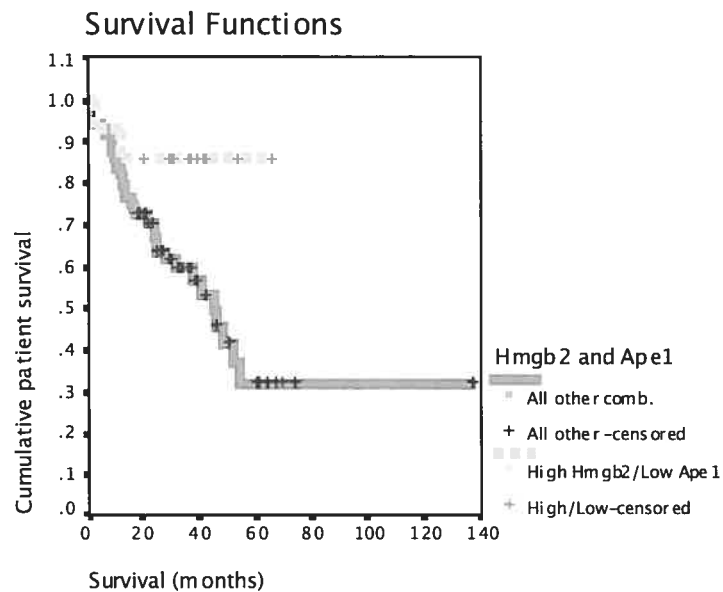


**Figure 1** Expression of the SET complex proteins on epithelial ovarian tumor tissues of different grades varying from G0 to G3. Representative images of immunoperoxidase-stained cores are shown for each protein and grade (20X magnification). Nuclear and/or cytoplasmic staining was observed for all proteins. Nm23 and Pp32 presented differential expression between G0/G3 and G1/G2-G3. Hmgb2 showed differential expression between G3/G0-G1-G2 and G0/G2. Finally, expression of Set is differentially expressed between G0/G1-G2-G3 and Ape1 between G0/G1-G2-G3 and G1/G2-G3.

A)



B)



**Figure 2 Relation between combination of Set complex markers and cumulative survival of patients with EOC.** Kaplan-Meier graphical representation of survival curves demonstrated a better survival associated with (A) high expression of Nm23 and low expression of Set ( $p=0.03$ ) or (B) high expression of Hmgb2 and low expression of Ape1 ( $p=0.05$ ) compared all other two-way combination of these markers. Results are graphically represented as Kaplan-Meier curves. Patients with a follow up of less than 18 months were not used for this analysis. Log rank test was used to verify the significance of the difference in survival.

## CHAPITRE V

### An apoptotic molecular network identified by microarray: on the TRAIL to new insights in epithelial ovarian cancer

Véronique Ouellet<sup>1</sup>, Cécile Le Page<sup>1</sup>, Jason Madore<sup>1</sup>, Marie-Claude Guyot<sup>1</sup>,  
Véronique Barrès<sup>1</sup>, Christian Lussier<sup>2</sup>, Patricia N. Tonin<sup>3,4,5</sup>, Diane M.  
Provencher<sup>1,6,7</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,7</sup>.

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)/  
Institut du cancer de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup>Department of pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM),  
Montreal, Canada

<sup>3</sup>Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada

<sup>4</sup>Research Institute of McGill University Health Centre, Montreal, Canada

<sup>5</sup>Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

<sup>6</sup>Division of Gynecologic Oncology /Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>7</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

Article publié dans:

*Cancer, July 15th; 110(2) : 297-308, 2007*

**Keywords :** epithelial ovarian cancer, low malignant potential/borderline tumors,  
diagnostic and prognostic markers, Trail apoptosis

*V. Ouellet est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. C. Le Page, J. Madore, M-C Guyot et V. Barrès ont participé à la coloration ou à la relecture des lames d'immunohistochimie. C. Lussier a effectué à la révision de la pathologie des échantillons. D.M. Provencher, P.N. Tonin et A-M. Mes-Masson ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

---

Véronique Ouellet

---

Dr. Anne-Marie Mes-Masson  
Directrice de recherche

## RÉSUMÉ

Dans une étude antérieure, nous avons identifié des gènes candidats différentiellement exprimés entre les tumeurs épithéliales ovariennes à faible potentiel de malignité et les tumeurs invasives suite à une analyse d'expression génique utilisant des micropuces à ADN. Parmi ces derniers, certains candidats étaient reliés à l'apoptose : *TRAIL*, *CASP8*, *FLIP* et *CYC*. Dans la présente étude, nous avons effectué de l'immunohistochimie sur 235 tumeurs ovariennes séreuses de divers grades et stades disposées sur un microétalage de tissus afin d'évaluer si une expression différentielle au niveau de la protéine existe pour ces candidats de même que pour les quatre récepteurs de Trail (Dr4, Dr5, DcR1 et DcR2). Toutes les protéines testées, sauf DcR1 et DcR2 ont montré une expression différentielle entre les tumeurs de grade 0 (à faible potentiel de malignité) et celles de grade 2 et de grade 3. Trail a également montré une expression différentielle entre les tumeurs de grade 0 et celles de grade 1. Lorsque toutes les tumeurs ont été comparées, le niveau d'expression de Trail, Dr4, Dr5, DcR1 et Flip était distinct entre les stades précoces et avancés. Une forte expression de Dr5 est associée avec un pronostic sombre pour les patientes atteintes de tumeurs invasives de même que pour le sous-groupe de patientes présentant des tumeurs de grade 3. De plus, les combinaisons de Trail et Dr5, DcR2 et Cyc, Flip et Dr5, Flip et DcR2, DcR1 et Dr5 or Dr4 et Flip ont montré une association avec le pronostic des patientes. L'identification de nouvelles protéines dans le diagnostic initial et le pronostic des patientes atteintes de cancer épithélial de l'ovaire pourrait mener à une meilleure compréhension de la maladie, à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en plus d'être utile lors de la prise en charge des patientes.

## ABSTRACT

In a previous microarray expression analysis, we identified candidate genes differentially expressed between low malignant potential and invasive serous epithelial ovarian tumors. Among them, the apoptosis-related candidates *TRAIL*, *CASP8*, *FLIP* and *CYC* were identified. Here, we performed immunohistochemistry on a tissue array composed of 235 serous tumors of different grades and stages to evaluate if differential protein expression is seen for these candidates and the four receptors of Trail: Dr4, Dr5, DcR1 and DcR2. All proteins, except DcR1 and DcR2, were significantly differentially expressed between tumors of grade 0 (low malignant potential) and those of grade 2 and 3. Trail also showed differential expression between tumors of grade 0 and 1. When all tumors were compared the expression levels of Trail, Dr4, Dr5, DcR1 and Flip differed significantly between early and advanced stage disease. High Dr5 expression was associated with poor prognosis of patients with invasive tumors as well as in the subgroup of patients with grade 3 tumors. Furthermore, combination of two proteins: Trail and Dr5, DcR2 and Cyc, Flip and Dr5, Flip and DcR2, DcR1 and Dr5 or Dr4 and Flip, revealed an association with patient prognosis. Identification of new proteins in the initial diagnosis and prognosis of patients with epithelial ovarian cancer could lead to a better understanding of the disease, highlighting new potential therapeutic targets and could be useful in patient management.

## INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) is a silent disease usually diagnosed at an advanced stage and presently represents the most fatal gynecologic malignancy <sup>1</sup>. EOC tumors are classified by different histopathologies and the serous type is the most frequent <sup>2</sup>. Serous EOC tumors can be subdivided in low malignant potential (LMP) or borderline and invasive (TOV) tumors. In addition to a higher level of cellular atypia, the major morphological criteria distinguishing these two classes is the presence of stromal invasion in TOVs, where at most microinvasion is observed in some LMP cases <sup>3-5</sup>. Patients with LMPs have an excellent five-year survival rate, which reaches 90-95%, compared to those with TOVs, which is 30-40%. The degree of differentiation of malignant EOC defines the tumor grade with LMPs (G0) being highly differentiated while TOVs are classified as well (G1), moderately (G2) or poorly (G3) differentiated. The volume and extent of tumor spread define the clinical stage, varying from I to IV where stage I is limited to one or both ovaries, stage II is associated with pelvic extension, stage III spreads into the abdominal cavity, and stage IV tumors presents distant metastases <sup>6,7</sup>.

Following surgical removal of the tumor mass, EOC patients usually receive a first line of platinum-based combined chemotherapy (reviewed in <sup>8</sup>). However, even if 80% of patients respond initially to treatment, most patients relapse and develop treatment resistance with different latencies indicating the need for a better understanding of the disease and the identification of new therapeutic targets or treatment modalities. Some factors have been identified in drug resistance, such as the expression of multi-drug resistance proteins, hypoxia in the tumor microenvironment, and resistance to apoptosis by overexpression of survival factors and down-regulation of death signaling proteins <sup>8</sup>.

In a previous study, we defined molecular profiles distinguishing serous LMPs from TOVs of G3 that included members of the Trail signaling pathway. Trail (Tnfsf10, Apo2L) is a secreted protein that induces apoptosis following binding to its receptors

Dr4 (Trail-R1, Apo2, Tnfrsf10A) and Dr5 (Trail-R2, Trick2, Killer, Tnfrsf10B). Two other receptors, DcR1 (Trail-R3, Trid, Tnfrsf10C) and DcR2 (Trail-R4, Trundd, Tnfrsf10D), allow the binding of Trail but are unable to transduce the apoptotic signal, thus acting as decoy receptors<sup>9</sup>. Trail was seen as a promising therapeutic agent as it induces apoptosis in cancer or transformed cells but not in normal cells<sup>10-13</sup>, whereas an *in vitro* study of EOC cell lines showed higher sensitivity in normal than in cancer cells<sup>14</sup>. This resistance to Trail-induced apoptosis by normal cells was suggested to occur in the presence of a higher level of decoy receptors at their surface compared to cancer cells<sup>15</sup>. Preclinical studies of recombinant Trail in animal models have demonstrated that it is a potential therapeutic target for breast, colon and ovarian cancer<sup>13, 14, 16, 17</sup>(reviewed in<sup>9</sup>). Trail also synergized with cytotoxic drugs and radiation to achieve anti-tumor activity in various cancers, including malignant gliomas, melanoma, leukemia, breast, colon and prostate carcinoma (reviewed in<sup>9</sup>).

In this report, we focused on protein expression of Trail signaling members in ovarian cancer. By immunohistochemistry (IHC), we assayed the expression level of different candidate proteins on a tissue array containing 235 serous tumor samples of different grades. Staining intensity was related to different clinical parameters, such as tumor grade and stage, and patient survival, to evaluate the usefulness of markers in the stratification of EOC tumors.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and tissue specimens**

Tumor samples were collected after obtaining appropriate consent of patients who underwent surgery in the Division of Gynecologic Oncology at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Histopathology, tumor grade and stage as defined by the Federation International of Gynecology and Obstetrics (FIGO) were determined by an independent pathologist to review and grade tumor samples <sup>7</sup>. Tissue selection criteria for this study was based on a serous histopathology from chemotherapy-naïve patients and all samples were collected between 1993-2003. Clinical data were extracted from the Système d'Archivage des Données en Oncologie (SARDO) that includes entries on tumor grade and stage, treatment and clinical outcomes such as the progression-free interval as defined by RECIST criteria <sup>18</sup> and survival.

### **Microarray data**

All Affymetrix HuGeneFL microarray data from this study are publicly available at <http://www.genomequebec.mcgill.ca/ovarian/>.

### **Serous epithelial ovarian cancer tissue array**

Two representative cores (0.6 mm diameter) of each tissue sample, following a selected based on the review of a hematoxylin-eosin-stained slide, were arrayed on an empty paraffin block. The tissue array was composed of 56 LMPs (G0), 11 G1, 53 G2 and 115 G3 tumors (Table 1). This tissue array was then sectioned, stained with hematoxylin-eosin and received another pathology review to confirm content.

### **Antibodies**

For IHC analysis, anti-caspase-8 p20 rabbit polyclonal antibody (sc-7890), anti-Flip mouse monoclonal antibody (sc-5276), anti-cytochrome c mouse monoclonal antibody (sc-13156), anti-DcR2 goat polyclonal antibody (sc-11638), anti-DcR1 goat polyclonal (sc-7193) anti-Dr4 goat polyclonal (sc-6823) and anti-TRAIL goat



polyclonal antibody (sc-6079) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Anti-Dr5 rabbit polyclonal antibody (ab8416) was purchase from Abcam (Abcam Inc., MA, USA).

### **Immunohistochemistry**

The tissue arrays, cut in 5 $\mu$ m sections, were stained by an immunoperoxidase method as described elsewhere <sup>19</sup>. Tissue sections were heated to 60°C for 30 min, deparaffinized in toluene and rehydrated in an ethanol gradient. After 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, slides were submerged in boiling citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0) for 15 min, blocked with a protein blocking serum-free reagent (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) and incubated with the antibody for 60 min at room temperature. Tissues were incubated with either a secondary biotinylated antibody (DakoCytomation Inc.) or a rabbit anti-goat biotin-conjugated antibody (1:300) (sc-2774, Santa Cruz Biotechnology) for 20 min followed by incubation with streptavidin-peroxidase complex (DakoCytomation Inc.) for 20 min at room temperature. Liquid diaminobenzidine was applied to visualize the reaction (DakoCytomation Inc.) and nuclei were counterstained with hematoxylin. For negative controls phosphate buffered saline was used instead of the primary antibody. Protein expression was scored according to the extent (as a percentage of total malignant cells) and intensity (value of 0 for absence, 1 for low, 2 for moderate, and 3 for high intensity) of staining based on visualization. All slides were independently visualized by light microscopy at 20X magnification and scored in a blind study by two independent observers with an inter-rating of >90%. When strong differences in scoring between the two observers occurred the core was re-evaluated to reach a consensus between the two observers.

### **Apoptosis assay**

Apoptosis was assayed with anti-cleaved caspase-3 antibody (#9661) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. All sections were scored according to the extent (as a percentage of total malignant cells) and intensity (value of 0 for absence, 1 for low, 2 for moderate, and 3 for high

intensity) of staining based on visualization. Slides were treated as described in the previous section (immunohistochemistry). All slides were analyzed in a blinded manner by two independent observers.

### **Statistical analysis**

The association between IHC staining intensity and clinical variables (grades, stages, progression-free interval and patient survival) was analyzed by the Mann-Whitney U test. Comparisons of grades were performed between G0, G1, G2 and G3. The stages were divided into two groups: early (stages I-II) and advanced (stages III-IV). A Spearman correlation test was performed to evaluate the correlation between expressions of the different proteins. The significance of the proteins in predicting the survival of EOC patients was analyzed by Kaplan-Meier survival curves coupled to the log rank test. The threshold of intensity used in the log rank test to discriminate between the low and high intensity groups was based on the median intensity of TOVs (G1, G2 and G3). Patients with follow-up of less than 18 months were not used for this analysis. Statistical analysis was performed with SPSS software version 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) where statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Staining of apoptosis-related protein in tumor tissue

We previously performed molecular profiling of six LMP and 12 TOV tumor tissues by Affymetrix GeneCHIP HuGeneFL microarray (Santa Clara, CA, USA)<sup>20</sup>. A subset of differentially-expressed candidate genes was implicated in death receptor apoptosis including TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Caspase-8 (CASP8), Flice inhibitory protein (FLIP) and cytochrome c (CYC). To evaluate alterations at the protein level of these candidates in EOC, we undertook IHC using tissue microarray composed of 235 tumors of serous histopathology (Table 1). As TRAIL was identified as a candidate gene, we were interested to determine if the protein level of its receptors (Dr4, Dr5, DcR1 and DcR2) were also modulated in EOC. A representative core of each grade of tumor (G0 to G3) stained with the eight different antibodies is presented in Figure 1. Trail staining was observed in the cytoplasm of epithelial cells but also diffuse in stromal cells. Staining was mainly located in the cytoplasm but was also associated with a cytoplasmic membrane staining in assays of Dr4, DcR1 and DcR2 while Dr5 presented additional nuclear staining. We noted exclusive cytoplasmic staining for Flip, Casp8 and Cyc and the latter was distinguished by granular staining consistent with the expected mitochondrial localization of this protein.

### Association of staining intensity with histological grade

We next determined if protein expression was associated with tumor grade (Table 2). Statistically significant differences in protein expression, defined by the extent and intensity of staining, were observed for all proteins with the exception of DcR1 and DcR2 when tumors of G0 (LMP) were compared to those of G2 and G3. Dr5, Casp8 and Cyc presented a higher expression in tumors of G2 and G3 compared to G0 ( $p < 0.01$ ) while Trail, Dr4 and Flip presented with lower levels of expression in the higher grades ( $p \leq 0.01$ ) (Table 2). Trail and Flip were the only proteins that exhibited differential expression between the two most differentiated groups of tumors (G0>G1) ( $p = 0.03$  and  $p < 0.001$ , respectively) (Table 2). Statistically significant higher

protein expression with increasing grade was observed when comparing tumors of G1 and G2 and/or G3 for Cyc ( $p=0.02$  and  $p=0.01$ ) and Casp8 ( $p=0.05$ , G2 and G3) while lower expression of Trail was observed ( $p=0.04$  for G3), (Table 2). Tumors of G2 expressed significant higher level of Trail and Dr4 compared to tumors of G3 (Table 2).

### **Association of staining intensity and clinical stage**

As clinical staging is used to describe tumor extension, we evaluated if the staining intensity of apoptosis-related proteins was associated with stage. We grouped clinical stages I-II as early stage tumors (21 in LMPs, 14 in TOVs), and clinical stages III-IV as advanced stage tumors (35 in LMPs, and 174 in TOVs) (Table 1). When all tumors (G0, G1, G2 and G3) were analyzed together, we observed a significant higher Dr5 expression in advanced stage disease ( $p=0.03$ ) in contrast to Trail, Dr4, DcR1 and Flip which were higher in early stage disease ( $p=0.01$ ,  $p=0.03$ ,  $p=0.03$  and  $p<0.001$ , respectively) (Table 3). When TOVs were considered separately, DcR1 and Flip showed higher expression in early compared to advanced stage ( $p=0.01$  and  $p<0.001$ , respectively). However, due to the small number of early stage tumors, and the strong association with tumor grade, the observed differential expression may reflect the influence of grade rather than stage.

### **Analysis of apoptosis**

As one of the hallmarks of cancer is resistance to cell death, we determined if our samples exhibited differential indices of apoptosis. One of the methods of evaluating apoptosis linked to signaling from cell death receptors, such as Trail receptors, is to measure the level of activation of the effector caspase-3. We tested apoptosis levels by IHC using an antibody specific to cleaved caspase-3 (Figure 2) and visually scored staining as low, moderate or high. Levels of apoptosis varied in each tumor grade (Table 4), and although no statistically significant difference were observed, we did note a tendency towards lower activated caspase-3 expression in LMPs compared to TOVs of G2 or G3 ( $p=0.08$  and  $p=0.09$ ). We next determined if the level of apoptosis, measured by the presence of cleaved caspase-3, correlated with expression

patterns observed with Trail signaling pathway members. Using a Spearman's correlation test, we were unable to establish a significant correlation between any Trail signaling members and the level of cleaved caspase-3 (data not shown).

### **Association of apoptosis-related proteins and patient survival**

We then determined if the apoptosis-related proteins of our study could predict patient outcome. We used the median of intensity of TOVs for each protein as the threshold to perform survival analyses based on Kaplan-Meier curves coupled with a log rank test. We observed that only high expression of the receptor Dr5 was associated with poor survival of patients with invasive tumors ( $p=0.03$ ) (Figure 3A, Table 5). Furthermore, as grade was related to survival in EOC, we performed independent survival analysis for each tumor grade. While no markers were associated with survival in the group of G2 tumors, high expression of Dr5 was associated with poor patient prognosis in the subgroup of patients with G3 TOVs ( $p=0.03$ ) (Figure 3B, Table 5).

### **Combination of apoptosis-related proteins to predict patient survival**

We evaluated if tumors exhibiting certain patterns of proteins expression were associated with tumor aggressiveness and influenced prognosis. We coupled Kaplan-Meier curves with a log rank test to assess the significance of proteins in defining patient prognosis. The results of all protein analyses were combined in a pair-wise manner where the four different combinations of expression levels were considered: high/high, high/low, low/high and low/low. One combination presented a statistically significant association [Dr4 and Flip (0.02), Figure 4A], while four others showed a trend to associate with patient prognosis [DcR1 and Dr5 ( $p=0.06$ ), Figure 4B; Trail and Dr5 ( $p=0.09$ ), Figure 4C; Flip and Dr5 ( $p=0.09$ ), Figure 4D; and DcR2 and Cyc ( $p=0.08$ ), Figure 4E]. When all four combinations were compared only Flip and DcR2 failed to associate ( $p=0.23$ ; Figure 4F), although this results reflect the inability of markers to stratify patients in the early part of the curve (before 18 months). Subsequently, we refined the analysis to include only the two curves that defined the highest difference and these selected pair wise combinations were further compared

(Figure 5). Tumors expressing high levels of Dr4 and low levels of Flip conferred a worse prognosis to patient compared to all other combination of expression of these two markers ( $p=0.006$ ,  $p=0.01$  and  $p=0.04$ ) (Figure 5A, 5B, and 5C). Patient with tumors presenting low DcR1 and Dr5 expression had a better prognosis compared to those presenting high expression of DcR1 and Dr5 ( $p=0.07$ ) (Figure 5D) but also to those showing low DcR1 and high Dr5 ( $p=0.02$ ) (Figure 5E). Tumors showing high Flip and low Dr5 conferred a better prognosis to patient compared to those presenting low Flip and high Dr5 ( $p=0.02$ ) (Figure 5F). Tumors with low DcR2 and Cyc expression were associated with longer survival to the patients than those expressing high levels of DcR2 and low levels of Cyc ( $p= 0.04$ ) (Figure 5G). Patient with tumors expressing high levels of Trail and low levels of Dr5 had longer survival than those with tumors presenting low levels of Trail and high levels of Dr5 ( $p= 0.04$ ) (Figure 5H). Finally, while comparisons of all combination of Flip and DcR2 was not significant, we did note that the combination of high expression of Flip and low expression of DcR2 seemed to confer a better prognosis compared to all other combinations of these two markers ( $p=0.09$ ,  $p=0.10$  and  $p=0.03$ ) (Figure 5I, 5J, and 5K).

## DISCUSSION

For this report, we conducted a study on Trail signaling using tissue microarray and we focused on the protein expression of Trail, its receptors (Dr4, Dr5, DcR1 and DcR2), other members of the pathway (Casp8, Cyc), the level of apoptosis in EOC, and we correlated their expression with clinical factors, such as tumor grade and prognosis. In EOC, Trail signaling may not only influence the growth of cancer cells per se, but may determine immunological responses and could reflect the patient sensitivity or resistance to chemotherapy. It is thus the interplay of all these factors that will influence disease end points and ultimately patient prognosis.

We found that Trail (Tnfsf10, Apo2L) was overexpressed in LMP tumors compared to every grade of invasive tumor, underexpressed in TOVs of G3 compared to those of G1 and G2, and overexpressed in tumors of early vs advanced stage disease when all tumors are included. However, when LMPs and TOVs are considered independently, no such association is seen.

These results are consistent with those in the literature showing either Trail overexpression in early-stage EOC compared with advanced-stage EOC or no association with disease stage <sup>21, 22</sup>. However, at the RNA level, TRAIL was overexpressed in poorly (G2-G3) compared to well differentiated (G1) tumors <sup>23</sup>. This discordance between protein and RNA level was already reported in breast cancer <sup>24</sup>, and was also reflected in our microarray analysis where G3 TOVs expressed higher levels of TRAIL than LMP tumors, and another published microarray study where TOVs were compared to normal ovarian surface epithelium cells <sup>25</sup>. In colon cancer, at the protein level results similar to ours are reported where Trail expression is less in adenoma when compared to adenocarcinoma <sup>26</sup>.

We observed the usual cytoplasmic and membrane staining of all Trail receptors whereas a nuclear staining was also seen for Dr5. While unexpected, nuclear staining for a Trail receptor has previously been reported in colon tumors <sup>26</sup>. We found that

TOVs of G2 and G3 presented higher expression of Dr5 compared to LMPs but did not show differential expression of DcR2 and DcR1 compared to LMPs. Our results are consistent with an investigation of colon cancers, where Dr5 levels were higher in carcinoma compared to normal cells, and no difference was seen for DcR1 and DcR2<sup>26</sup>.

One of the hallmarks of cancer is evasion from apoptosis<sup>27</sup>. This process can be accomplished in different ways including a reduction of death receptor, ligand and effector levels or upregulation of anti-apoptotic proteins by genetic and/or epigenetic changes. In EOC, no mutations in Trail receptors were found<sup>28</sup>. However, epigenetic silencing of TRAIL receptors was reported in different cancer types, including breast, lung, bladder, cervix, lymphoma, leukemia, myeloma, neuroblastoma and EOC<sup>29-32</sup> (and reviewed in<sup>9</sup>). Caspase-8 (Casp8), an effector of apoptosis was shown to be inactivated by hypermethylation in a number of different tumors derived from neuroblastoma, brain tumors, Ewing's sarcoma, and small lung cell carcinoma (reviewed in<sup>9</sup>). However, in EOC cell lines, no loss of expression of Casp8 was reported in Trail-resistant cell lines<sup>33</sup>.

We observed that LMPs exhibited higher protein levels of Flip than TOVs of G1, G2 and G3. Flip is overexpressed in several tumors (Burkitt's lymphoma, pancreatic carcinoma, melanoma, and neuroblastoma) and this increased expression is associated with resistance to chemotherapy in many types of cancers including EOC<sup>10, 34</sup> (reviewed in<sup>9, 35, 36</sup>). Although a higher level of apoptosis was seen in our analysis of TOVs of G2 and G3 compared to G0, this was not statistically significance ( $p=0.08$  and  $p=0.09$ ) which is in agreement with another study where the apoptotic index in ovarian tumors was higher in high grade compared to low grade tumors<sup>37</sup>. In cell lines of different cancers, including EOC, sensitivity to Trail was shown to be associated with high expression of Dr4 and Dr5<sup>10, 38</sup> and reduced expression of DcR1 (reviewed in<sup>36</sup>). Other studies, including those on EOC cell lines have revealed that only Dr4 and not Dr5 level correlates with Trail sensitivity<sup>10, 33, 39, 40</sup> and that the ratio of death and decoy receptors do not correlate with resistance to Trail<sup>14</sup>.



In this work, we observed that high expression of Dr5 is associated with worse patient prognosis either when TOVs of all grades are included or in the subgroup of G3 TOVs only, which is consistent with a previous report on lung cancer <sup>41</sup>. In addition to its association with patient survival, Dr5 was also associated with tumor grade and disease stage suggesting a role in EOC although further molecular studies will be needed to address this point. We also showed that even if a protein alone is not significantly associated with patient prognosis, pairing its expression with another protein could result in a significant association. In this study, a combination of Dr4/Flip, DcR1/Dr5, Flip/DcR2, Trail/Dr5, Flip/Dr5 and Cyc/DcR2 was associated with patient survival. It is noteworthy that the highest significance of any pair wise combination appears to involve combining Flip or Dr5 with another member of the pathway. We noted that Dr5 alone displayed a better significance in patient survival compared to all combinations involving Dr5, although combinations involving Dr4/Flip were as significant as Dr5 alone. These findings suggest that a strategy which sums the activities of different partners within a pathway may be more appropriate in designing nomograms for patient stratification. We highlights the advantage of looking at all members of a pathway and the importance of holistic approach when dealing with a specific pathway since the sum of the deregulation of each member is what generates the downstream effect of the pathway. In particular, this appeared to be reflected in the survival analysis as the combination of two markers, instead of a protein alone, was required to significantly define patient prognosis.

In conclusion, our study is the first to simultaneously study of Trail and its four receptors in EOC. Here we showed that EOC tumors present deregulation of apoptosis-related proteins that are also related to tumor differentiation. This deregulation is accompanied with a trend towards higher apoptosis levels in TOVs of G2 and G3 compared to LMPs. While we demonstrate that only Dr5 by itself is significantly associated with patient prognosis, our results showed that a combination of markers can together provide relevant information on patient prognosis, suggesting that the interplay of members along a common signaling pathway influence the

ultimate outcome. It remains to be determined on a larger series if these proteins can be used clinically as markers of disease progression, either by themselves or in combination with proteins from other pathways.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Louise Champoux, Lise Portelance, Manon de Ladurantaye, Marise Roy and Stéphanie Girard for technical assistance. We would like to thank the Gynecologic Oncologist of CHUM for providing specimens. We are grateful to laboratory members for thoughtful discussion. The editorial assistance of Mr Ovid Da Silva, and the statistical assistance of Mr Robert Boileau, Research Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (*CIHR*) to Drs A.-M.M.-M., P.N.T. and D.M.P. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (*FRSQ*), affiliated to the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). V.O. was supported by studentships from the *CIHR* and the Canderel Fund of the Institut du Cancer de Montréal.

## REFERENCES

1. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001;22(2):255-88.
2. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003;97(10 Suppl):2631-42.
3. Tavassoli. Serous tumor of low malignant potential with early stromal invasion (serous LMP with microinvasion). *Mod. Pathology* 1988;1(6):407-14.
4. Burger CW, Prinssen HM, Baak JP, Wagenaar N, Kenemans P. The management of borderline epithelial tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10(3):181-97.
5. Dietel M, Hauptmann S. Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Arch* 2000;436(5):403-12.
6. de Souza PL, Friedlander ML. Prognostic factors in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6(4):761-82.
7. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83 Suppl 1:135-66.
8. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(7):502-16.
9. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004;23(16):2950-66.
10. Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):335-46.
11. Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, Ashkenazi A. Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr Biol* 1996;6(6):750-2.
12. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3(6):673-82.

13. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999;5(2):157-63.
14. Lane D, Cartier A, L'Esperance S, Cote M, Rancourt C, Piche A. Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2004;93(3):594-604.
15. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277(5327):818-21.
16. El-Deiry WS. The TRAIL to an anti-cancer agent. *Drug Resist Updat* 1999;2(2):79-80.
17. Bonavida B, Ng CP, Jazirehi A, Schiller G, Mizutani Y. Selectivity of TRAIL-mediated apoptosis of cancer cells and synergy with drugs: the trail to non-toxic cancer therapeutics (review). *Int J Oncol* 1999;15(4):793-802.
18. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):205-16.
19. Ouellet V, Guyot MC, Le Page C, Filali-Mouhim A, Lussier C, Tonin PN, et al. Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006;119(3):599-607.
20. Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM, Le Page C, Ren F, Lussier C, et al. Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 2005;24(29):4672-87.
21. Arts HJ, de Jong S, Hollema H, ten Hoor K, van der Zee AG, de Vries EG. Chemotherapy induces death receptor 5 in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92(3):794-800.

22. Horak P, Pils D, Kaider A, Pinter A, Elandt K, Sax C, et al. Perturbation of the tumor necrosis factor--related apoptosis-inducing ligand cascade in ovarian cancer: overexpression of FLIPL and deregulation of the functional receptors DR4 and DR5. *Clin Cancer Res* 2005;11(24 Pt 1):8585-91.

23. Lancaster JM, Sayer R, Blanchette C, Calingaert B, Whitaker R, Schildkraut J, et al. High expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is associated with favorable ovarian cancer survival. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):762-6.

24. Herrnring C, Reimer T, Jeschke U, Makovitzky J, Kruger K, Gerber B, et al. Expression of the apoptosis-inducing ligands FasL and TRAIL in malignant and benign human breast tumors. *Histochem Cell Biol* 2000;113(3):189-94.

25. Wong KK, Cheng RS, Mok SC. Identification of differentially expressed genes from ovarian cancer cells by MICROMAX cDNA microarray system. *Biotechniques* 2001;30(3):670-5.

26. Koornstra JJ, Kleibeuker JH, van Geelen CM, Rijcken FE, Hollema H, de Vries EG, et al. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *J Pathol* 2003;200(3):327-35.

27. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

28. Horak P, Pils D, Roessler M, Tomek S, Elandt K, Zeillinger R, et al. Common death receptor 4 (DR4) polymorphisms do not predispose to ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;97(2):514-8.

29. Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2005;3(6):335-43.

30. Margetts CD, Astuti D, Gentle DC, Cooper WN, Cascon A, Catchpole D, et al. Epigenetic analysis of HIC1, CASP8, FLIP, TSP1, DCR1, DCR2, DR4, DR5, KvDMR1, H19 and preferential 11p15.5 maternal-allele loss in von Hippel-Lindau and sporadic pheochromocytomas. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(1):161-72.

31. van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, et al. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2002;62(7):2157-61.

32. Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka KO, Reddy J, Miyajima K, Suzuki M, et al. Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer* 2004;109(5):786-92.

33. Tomek S, Horak P, Pribill I, Haller G, Rossler M, Zielinski CC, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines is overcome by co-treatment with cytotoxic drugs. *Gynecol Oncol* 2004;94(1):107-14.

34. Abedini MR, Qiu Q, Yan X, Tsang BK. Possible role of FLICE-like inhibitory protein (FLIP) in chemoresistant ovarian cancer cells in vitro. *Oncogene* 2004;23(42):6997-7004.

35. Fraser M, Leung B, Jahani-Asl A, Yan X, Thompson WE, Tsang BK. Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:66.

36. Ozoren N, El-Deiry WS. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003;13(2):135-47.

37. Yamasaki F, Tokunaga O, Sugimori H. Apoptotic index in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathologic factors and prognosis. *Gynecol Oncol* 1997;66(3):439-48.

38. Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 1999;59(11):2747-53.

39. Cuello M, Ettenberg SA, Nau MM, Lipkowitz S. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001;81(3):380-90.

40. Ozoren N, Fisher MJ, Kim K, Liu CX, Genin A, Shifman Y, et al. Homozygous deletion of the death receptor DR4 gene in a nasopharyngeal cancer cell line is associated with TRAIL resistance. *Int J Oncol* 2000;16(5):917-25.

41. Spierings DC, de Vries EG, Timens W, Groen HJ, Boezen HM, de Jong S. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3397-405.



**Table 1 Description of the serous tissue array**

Patient informations				
Diagnosed tumor grade	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Composition of the serous tissue array	56	11	53	115
Mean age $\pm$ S.D. (years)	49 $\pm$ 14	41 $\pm$ 15	60 $\pm$ 12	62 $\pm$ 10
Disease Staging				
Stage I-II (early)	21	1	3	10
Stage III-IV (advanced)	35	10	50	114
Risk of LMPs				
Low	31	-	-	-
High	23	-	-	-
Tumor residuum				
> 2cm	-	6	19	47
< 2cm	-	5	23	44
Disease free interval				
Mean $\pm$ S.D. (months)	52 $\pm$ 36	51 $\pm$ 49	13 $\pm$ 10	16 $\pm$ 12
Censored patient	7 / 36	3 / 6	24 / 30	26 / 48
Survival				
Mean $\pm$ S.D. (months)	58 $\pm$ 33	56 $\pm$ 47	28 $\pm$ 14	28 $\pm$ 16
Censored patient	0 / 41	0 / 7	12 / 35	50 / 62

**Table 2 Statistical analyses of candidate expression determined by immunohistochemistry and association to tumor grade**

Protein	Tumor grade	Median intensity	Significance, Mann-Withney test					
			0-1	0-2	0-3	1-2	1-3	2-3
Trail	0	50						
	1	41	<b>0.03</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.64	<b>0.04</b>	<b>0.007</b>
	2	41						
	3	37						
Dr4	0	94						
	1	92	0.39	<b>0.01</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.50	0.11	<b>0.03</b>
	2	89						
	3	84						
Dr5	0	55						
	1	64	0.09	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.33	0.81	0.12
	2	67						
	3	65						
DcR1	0	59						
	1	61	0.91	0.21	0.35	0.53	0.70	<b>0.01</b>
	2	64						
	3	56						
DcR2	0	55						
	1	57	0.30	0.27	0.23	0.98	0.66	0.96
	2	62						
	3	57						
Casp8	0	42						
	1	39	0.49	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	0.55
	2	50						
	3	46						
Cyc	0	33						
	1	33	0.58	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.02</b>	<b>0.006</b>	0.59
	2	42						
	3	45						
Flip	0	75						
	1	43	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.68	0.18	0.19
	2	48						
	3	52						

Bold mean that significance statistical is reached

**Table 3 Expression of apoptosis related protein determined by immunohistochemistry and association to disease staging**

Protein	Tumor stage	Median of Intensity			Significancy U test		
		All tumors	LMPs only	TOVs only	All tumors	LMPs only	TOVs only
Trail	Early	47	49	44	<b>0.01</b>	0.94	0.47
	Advanced	39	50	38			
Dr4	Early	93	95	88	<b>0.03</b>	0.41	0.75
	Advanced	87	93	86			
Dr5	Early	58	54	67	<b>0.03</b>	0.53	0.97
	Advanced	65	56	66			
DcR1	Early	65	60	74	<b>0.03</b>	0.62	<b>0.01</b>
	Advanced	58	59	58			
DcR2	Early	58	63	52	0.80	0.15	0.33
	Advanced	58	54	58			
Casp8	Early	43	43	48	0.27	0.64	0.87
	Advanced	45	42	47			
Cyc	Early	39	33	45	0.66	0.87	0.09
	Advanced	40	33	48			
Flip	Early	50	50	54	<b>&lt;0.001</b>	0.51	<b>&lt;0.001</b>
	Advanced	39	55	42			

Bold mean that statistical significance is reached

**Table 4 Analysis of apoptosis monitored by staining intensity of cleaved-caspase-3**

Cleaved-caspase-3 staining	Sample of G0		Sample of G1		Sample of G2		Sample of G3	
	N	%	N	%	N	%	N	%
None or weak	32	57	6	55	21	44	49	43
Moderate	18	32	5	45	23	48	54	48
High	6	11	0	0	4	8	10	9

N= number of samples

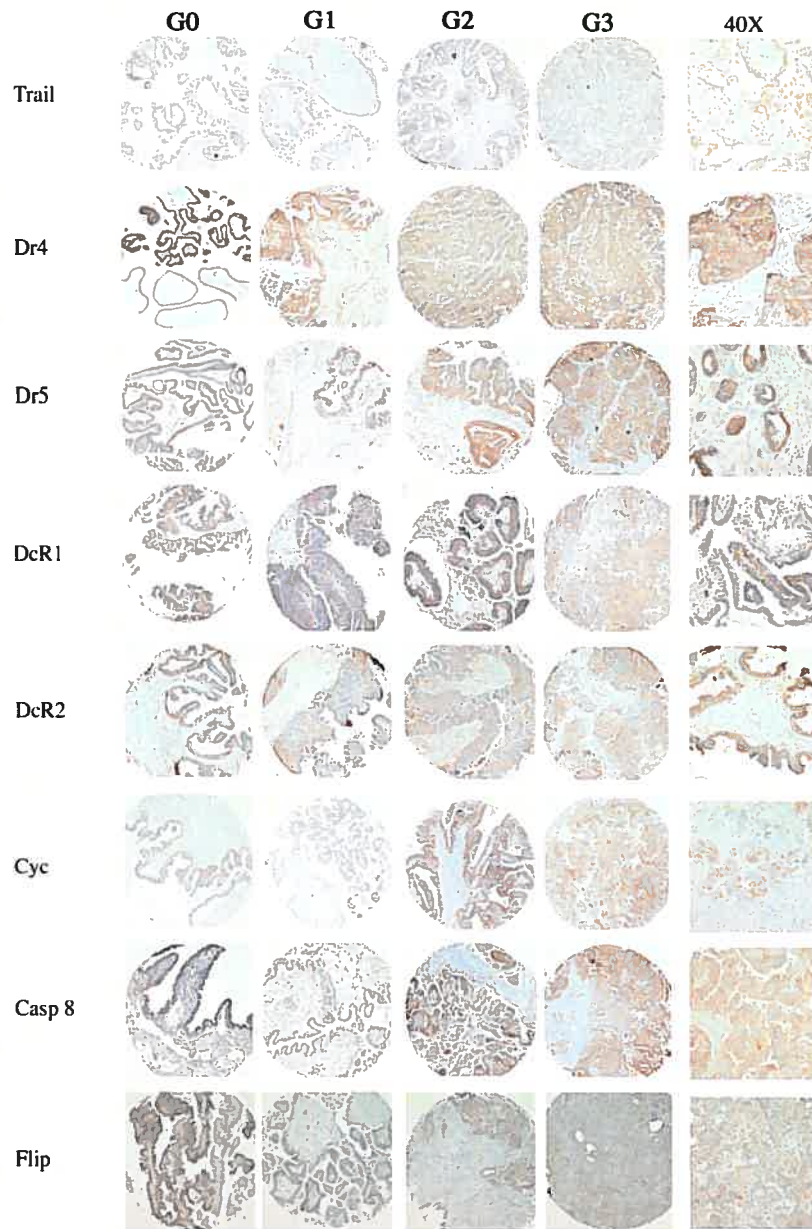
% = percent of samples

**Table 5 Survival analysis performed using a Kaplan-Meier coupled to a log rank test**

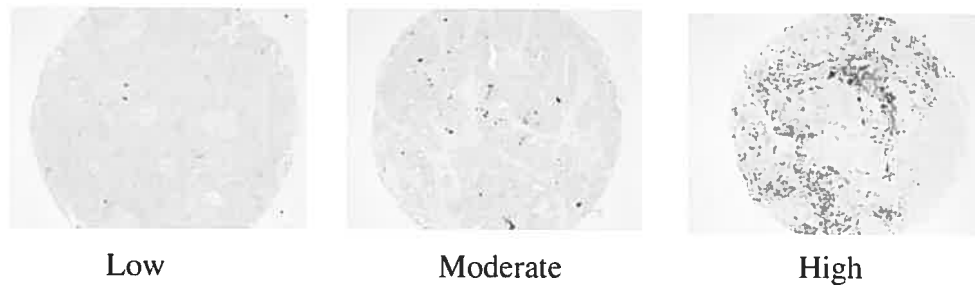
Protein	Median threshold of staining intensity	Survival (p value)*		
		G123	G2	G3
Trail	38	0.87	0.91	0.61
Dr4	68	0.56	0.93	0.15
Dr5	67	<b>0.03</b>	0.81	<b>0.03</b>
DcR1	59	0.45	0.85	0.59
DcR2	59	0.29	0.17	0.86
Casp8	47	0.62	0.3	0.81
Cyc	46	0.49	0.23	0.82
Flip	43	0.14	0.10	0.79

\* represents the p value of the log rank test coupled to the Kaplan-Meier curve

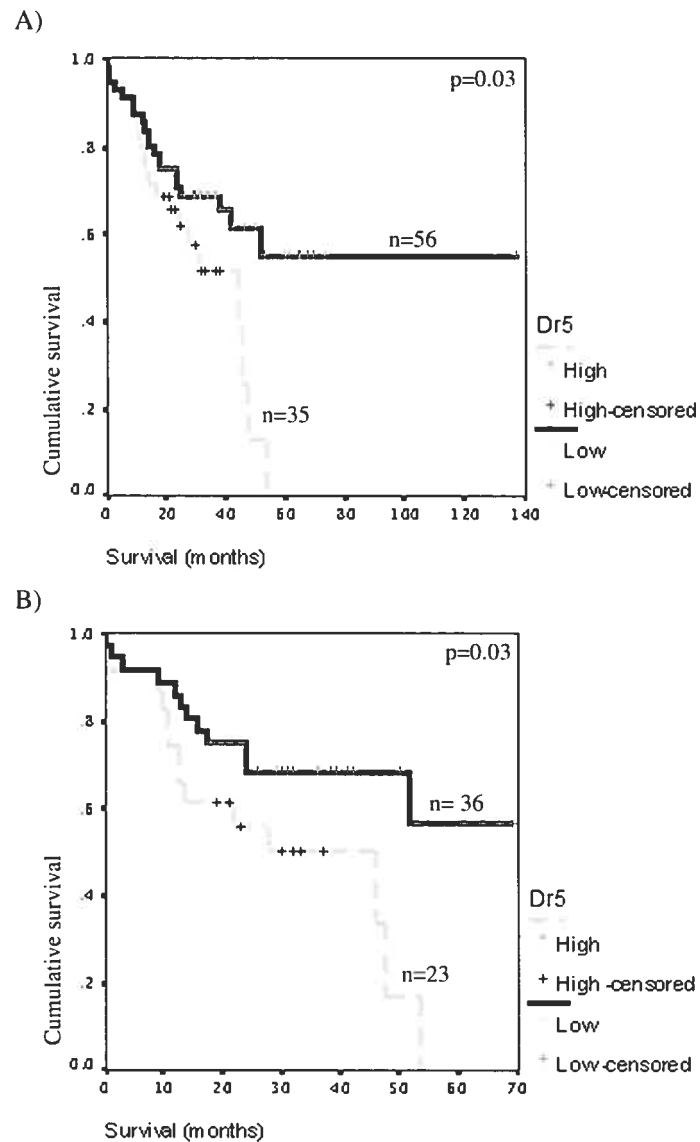
\*\* bold means that statistical significance is reached



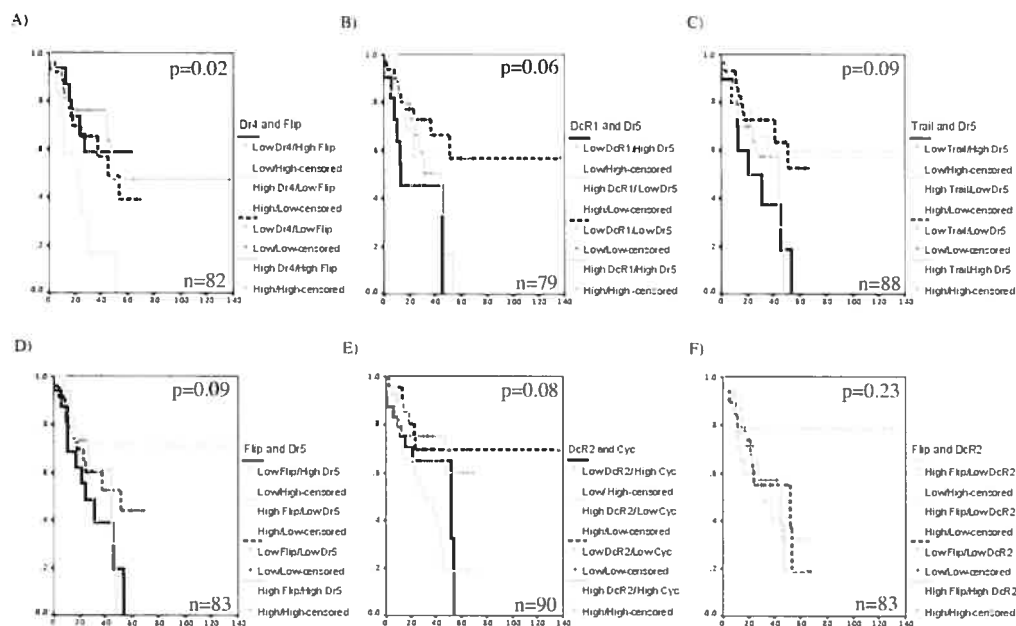
**Figure 1** Expression of apoptosis-related proteins on epithelial ovarian tumor tissues of different grades varying from G0 to G3. Representative images of immunoperoxidase-stained tissue cores are shown for each protein and grade (20X magnification). TRAIL staining was observed in the cytoplasm of epithelial cells and diffuse staining was observed in stromal cells. Cytoplasmic and membrane staining was observed for Dr4, DcR1, DcR2 and Dr5 while the latter also presented nuclear staining. Flip and Casp8 showed diffuse cytoplasmic staining while Cyc showed a granular-like cytoplasmic staining. Higher magnification (40X) of the staining is presented in the right panel.



**Figure 2 Expression of cleaved-caspase-3 on epithelial ovarian tumor tissues.** Representative images of immunoperoxidase-stained tissue cores for each of the three different intensity of staining (low, moderate, high) obtained with the cleaved-caspase-3 (20X magnification).

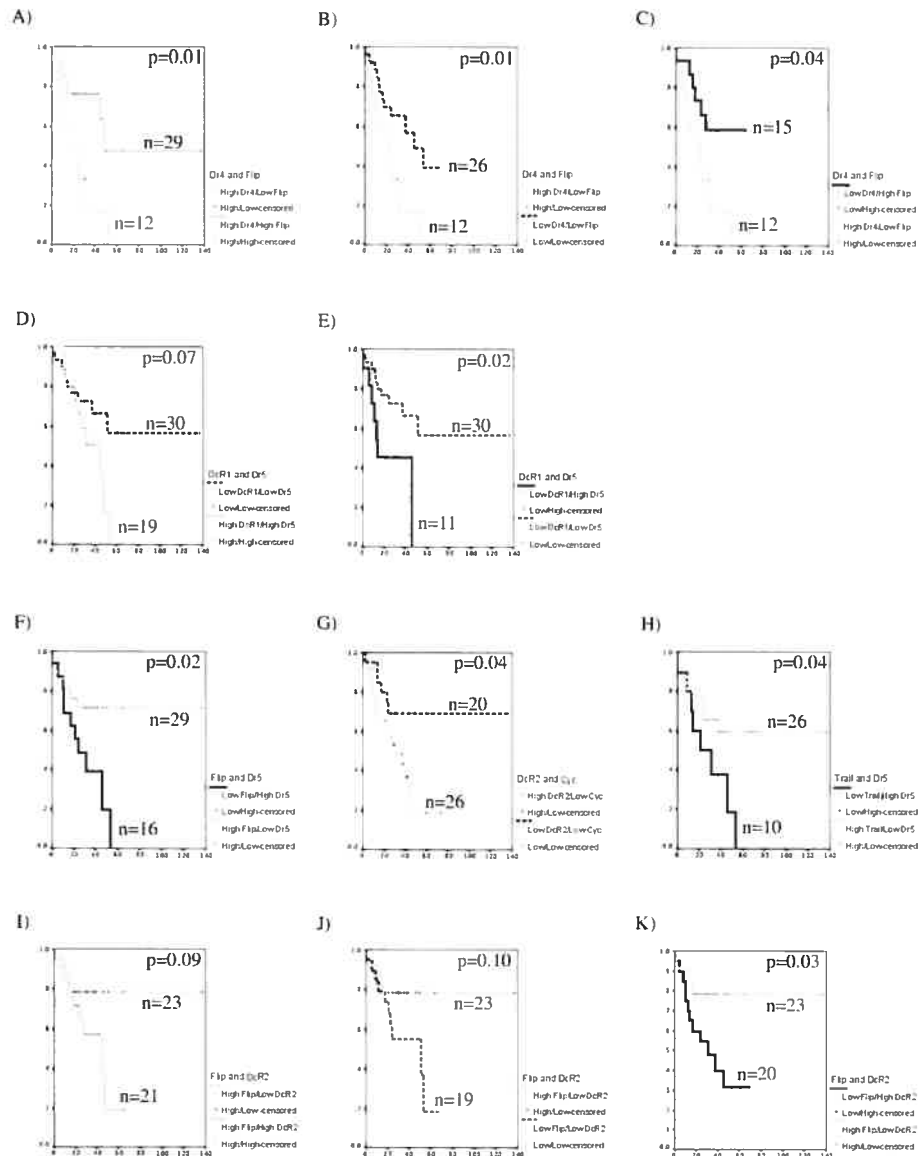


**Figure 3 Relationship between Dr5 expression and cumulative survival of patients with EOC.** Kaplan-Meier survival curves demonstrating poorer survival associated with high expression of Dr5 in A) invasive (G1 to G3) tumors ( $p=0.03$ ) or in B) G3 tumors only ( $p=0.03$ ). Patients with follow-up of less than 18 months were not used for this analysis. The log rank test verified the significance of the difference in survival.



**Figure 4 Relationship between combination of apoptosis-related proteins and the cumulative survival of patients with EOC.** Patient survival is presented as Kaplan-Meier curves where the log rank test defined the statistical difference between the different curves. Kaplan-Meier curves illustrating all possible combinations of Flip/Dr4, (A), DcR1/Dr5 (B), Trail/Dr5 (C), Flip/Dr5 (D) and DcR2/Cyc (E) are presented. The X axis represented patient survival in months and the Y axis represented the cumulative patient survival. Patients with follow-up of less than 18 months were not used for this analysis.





**Figure 5 Relationship between combination of apoptosis-related proteins and the cumulative survival of patients with EOC.** Patient survival is presented as Kaplan-Meier curves where the log rank test defined the statistical difference between the different curves. Kaplan-Meier curves of the combinations providing the most significant patient prognosis are highlighted. Combinations of Dr4 and Flip (A-C), DcR1 and Dr5 (D-E), Flip and Dr5 (F), DcR2 and Cyc (G) Trail and Dr5 (H), and finally Flip and DcR2 (I-K), are presented. The X axis represented patient survival in months and the Y axis represented the cumulative patient survival. Patients with follow-up of less than 18 months were not used for this analysis.

**6.1 LES COMPARAISONS ET LES MÉTA-ANALYSES DES DONNÉES D'EXPRESSION**

La littérature reliée aux micropuces à ADN a connu une expansion phénoménale depuis les dernières années. À ce jour, plus de 20 000 publications traitant de profils d'expression génique sont répertoriés sur la base de donnée PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). La quantité d'information génomique mise à la disposition de la communauté scientifique est vaste.

**6.1.1 Limitations rencontrées lors des méta-analyses**

La ré-analyse des données disponibles pour la communauté scientifique, leur association et/ou comparaison avec celles obtenues dans diverses études antérieures peuvent paraître simplistes. Cependant, différentes contraintes s'imposent lors de l'exécution de ce type d'analyse. La première difficulté se situe au niveau de l'accessibilité des données publiées. En fait, de façon générale, les résultats de micropuces à ADN apparaissent en tant que données supplémentaires aux publications ou encore sur des sites propres à chaque laboratoire. L'accès à l'information génomique reste ardue vu l'absence d'emplacement unique regroupant tous les résultats générés. Récemment, différentes bases de données ont été mises en place afin de répondre à cette lacune (ex. [346]). Par contre, ces dernières ne fournissent pas nécessairement les données expérimentales, biologiques ou cliniques rattachées aux échantillons, ce qui entrave l'exploitation maximale de l'information disponible. Aussi, l'évaluation de la qualité des données de la micropuce revient à l'expérimentateur (revu dans [347]). Une autre limitation aux méta-analyses demeure l'accès aux résultats bruts, donc à l'image de la micropuce, qui est primordial pour uniformiser l'intégration et la normalisation des données.

De plus, lors de l'exécution d'une comparaison des gènes candidats sélectionnés et/ou pointés par les auteurs de publications, d'autres contraintes surgissent. Celles-ci

s'initient par un manque possible de comparabilité lorsque les études sont effectuées dans des laboratoires distincts (revu dans [347, 348]). Cette limitation peut être due en partie à l'utilisation de diverses plateformes ou de différentes générations de micropuces entraînant la génération de faux-positifs et de faux-négatifs qui peuvent être reliés à une différence de représentativité des candidats sur les micropuces. Cette lacune de comparabilité peut également être le reflet de l'utilisation de sources d'ARN distinctes, d'outils d'analyses différents, d'erreurs de séquences sur les sondes de même que la sensibilité et la spécificité variable des sondes utilisées (revu dans [347, 348]). De plus, la comparaison des candidats est compromise par un manque de procédures et/ou de critères clairs requis lors de la publication de données. C'est d'ailleurs par la nécessité d'obtention d'un bassin de données consistant et fiable provenant de divers laboratoires que les critères d'information minimale sur les micropuces à ADN sont nés (minimal information about microarray experiment MIAME) (Tableau 2) [349].

Éléments critiques compris dans les MIAME	
1	Les données brutes de chaque hybridations (ex. fichiers .CEL ou .GPR)
2	Les données finales (normalisées), reliées aux hybridations utilisées pour l'étude décrite
3	Les annotations essentielles des échantillons incluant les facteurs expérimentaux et leurs valeurs (ex. composé et dose administrée)
4	La procédure expérimentale incluant la relation entre les données (ex. correspondance entre le fichier de données et l'échantillon, hybridation primaire ou réplicat)
5	Annotations suffisantes de la micropuce (ex. identificateur génique, coordonnées génomiques, séquences de sondes ou numéro de référence commercial de la micropuce)
6	Les données essentielles des protocoles expérimentaux et des manipulations des données (ex. méthode de normalisation utilisée)

**Tableau 2 Éléments critiques identifiés dans les critères d'information minimale sur les micropuces à ADN (MIAME) (adapté de [349])**

Bien que ces directives aient été décrites, une large proportion des études publiées n'adressent pas tous ces critères rendant la comparaison des candidats sélectionnés possible, bien que moins efficace.

### 6.1.2 Comparaison des études LMP-TOV

Au moment de la soumission du manuscrit présenté au Chapitre II, aucune étude ne présentait des analyses comparant les tumeurs LMP aux TOV. Nous avons alors confronté nos candidats à ceux sélectionnés suite à des analyses comparant les NOV aux TOV ou encore, à des études comparant les divers grades tumoraux. Depuis lors, un nombre limité d'études se sont concentrées sur le sujet et seront décrites dans les paragraphes subséquents.

Dans la première étude, le groupe de Warrenfeltz *et al.* a utilisé la micropuce U95Av2 d'Affymetrix afin de comparer les tissus tumoraux de quatre BOV séreuses, quatre LMP dont deux séreuses et deux mucineuses et cinq TOV séreuses [212]. Par une analyse de S2N, les auteurs ont identifié 10 gènes spécifiques à chacun des trois groupes de tumeurs découverts par HC et SOM (30 gènes au total), dont cinq ont également été identifiés dans nos analyses (Table 3).

Puis, par une méthode supervisée d'ANOVA, 163 gènes distinguant les BOV, LMP et TOV ont été identifiés et classifiés par HC selon leur modulation d'expression (haut dans un groupe, bas dans les deux autres et *vice versa*). Parmi les cinq candidats spécifiques aux LMP, seul le *PAEP* était commun entre nos deux études et présentait une expression accrue dans les LMP. L'expression de ce dernier a également été évaluée au niveau protéique par immunohistochimie (IHC) (Chapitre III) où cette fois, une surexpression au niveau des TOV de G2 et G3 a été montrée, en accord avec les propriétés immunosuppressives et angiogéniques du Paep [350]. L'incongruité entre les niveaux de l'ARN et de la protéine est connue et peut être expliquée par les différences dans la stabilité de l'ARN ou de la protéine, mais également dans la vitesse de traduction du transcrite en protéine.

Finalement, parmi les 15 gènes les plus différentiellement exprimés entre les trois classes de tumeurs, cinq étaient communs aux nôtres. Cependant, les deux gènes, sélectionnés à l'aide du système modèle de la culture primaire (*FLIP* et *WASF3*), présentent une expression opposée à celle obtenue par ce groupe de chercheurs. (Tableau 3). Par contre, lors de l'étude présentée au Chapitre II, une comparaison croisée entre la culture primaire et le tissu tumoral avait été effectuée. De façon générale, l'expression des gènes sélectionnés par un système modèle se reflétait dans l'autre. Cependant, un faible nombre de gènes, incluant *FLIP*, montraient une expression opposée. De ce fait, la non-concordance des expressions entre les deux présentes études ne pourrait être reliée qu'au système modèle utilisé.

Etude	Échantillons	Analyse	Liste des candidats	Symbole du gène	Nom du gène	Système modèle*	Expression en TOV**
Warrenfeltz et al., Affymetrix U95Av2, 12 500 sondes	4 BOV - 4 LMP - 5 TOV	SZN	10 sondes spécifiques à chaque classe	NP2, NPTX2	Human neuronal pentrax II (NPTX2) gene	TT	faible faible
				SCYB10, CXCL10, INP10, MOB1	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 10	TT	forte forte
				PRAME, MAPE, OIP4	preferentially expressed antigen in melanoma	TT	forte forte
				FOLR1, FBP, FOLR, MOV18	folate receptor 1 (adult)	TT	forte forte
				CCNB1, CCNB	cyclin B1	TT	forte forte
		ANOVA	163 sondes sélectionnés, 15 sondes les plus distinctives	CFLAR, FLIP, I-FLICE, CASPER, FLAME1, CASH, CLARP, MRIT	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	PC	faible forte
				UBCH10, UBE2C	ubiquitin carrier protein E2-C	TT	forte forte
				FOXM1, FKHL16, HFH11	forkhead box M1	TT	forte forte
				FEN1, MF1	flap structure-specific endonuclease 1	TT	forte forte
				WASF3, WAVE3, SCAR3	WAS protein family, member 3	PC	forte faible
			40 sondes, BOV > LMP > TOV	WASF3, WAVE3, SCAR3	WAS protein family, member 3	PC	forte faible
				TCEA1, TCEA, TF25	transcription elongation factor A (SII), 1	TT	forte faible, légèrement
				CIRBP, CIRP	cold inducible RNA-binding protein	TT	faible faible
			13 sondes, BOV et LMP > TOV	IGFBP4, IBP4	insulin-like growth factor-binding protein 4	TT	faible faible
				IGFBP7, MAC25	insulin-like growth factor binding protein 7	PC	faible faible
			13 sondes, LMP et TOV > BOV	GALE	galactose-4-epimerase, UDP-	PC	forte =
				IL4R, IL4RA	interleukin 4 receptor	PC	faible faible
			5 sondes, LMP > BOV et TOV	PAEP PP14 GdA GdS	progesterone-associated endometrial protein	TT	faible faible

\* Système modèle utilisé dans notre étude

\*\* La première ligne décrit les résultats présentés dans notre étude

**Tableau 3 Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude présentée par Warrenfeltz *et al.***

Dans la deuxième étude, celle de Meinhold-Heerlein *et al.*, la micropuce U95Av2 d’Affymetrix a également été utilisée pour déterminer le profil d’expression génique de 57 tissus tumoraux composés de huit LMP, sept TOV de G1, 17 TOV de G2 et 20 TOV de G3 [351]. Par une analyse non-supervisée, les auteurs ont montré la présence de deux branches principales : la première contient la majeure partie des LMP alors que l’autre contient les TOV. Ensuite, par une étude supervisée de S2N, 100 gènes ont montré une expression différentielle entre les LMP-TOV de G1 et celle des TOV de G2-G3. Parmi les 40 candidats pointés par les auteurs, 11 étaient inclus parmi nos candidats les plus distinctifs entre les LMP et les TOV de G3 (Tableau 4). Les auteurs ont également effectué des analyses de ratio en comparant indépendamment les LMP et les TOV de G3 à des NOV. Parmi les gènes obtenus près de la moitié d’entre eux (448 gènes) s’entrecoupaient entre les deux comparaisons. Malheureusement, de ces analyses, les auteurs ne pointent que neuf gènes, dont la moitié se retrouve également parmi nos gènes candidats.

Étude	Échantillons	Analyse	Liste de candidats	Symbole du gène	Nom du gène	Système modèle*	Expression en TOV*
Meinhold-Heerlein et al., Affymetrix U95Av2, 12.500 sondes	8 LMP - 7 G1 - 17 G2 - 20 G3	S2N	100 sondes sélectionnés, 20 sondes ciblées, LMP-G1 > G2-G3	S100A10, CALIL, CLP11, ANX2LG, CHAIN, P11	S100 calcium-binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	PC	forte faible
				CDKN1A, P21, CIPI, WAF1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	TT	faible faible
				TSPAN-3, TM4SF	tetraspan 3	PC	forte faible
				CIRBP, CIRP	cold inducible RNA-binding protein	TT	faible faible
			20 sondes, G2-G3 > LMP-G1	RAD21, HR21, SCC1, NXP1, KIAA0078	RAD21 (S. pombe) homolog	TT	forte forte
				RHEB2, RHEB	Ras homolog enriched in brain 2	TT	forte forte
				PCCB	Human propionyl-CoA carboxylase beta-subunit (beta-PCC) gene, partial cds (mutant delta-ATC).	TT	forte forte
				SNRPB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	TT	forte forte
				TUBA1	Tubulin, Alpha 1, Isoform 44	TT	forte forte
				ISGF3G, IRF9, P48, ISGF3	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma (48kD)	TT	forte forte
		Ratio d'expression et test de T	Comparaison OSE-LMP et OSE-G3	UBCH10, UBE2C	ubiquitin carrier protein E2-C	TT	forte forte
				Ga733	Human (clone 21726) carcinoma-associated antigen GA733-2 (GA733-2) mRNA	TT	forte forte
				CD9, MIC3	CD9 antigen (p24)	TT	forte forte
				KRT8, KRT18, K18, CYK18	keratin 8 keratin 18	PC	forte forte forte forte

\* Système modèle utilisé dans notre étude

\*\* La première ligne décrit les résultats présentés dans notre étude

**Tableau 4 Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l’étude présentée par Meinhold-Heerlein *et al.***

De façon intéressante, le groupe de Meinhold-Heerlein a fait un parallèle entre leurs résultats et ceux de Rhodes *et al.* qui présentaient une méta-signature de 69 gènes spécifiques aux cancers humains pauvrement différenciés du poumon, de la vessie, du sein, de la prostate, de l'ovaire et des cellules gliales [352]. Meinhold-Heerlein *et al.* constatent que 67 gènes parmi les 69 identifiés auraient pu être découverts par leur étude et que plusieurs d'entre eux concordent avec les gènes signatures des TOV de G2 et G3. Dans notre cas, parmi les 66 gènes signatures présents sur notre micropuce, 57 démontraient une expression différentielle entre les LMP et les TOV. Pour les neuf gènes restant cinq n'avaient aucun signal spécifique alors que pour les quatre autres, aucune différence d'expression n'a été observée (Tableau 5). Par contre, seuls 21 des gènes signatures pointés par Rhodes *et al.*, ont été identifiés parmi les plus distinctifs entre les LMP et les TOV de G3 (Tableau 5).

Étude	Échantillons	Analyse	Liste de candidats	Symbole du gène	Nom du gène	Système modèle*	Expression en TOV*
Rhodes et al. Méta-signature de cancers indifférenciés, micropuces à ADNc à oligonucléotides (Affymetrix)	Comparaison de tumeurs différenciées et indifférenciées provenant de divers cancers : poumon, vessie, sein, gliome, ovaire et prostate	Test de T, couplé à des permutations	Méta-signature des cancers indifférenciés, 68 gènes sélectionnés dont 23 dans les tumeurs ovariennes	**DPM1, MPDS	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit	TT	forte
				KIAA0101	KIAA0101 gene product	TT	forte
				**RAD21, HR21, SCC1, NXP1, KIAA0078	RAD21 (S. pombe) homolog	TT	forte
				KIAA0175	KIAA0175 gene product	TT	forte
				**NSEP1 YB1 DBPB	nuclease sensitive element binding protein 1	TT	forte
				IFI30, GILT	interferon, gamma-inducible protein 30	TT	forte
				CDKN3, CDH1	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	TT	forte
				CCT6A, CCT6, TCP20, HTR3	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	TT	forte
				PCNA	proliferating cell nuclear antigen	TT	forte
				CCNB1, CCNB	cyclin B1	TT	forte
				H2AFZ	H2A histone family, member Z	TT	forte
				**GGH	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, foylpolypolyglutamyl hydrolase)	PC	forte
				**UBCH10, UBE2C	ubiquitin carrier protein E2-C	TT	forte
				FOXM1, FKHL16, HFH11	forkhead box M1	TT	forte
				**POH1, PAD1	26S proteasome-associated pad1 homolog	TT	forte
				**TRIP13, 16E1BP	thyroid hormone receptor interactor 13	TT	forte
				**CKS1	CDC28 protein kinase 1	TT	forte
				CKS2	CDC28 protein kinase 2	PC	forte
				MCM3, RLF3	minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 3	TT	forte
				HMG2, HMGB2	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2	TT	forte
				**POLR2K, RPB12	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K (7.0kD)	TT	forte

\* Système modèle utilisé dans notre étude

\*\* La première ligne décrit les résultats présentés dans notre étude

\*\* Gènes sélectionnés dans les tumeurs ovariennes

### Tableau 5 Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude présentée par Rhodes *et al.*

Dans la troisième étude, Gilks *et al.* ont utilisé des micropuces à ADN comprenant 28 000 sondes d'ADNc afin de comparer l'expression génique des tissus tumoraux de 10 LMP et de 13 TOV (un de G1, six de G2 et six de G3) [353]. Par une analyse non-supervisée de HC, les auteurs ont obtenu deux branches principales, dont la première contenait tous les LMP et la seconde, les TOV. À l'aide d'une analyse supervisée de SAM, l'expression de 217 sondes étaient significativement distinctes entre les LMP et les TOV. Parmi celles-ci, les auteurs présentent 26 gènes parmi lesquels se retrouvent six de nos candidats. Les auteurs ont également effectué une analyse de



SAM sur les 38 sondes représentant des gènes impliqués dans l'EOC ou dans la prolifération cellulaire dont trois étaient inclus parmi nos candidats. Des études d'IHC sur micro-étalage de tissus contenant 145 TOV et 59 LMP ont également été effectuées pour évaluer l'expression de *Ccne1*, *Krt7*, *Muc1* et *ApoJ*. Les résultats obtenus pour l'expression de la *Ccne1* concordent avec ceux que nous avons obtenus lors d'analyses similaires présentées aux chapitre II et III de cette thèse.

Étude	Échantillons	Analyse	Liste de candidats	Symbole du gène	Nom du gène	Système modèle*	Expression en TOV*
Gilks <i>et al.</i> , Micropuce à ADNc, 43 200 sondes	10 LMP - 1 G1 - 6 G2 - 6 G3	SAM	217 sondes sélectionnées, 26 sondes ciblées	IGFBP7, MAC25	insulin-like growth factor binding protein 7	PC	faible
				ITGA3, CD49C, GAB3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	PC	faible
				ANXA8, ANX8	annexin A8	PC	forte
				JUNB	jun B proto-oncogene	PC	faible
				KRT19, K19	keratin 19	PC	forte
				KLK3, PSA, APS	kallikrein 3, (prostate specific antigen)	PC	faible
			liste de gènes connus dans l'ovaire, 38 sondes sélectionnées	KRT7, SCL	keratin 7	PC	forte
				CCNE1	cyclin E1	PC, TT	forte
				AKT2, PKBB	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	PC	forte

\* Système modèle utilisé dans notre étude

\*\* La première ligne décrit les résultats présentés dans notre étude

**Tableau 6 Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude présentée par Gilks *et al.***

Enfin, Bonome *et al.* ont évalué les profils d'expression génique des tissus tumoraux à l'aide de micropuces U133 Plus 2.2 de Affymetrix qui contiennent 47 000 sondes. Leur échantillonnage était composé de tumeurs séreuses micro-disséquées provenant de 20 LMP, six TOV de G1, 54 TOV de G3 de même que 10 échantillons d'OSE, obtenus suite à un broyage de la surface d'ovaires normaux. Une première analyse non-supervisée de HC, effectuée sur 10 NOV et 66 tumeurs malignes constituées de LMP et de TOV de haut grade présenté à un stade avancé montre deux branches majeures qui séparent d'un côté les LMP et les NOV puis de l'autre, les TOV. La première branche se subdivise en NOV et en LMP tandis que la seconde définit deux groupes de TOV. En utilisant un test de permutations, les auteurs ont sélectionné des

gènes différentiellement exprimés entre les NOV et les LMP (2256 gènes) puis, entre les NOV et les TOV de haut grade et stade avancé (3399 gènes). Suite à des analyses subséquentes comparant les NOV aux tumeurs malignes, les auteurs ont raffiné les gènes candidats afin d'obtenir des gènes spécifiques aux LMP (773 gènes) et aux TOV de haut grade (1755). De ces comparaisons, Bonome *et al.* ne pointent que 13 gènes uniques aux LMP dont la fonction est d'inhiber la progression tumorale et la formation de métastases. Parmi ces derniers se retrouvent sept de nos candidats (Tableau 7).

Étude	Échantillons	Analyse	Liste de candidats	Symbole du gène	Nom du gène	Système modèle*	Expression en TOV*
Bonome et al., Affymetrix U133 Plus 2, 47 000 sondes	10 NOV - 20 LMP - 46 TOV	GO	Gènes reliés à la prolifération cellulaire parmi les 1755 sondes spécifiques aux TOV de haut grade et les 773 sondes spécifiques aux LMP	E2F3	E2F transcription factor 3	TT	forte forte
				CCNB1, CCNB	cyclin B1	TT	forte forte
				CCNE1	cyclin E1	TT	forte forte
				RFC4	replication factor C (activator 1) 4 (37kD)	TT	forte forte
				FEN1, MF1	flap structure-specific endonuclease 1	TT	forte forte
				PCNA	proliferating cell nuclear antigen	TT	forte forte
				CDKN1A, P21, CIP1, WAF1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	TT	faible faible

\* Système modèle utilisé dans notre étude

\*\* La première ligne décrit les résultats présentés dans notre étude

**Tableau 7 Description et expression des gènes sélectionnés lors des analyses présentées au chapitre II et communs à ceux identifiés dans l'étude présentée par Bonome *et al.***

Par une seconde analyse non supervisée de HC, effectuée sur les NOV, les LMP et, cette fois-ci, sur les TOV de tous les grades et stades confondus, deux branches principales se dessinent encore. La première contient les NOV d'un côté et les LMP-

TOV de bas grade de l'autre. La seconde branche contient, quant à elle, les TOV de haut grade. Les auteurs ont également comparé les NOV aux TOV de bas grade (888 gènes) et à ceux de haut grade et de stade précoce (1644 gènes). Cette étude présente plus de 4500 sondes significativement distinctes suite aux analyses statistiques, ce qui nous donne un profil global de l'expression génique. Cependant, ceci ne nous permet pas de cibler précisément les gènes les plus distinctifs, et donc d'en faire la comparaison avec les candidats identifiés par d'autres études.

### 6.1.3 Ontologie des gènes modulés entre les LMP et les TOV

Suite à une analyse de l'ontologie des gènes sélectionnés, chaque étude présentée ci-dessus a mis en évidence certains processus dont la modulation s'effectue de façon distincte entre les LMP et les TOV. Meinhold-Heerlein *et al.*, ont noté que les gènes ribosomiaux favorisaient la séparation des LMP et des TOV. Cette observation était en accord avec leur étude antérieure selon laquelle une forte expression des gènes ribosomiaux étaient typiquement associée aux tumeurs bien différenciées. Dans notre étude, quelques gènes ribosomiaux ont été identifiés en tant que gènes distinctifs des LMP et des TOV de G3 [354]. Parmi les 10 gènes ribosomiaux sélectionnés lors de nos analyses sur le tissu tumoral, huit montraient une surexpression dans les LMP (*RPL9*, *RPL10A*, *RPL12*, *RPL13*, *RPL41*, *RPS24*, *RPS28*, *RPS29*). Contrairement à nous, ces auteurs ont également observé une surexpression des gènes impliqués dans la voie de signalisation cellulaire de Jak/Stat. De leur côté, Gilks *et al.* ont pointé les gènes reliés aux immunoglobulines et l'expression de ces derniers concorde avec nos observations pour six gènes sur huit. Parmi les fonctions biologiques majeures identifiées comme étant surexprimées dans les LMP par le groupe de Warrenfeltz *et al.*, se retrouvent la liaison au calcium, l'adhésion cellulaire et la régulation négative de la prolifération cellulaire. Des gènes reliés à ces fonctions faisaient également parti de nos candidats et comportaient respectivement 18, neuf et six gènes.

## 6.2 L'UTILISATION SECONDAIRE DES RÉSULTATS DE MICROPUCES À ADN

En plus de servir à mettre en lumière des profils d'expression différentielle des gènes, les analyses de micropuces à ADN constituent un outil de criblage puissant. D'ailleurs, plusieurs groupes de chercheurs, selon une aspiration de recherche biologique ou encore translationnelle, évaluent le rôle des candidats pointés par cette technique dans la tumorigenèse ovarienne. Ce type de recherche consiste au transfert des connaissances acquises au niveau fondamental vers celui de la clinique. Par cette approche, les chercheurs tentent d'identifier des marqueurs qui pourraient servir au diagnostic précoce de l'EOC (ex. [355-359]), au raffinement de la caractérisation de la tumeur selon l'histopathologie [25, 339, 340] ou du grade tumoral [212, 351, 353, 360], à la définition du pronostic des patientes [361-364], à l'évaluation de la réponse aux traitements de chimiothérapie [364-370] et ultimement à l'identification de cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de l'EOC.

Afin d'évaluer le potentiel de certains gènes parmi les plus distinctifs des LMP et des TOV de G3 en tant que marqueurs cliniques de l'EOC, deux démarches ont été utilisées. La première approche est effectuée sur une base individuelle (Chapitre III), où les candidats choisis présentent une fonction biologique intéressante ou encore connue dans le cancer [361]. La deuxième approche consiste en l'identification de marqueurs selon une voie ou un complexe de signalisation modulé différemment entre les deux types de tumeurs (Chapitre IV et V) [371, 372]. Puisqu'aucun logiciel d'analyse de voies de signalisation n'était à ma disposition lors de l'initiation de ce projet, les seuls outils utilisés étaient ceux retrouvés via internet dont l'Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), disponible dans le portail du National Center for Biotechnology Information (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), l'outil d'annotation DAVID ([david.abcc.ncifcrf.gov](http://david.abcc.ncifcrf.gov)) et les sites fournissant des schémas de voies de signalisation ([www.biocarta.com](http://www.biocarta.com), [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com) et [www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html](http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html)).

Après avoir revu les fonctions de chacun des candidats, plusieurs membres du complexe Set (Chapitre IV) et de l'apoptose induite par Trail (Chapitre V) se sont avérés être modulés. Puisque cette deuxième approche se voulait plus globale, nous avons évalué l'expression de la totalité ou d'une portion des joueurs clés de ces voies même si certains d'entre eux n'avaient pas été identifiés lors des analyses de micropuces à ADN. Nous avons donc déterminé, dans un premier temps, l'expression protéique des membres du complexe Set (Nm23, Set, pp32, Hmgb2 et Ape1) [371]. Par la suite, nous avons procédé à l'évaluation de l'expression de Trail, de même que celle de certaines protéines en aval (Cyc, Flip, Casp8) ayant montré une expression différentielle au niveau de l'ARN par micropuce [372]. Puisque Trail effectue son signallement via ses récepteurs, nous avons également analysé leur expression en plus d'évaluer l'activation de l'effecteur caspase-3, qui dicte l'effet quasi-final de la voie. L'approche globale s'est avérée utile puisque malgré le fait que la micropuce n'ait pas permis de détecter de signal pour pp32 ou encore pour certains récepteurs de Trail, des différences d'expression protéique ont été obtenues en fonction du grade tumoral et/ou de la survie des patientes (Chapitre IV et V).

### **6.2.1 Étude de marqueurs de différenciation tumorale**

Un des objectifs de mon projet de doctorat était de déterminer si certains candidats sélectionnés à l'aide des micropuces à ADN pouvaient nous renseigner sur la tumorigenèse ovarienne. Bien qu'il ne semble pas y avoir nécessairement une progression entre les divers grades tumoraux, puisque certaines tumeurs de G0 ou G1 peuvent se présenter à un stade avancé et qu'à l'opposée des tumeurs de G2 ou G3 peuvent être diagnostiquées lorsqu'elles sont confinées à l'ovaire, la différence d'expression protéique peut tout de même nous éclairer sur les facteurs impliqués dans l'EOC. D'ailleurs, les différences dans l'agressivité qui existent entre les divers grades démontrent l'intérêt de leur étude.

L'évaluation de l'expression protéique des candidats a été effectuée par IHC puisque, dans une optique de recherche translationnelle, nous devons utiliser une technique couramment utilisée en clinique. De ce fait, la sélection des candidats a été restreinte à ceux pour lesquels des anticorps commerciaux étaient développés et qui reconnaissaient les épitopes protéiques malgré la fixation et l'enrobage en paraffine des tissus utilisés. Initialement, nous avons évalué l'expression protéique de quelques candidats sur des sections entières de tissus tumoraux provenant de 12 LMP et 12 TOV dont certains résultats sont inclus dans le Chapitre II de cette thèse. Toutefois, cette méthode s'est avérée non-optimale pour l'analyse de plusieurs tumeurs puisqu'elle était dépendante, en temps, en argent, de même qu'en matériel biologique en plus de favoriser les variations techniques. Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation de microétagages de tissus ovariens qui consistent à prélever quelques carottes d'un bloc de tissu enrobé de paraffine pour ensuite les transférer dans un nouveau bloc de paraffine vierge. De cette façon, des centaines d'échantillons peuvent être analysés simultanément.

Les observations faites par IHC concordent avec celles faites au niveau de la micropuce à ADN. En fait, nous avons pu constater que les différences d'expression sont plus marquées entre les grades les plus éloignés, tandis qu'elles sont plus subtiles ou absentes lorsqu'il s'agit de définir les grades rapprochés G0-G1 et G2-G3. D'ailleurs, parmi les 22 candidats étudiés, seuls Ran, Ccne1 (Chapitre III), Set, Ape1 (Chapitre IV) Trail et Flip (Chapitre V) ont montré une différence d'expression entre les LMP et les G1. Aussi, Paep, (Chapitre III), Hmgb2 (Chapitre IV), Trail, Dr4 et DcR1 (Chapitre V) sont ceux qui s'expriment différemment entre les G2 et les G3.

Encore aujourd'hui, l'intérêt clinique de distinguer les tumeurs LMP des TOV de G1 persiste puisque seul la présence d'invasion permet leur distinction. Ceci amène des lacunes dans la reproductibilité du diagnostic et provoque un impact thérapeutique important tant sur le plan chirurgical que sur celui des traitements adjuvants administrés à la patiente. La découverte de marqueurs dont les expressions seraient

spécifiques à chacune de ces classes tumorales permettrait le raffinement de leur diagnostic et de ce fait, la prise en charge de la patiente. Le faible échantillonnage de tumeurs de G1 dans les présentes études (Chapitre III, IV et V), nous a incité à élaborer un micro-étalage de tumeurs séreuses BOV, LMP et de G1, cernant du coup, les deux contreparties bénignes et invasives des LMP. Aussi, dans la classe des LMP, nous avons pu obtenir des tumeurs typiques, micro-envahissantes, MPSC de même que des tumeurs associées ou non avec des implants de nature invasive ou non-invasive. Vu la rareté des échantillons LMP et TOV de G1, l'augmentation de l'échantillonnage a été permise grâce aux banques de tissus des chercheurs membres du Réseau de la Recherche sur le cancer du FRSQ. Les analyses statistiques, qui sont présentement en cours, détermineront si les protéines Ran, Ccne1, Set, Ape1, Trail et Flip présentent toujours une différence statistiquement significative dans leur expression entre les LMP et les TOV de G1 en plus d'évaluer leur expression en BOV (Ouellet V, *et al.* résultats non-publiés). Une différence d'expression significative pourrait permettre l'utilisation de ces protéines seules ou en combinaison avec d'autres afin de raffiner la définition des types de tumeurs et favoriser leur classification adéquate menant à un traitement plus approprié pour les patientes.

### **6.2.2 Étude de marqueurs pronostiques**

Malgré l'absence d'uniformité dans le comportement des TOV, les patientes qui les développent sont pratiquement toutes traitées de la même façon. La découverte de marqueurs reliés à l'agressivité de la tumeur, à sa réponse aux traitements de chimiothérapie ou encore au pronostic de la patiente permettrait une stratification plus fine des patientes et donc une administration de soins plus appropriée pour chacune d'entre elles. Par exemple, les patientes ayant un profil typique pourraient recevoir un traitement conventionnel de chirurgie et de chimiothérapie tandis que celles dont le destin est plus sombre pourraient bénéficier d'une chimiothérapie plus agressive par voie intra-péritonéale, un enrôlement dans un protocole de recherche ou encore, l'administration d'un traitement palliatif.

En plus de présenter un niveau de différenciation opposé, les LMP et les TOV de G3 confèrent aux patientes qui les développent, des survies tout aussi opposées. De ce fait, certains candidats différentiellement exprimés entre ces deux classes pourraient être indicateurs du pronostic des patientes. Leur incorporation dans le nomogramme des patientes pourrait favoriser une meilleure stratification et prise en charge des patientes aux prises avec des TOV. Nous avons effectivement constaté que l'expression protéique de Ran, Cdc20, Cks1 (Chapitre III) et Dr5 (Chapitre V) était reliée à la survie des patientes avec l'EOC. Un fait intéressant à noter est que Dr5 n'aurait pu être identifiés à l'aide de nos études de micropuces à ADN puisqu'aucune sonde ne lui était spécifique sur la génération utilisée (HuFL). Cette observation montre l'intérêt de l'analyse globale par voie ou complexe de signalisation qui permet d'évaluer l'expression de divers membres et ce, malgré le fait que ces derniers ne soient pas identifiés initialement lors des analyses de micropuces à ADN. D'ailleurs, en plus de relier l'expression des récepteurs de Trail au grade tumoral, l'association de Dr5 avec le pronostic des patients a été montrée.

Globalement, parmi toutes les protéines étudiées, Ran semble la plus prometteuse en vue d'une utilisation en tant que marqueur clinique de l'EOC. En effet, Ran surpasse ses compères tant en sensibilité qu'en spécificité pour stratifier les patientes de bon et de mauvais pronostic (Chapitre III). D'ailleurs, l'expression de cette protéine discrimine également les patientes d'un même grade qui, selon ce critère clinique, auraient une survie équivalente. Toutefois, bien que supérieurs aux autres, les niveaux de sensibilité et de spécificité associés à Ran n'atteignent pas les valeurs adéquates pour son utilisation en tant que marqueur unique du pronostic des patientes avec l'EOC. En fait, lorsqu'un marqueur est sensible, son expression permet de cibler les patientes de mauvais pronostic et lorsqu'il est spécifique, son expression distingue les patientes de bon pronostic. Dans une optique d'utilisation clinique, les niveaux de ces critères doivent être élevés puisqu'un marqueur atteignant 90% de sensibilité et 90% de spécificité entraînerait le traitement non-optimal de 20 patientes sur 100. En fait, 10 seraient traitées de façon trop intensive et 10 le serait de manière trop

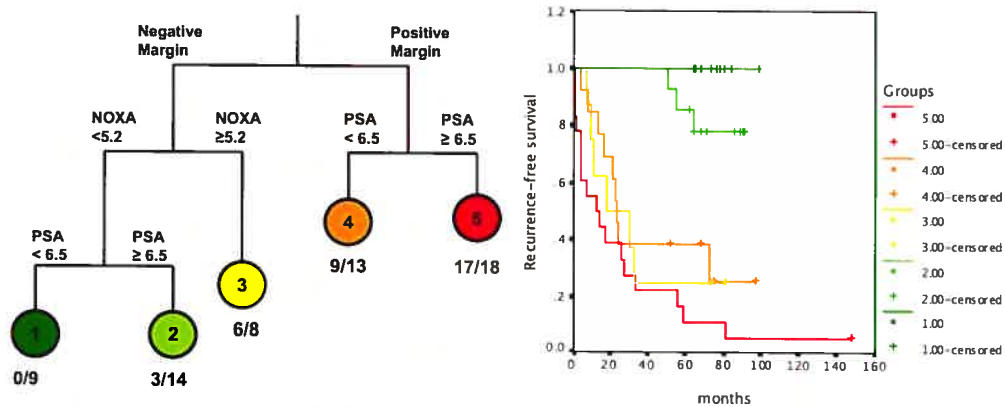


conservative. Cependant, il est bien connu que l'augmentation de la sensibilité du marqueur se fait au détriment de la spécificité et *vice versa*.

En EOC, comme dans divers cancers, l'utilisation d'un marqueur unique définissant le pronostic des patientes semble utopique. En fait, les chercheurs et cliniciens tendent vers une approche de combinaison de marqueurs cliniques (ex. stade et tumeur résiduelle) et biologiques (ex. expression protéique) afin d'établir un nomogramme de stratification des patientes. C'est d'ailleurs dans cette optique que nous avons combiné les protéines des voies ou complexes en paire. Cet exercice a permis de faire ressortir des combinaisons de protéines ayant une valeur pronostique significative alors qu'individuellement, ces protéines, ne présentaient aucune association avec le pronostic des patientes (Chapitre IV et V). Il est à noter cependant que les courbes de survie obtenues suite à la combinaison de marqueurs n'étaient pas aussi intéressantes que celles dessinées avec le marqueur unique Ran.

Malgré le fait que la combinaison de marqueurs soit intéressante pour découvrir des indicateurs de survie, elle n'est pas sans faille. En fait, puisqu'il existe quatre types d'expression de protéines combinées possibles (forte/forte, faible/faible, forte/faible et faible/forte), le nombre de patientes inclus dans chacun des groupes est plus faible et le pronostic n'est donc défini que pour une portion d'entre elles. De plus, les outils avec lesquels ces analyses de combinaison ont été effectuées rendaient difficile l'analyse simultanée de plus de deux marqueurs. Cependant, un algorithme statistique d'arbre décisionnel peut faciliter l'étude de la combinaison de marqueurs. Ce dernier permet une stratification continue des patientes et permet d'incorporer différents facteurs pronostiques cliniques connus de même que les expression protéiques des marqueurs étudiés afin d'évaluer leur association avec la survie des patientes. Puisqu'il se dessine sous forme d'un arbre, chaque branche consiste au scindement provoqué par l'expression du marqueur, cet algorithme permet une visualisation des meilleures combinaisons de marqueurs (clinique ou biologique) possibles en rejetant celles qui sont non informatives. Cette technique de stratification a récemment été utilisée dans le laboratoire et a démontré son utilité dans une analyse d'IHC sur le cancer de la prostate (Figure 17) [373]. Aussi, que ce soit pour la considération des

coûts entraînés par les différents tests de marqueurs ou pour la qualité de vie de la patiente, la combinaison de marqueurs optimale sera celle qui nécessitera le moins de marqueurs tout en définissant de façon adéquate chacune des patientes atteinte d'EOC.



**Figure 17** Représentation d'un arbre décisionnel associé à une courbe de Kaplan-Meier (tirée de [373])

### 6.3 LA PROLIFÉRATION ET LE CYCLE CELLULAIRE

#### 6.3.1 Observations découlant des études de micropuces à ADN

En comparant chacune des études de micropuces à ADN (Chapitre II et section 6.1.2), nous constatons une prédominance de gènes reliés au cycle et à la prolifération cellulaire. D'ailleurs, malgré leur sélection sur une base individuelle, une vaste partie des protéines étudiées au chapitre II était reliée à ces deux processus (Ccn1, Ran, Cdc20, Cks1, Cas, Mek1, Ahr et Paep). De façon générale, selon les analyses des différents groupes, les gènes qui favorisent la prolifération cellulaire sont surexprimés dans les TOV et ceux qui la régulent ou l'inhibent présentent une expression plus marquée dans les LMP. D'ailleurs, par leurs comparaisons diverses, trois groupes sur

cinq ont sélectionné *UBCH10*, *CCNB1*, *CCNE1* et *CDKN1A* comme gènes distinctifs des LMP et des TOV.

*UBCH10* (*UBE2C*) appartient à la famille de gènes E2 et encode pour une protéine impliquée dans la protéolyse dépendante de l'ubiquitine (voir aussi section 6.3.3.3). Plusieurs analyses de micropuces à ADN ont montré son expression accrue dans divers cancers dont celui du sein, du poumon, de l'ovaire, de la vessie, de la thyroïde, les glioblastome et les cancers oeso-pharyngiens [374, 375]. Sa surexpression peut être la conséquence de l'amplification chromosomique du locus de *UBCH10* (20q13.1), présente dans plusieurs cancers dont celui de l'ovaire. Ubch10 est également impliqué dans la prolifération et la transformation cellulaire [376] et son expression protéique est associée à la différenciation des tumeurs et au pronostic des patientes atteintes d'EOC [377]. Aussi, des études de suppression de l'expression de *UBCH10* montrent une perturbation dans la prolifération des cellules de tumeurs ovariennes et thyroïdiennes [375, 377]. Enfin, Ubch10 facilite, l'ubiquitination de la *CCNB1*, une cycline identifiée elle aussi de façon simultanée par trois des cinq études comparant des LMP et les TOV.

La *Ccnb1* se lie à *Cdk1* et joue un rôle essentiel dans la transition entre les phases G2 et M du cycle cellulaire. Sa surexpression a été notée pour les cancers du poumon [378, 379] et du système gastro-intestinal [380]. Cette cycline est essentielle puisqu'aucune souris homozygote *CCNB1* *-/-* n'a pu être générée à partir de souris hétéozygotes *CCNB1* *+/-* [381].

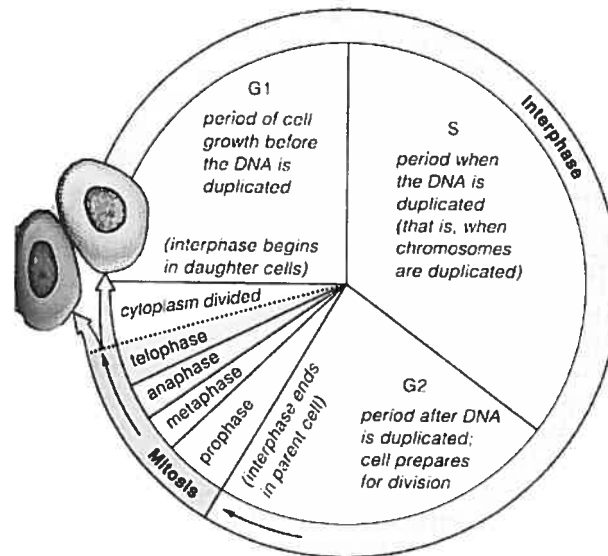
L'autre cycline identifiée simultanément dans trois des cinq analyses comparées (Chapitre II et section 6.1.2), est la *CCNE1*. Cette cycline, qui a été décrite plus en détails au Chapitre II, interagit elle aussi avec les *Cdk1* et *Cdk2* et est essentielle à la progression entre les phases G1 et M. L'augmentation de l'expression de cette cycline chez les TOV peut expliquer l'instabilité chromosomique présente dans ces tumeurs de grade avancé. En effet, il a été démontré que la surexpression constitutive

de la *CCNE1* dans les cellules de rat immortalisées et dans les cellules de cancers épithéliaux résultent en une instabilité chromosomique [382].

Finalement, le dernier candidat commun à trois analyses est la *CDKN1A* (*p21*, *CIP1*, *WAF1*) dont l'expression est diminuée dans les tumeurs invasives ovariennes. Cdkn1A forme des complexe avec les Cycline/Cdk pour inhiber la progression du cycle cellulaire ou encore avec PcnA pour bloquer la synthèse d'ADN [383, 384]. La perte de l'expression de Cdkn1A est inversement proportionnelle au taux d'instabilité génomique présent dans les tumeurs [385, 386]. Cdkn1a est un inhibiteur universel des Cdk et son expression est hautement régulée au niveau transcriptionnel par p53 [387]. L'altération des fonctions de p53 dans différents cancers contribuent en partie à la réduction de l'expression de Cdkn1A [388]. L'expression de Cdkn1A peut également être diminuée en réponse à des événements épigénétiques d'hyperméthylation de son promoteur [386]. Cependant, cette observation n'est pas soutenue par tous les groupes de chercheurs [389, 390].

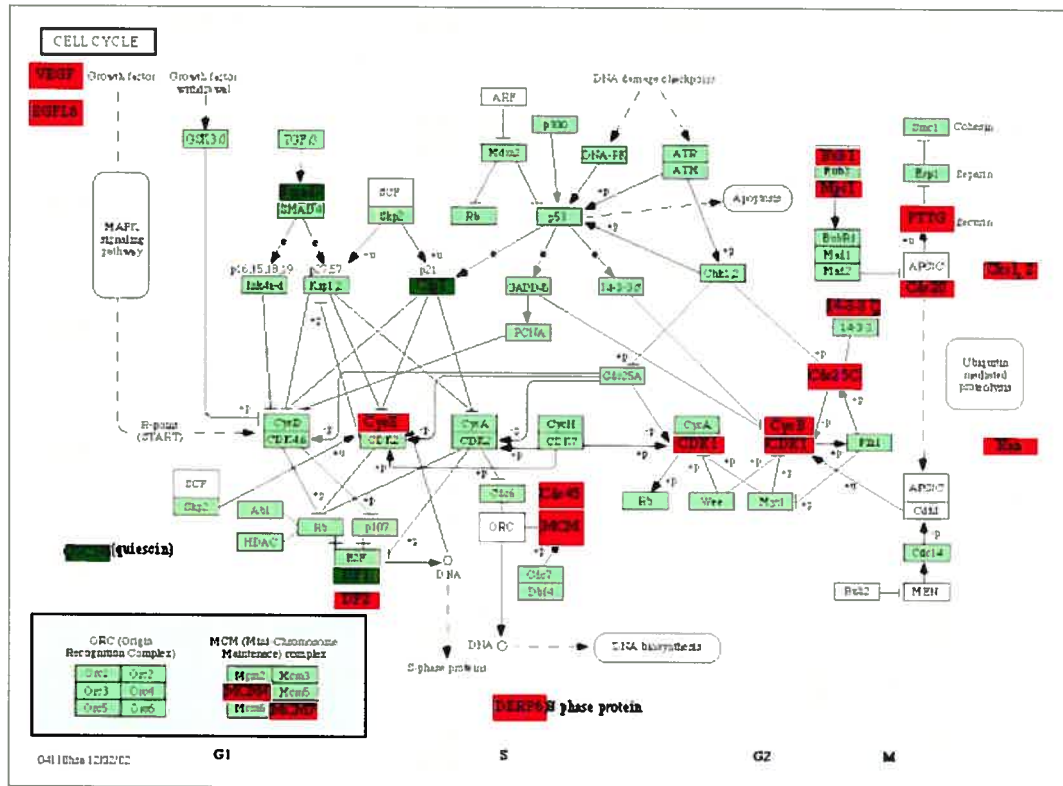
### 6.3.2 Gènes candidats impliqués dans le cycle

La réplication des cellules est un processus hautement contrôlé par différents régulateurs tant positifs que négatifs et se subdivise en quatre phases principales : G1, S, G2 et M (Figure 18). Durant la phase G1, la cellule s'assure que son matériel génétique et les conditions environnantes sont propices à sa réplication. Elle s'apprête également pour la phase S durant laquelle la cellule duplique son génome. Lors de la phase G2, la cellule vérifie et répare les erreurs qui se seraient glissées lors de la réplication de son ADN et prépare la cellule à sa division. Finalement, la phase M consiste en la divisions nucléaire (mitose) et cytoplasmique (cytocinèse) menant à la formation de deux cellules distinctes. Durant la mitose, quatre différentes étapes sont également observées : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.



**Figure 18** Représentation schématique des diverses phases du cycle cellulaire (tirée de <http://ghs.gresham.k12.or.us/science/ps/sci/soph/cells/cycle/cycle.gif>)

Un déséquilibre dans l'expression ou dans le fonctionnement des régulateurs du cycle cellulaire peut entraîner la prolifération incontrôlée des cellules et mener à la formation de tumeurs. D'ailleurs, lors de la comparaison des LMP et des TOV décrite plus tôt (Chapitre II), plusieurs gènes impliqués dans le cycle et la prolifération cellulaire ont été identifiés en tant que gènes distinctifs de ces deux classes tumorales et sont pointés à la Figure 19.



**Figure 19** Représentation schématique des régulateurs du cycle cellulaire présentant une expression plus forte (rouge) ou plus faible (vert foncé) chez les TOV lorsque comparé aux LMP. (adaptée de <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04110.html>)

À première vue, il semble exister une altération accrue des gènes impliqués dans les phases G2 et M. D'ailleurs l'importance de ces deux phases du cycle cellulaire a été mis en évidence dans différentes études en oncologie (Tableau 8). Dans notre étude, l'expression protéique de trois joueurs impliqués dans la phase M (Ran, Cdc20 et Cks1) a montré une association avec le grade tumoral de même qu'avec la survie des patientes et ces résultats ont été discutée au chapitre III.

Gène	Type de cancer	Expression en cancer	Références
ATM, AT1, ATA, ATC, ATD, ATDC, ATE, TEL1, TELO1	sein, ovaire, lymphome, colon	faible	[391-395]
ATR, FRP1, MEC1, SCKL, SCKL1	ovaire	Forte	[360]
CHK1, CHEK1	système gastro-intestinal, endomètre, système immunitaire	faible	[396-399] (ET revu dans [397, 400, 401])
CHK2, CHEK2, CDS1, HuCds1, LFS2, PP1425, RAD53	système immunitaire, sein, poumon, vulve, vessie, ovaire, os	faible	[402-407] (ET revu dans [401])
CDC25B	ovaire, prostate, sein, pancréas, système gastro-intestinal, poumon, thyroïde, système immunitaire, cerveau, endomètre, tête et cou	forte	revu dans [408]
CDC25C	ovaire	forte	revu dans [408]
CCNB1, CCNB	système gastro-intestinal, système immunitaire, poumon, ovaire, vessie, sein, cellules gliales	forte	[212, 360, 378, 380, 409, 410]
CDK1, CDC28A, CDC2	ovaire, poumon, vessie, sein	forte	[360]
MYT1, C20orf36, MTF1, MYTI, PLPB1	NA	NA	NA
PLK1, PLK, STPK13	poumon, système oro-pharyngien, ovaire, système gastro-intestinal, peau, sein, endomètre, cerveau, pancréas, prostate, foie, système immunitaire	forte	revu dans [411]
14-3-3, YWHAQ, 1C5, HS1	ovaire	forte	[340, 360, 412]
BUB1, BUB1A, BUB1L, hBUB1	ovaire, système gastro-intestinal, sein	forte	[360, 413-415]
BUB2, TBC1, TBC, CDC16	système gastro-intestinal, ovaire	forte	[410, 416]
BUB3, BUB3L, hBUB3	système gastro-intestinal, sein	forte	[414, 415]
MPS1	ovaire	forte	[360]
BUBR1, BUB1, BUB1beta, Bub1A, MAD3L, SSK1, hBUBR1	ovaire, système gastro-intestinal, sein, vessie	forte	[413, 415, 417]
MAD1, HsMAD1, MAD1L1, PIG9, TP53I9, TXBP181	sein	forte	[415]
MAD2, HSMAD2, MAD2L1	sein, rétine, vessie, cerveau, poumon	forte	[415, 418]
APC ou ANAPC 1 à 13	NA	NA	NA
UBCH10, UBE2C	Ovaire, poumon, vessie, sein, cellules gliales	forte	[212, 351, 360]
CDC20, CDC20A, p55CDC	poumon, sein, système oro-pharyngien, pancréas, système gastro-intestinal, ovaire, vessie, cellules gliales	forte	[212, 361, 410, 415, 419-422]
CKS1, CKS1B, CKSHS1	ovaire, oral, système urinaire, poumon	forte	[212, 360, 361, 423-427]
CKS2, CKSHS2	foie, oesophage, vessie, poumon, vessie, sein, cellules gliales	forte	[212, 360, 428-430]
PTTG1, EAP1, HPTTG, PTTG, SECURIN, TUTR1	ovaire, poumon, thyroïde, sein, utérus, poumon, système gastro-intestinal	forte	[360, 410] (et revu dans [431])
ESPI, ESP1L1, SEPARIN	NA	NA	NA
SMC1, CDLS2, SMC1, SMC1L1, SMC1alpha, SMCB	NA	NA	NA
CDH1, CDC20C, FZR, FZR1, HCDH, HCDH1	sein	forte	[415]
MEN	NA	NA	NA
CDC14	NA	NA	NA

NA : information non disponible

**Tableau 8**      **Joueurs impliqués dans la transition entre les phases G2 / M du cycle cellulaire modulés dans divers types de cancers**

### 6.3.3 Perspectives fonctionnelles des marqueurs

L'évaluation des niveaux des transcrits par micropuces à ADN et par PCR quantitatif effectuée suite à une transcription inverse de l'ARN (RT-qPCR) de même que l'expression protéique par IHC ont montré des différences d'expression entre les divers grades de tumeurs et la survie des patientes atteintes d'EOC. Toutefois, ces analyses ne permettent pas d'étudier directement leur fonction dans le développement de l'EOC. L'altération de leur expression dans des lignées cellulaires pourrait nous renseigner sur le rôle de ces candidats dans la tumorigenèse ovarienne. La modulation de l'expression peut se faire selon deux approches distinctes. La première est une surexpression du gène qui s'effectue par l'insertion d'un vecteur d'expression comportant la séquence codante du candidat dans une lignée cellulaire ovarienne qui exprime faiblement le gène en question. La seconde est la diminution de l'expression du gène, par une technique de suppression d'expression utilisant des petits ARN en tête d'épingle (shRNA) spécifiques au gène d'intérêt. Ces derniers entraînent la suppression de l'expression de l'ARN ciblé suite à une dégradation par le complexe du RISC (revu dans [432, 433]).

Les différents marqueurs pour lesquels nous étions intéressés à évaluer la fonction présentaient une expression accrue dans les TOV. Vu l'absence de lignée cellulaire LMP séreuses et la fragilité des cultures primaires, la surexpression de ces marqueurs dans les LMP s'avérait quasi impossible. Nous avons donc opté pour la seconde approche soit la suppression de l'expression des candidats dans les lignées cellulaires TOV séreuses qui ont récemment été développées et caractérisées au laboratoire (Ouellet V *et al.*, en préparation).

#### 6.3.3.1 La suppression de l'expression génique

En plus de nous aider à mieux comprendre la tumorigenèse ovarienne, la diminution de l'agressivité des cellules tumorales suite l'inhibition de leur expression soulignerait l'utilisation potentielle de ces gènes en tant que cible thérapeutique



contre l'EOC. Le cheminement vers la découverte de cibles thérapeutiques est fastidieux, mais n'est toutefois pas impossible. En fait, un exemple de l'utilisation d'un marqueur découvert selon son rôle dans la biologie d'une tumeur et qui a par la suite fait son chemin vers la thérapie des patientes est l'ErbB2. En effet, tout est né en 1987 suite à la découverte de l'amplification de ce récepteur à l'EGF chez environ 30% des tumeurs du cancer du sein. Cette amplification conférait aux tumeurs un comportement plus agressif [434]. Un anticorps monoclonal recombinant dirigé contre ErbB2, le trastuzumab, mieux connu maintenant sous le nom d'herceptin (Roche, Suisse), a par la suite été développé au début des années 1990. Son potentiel comme agent anti-néoplasique a ensuite été évalué en tant qu'agent seul ou en combinaison avec d'autres drogues dans diverses études cliniques effectuées sur les patientes présentant une surexpression du récepteur. Depuis 1998, l'herceptin est utilisé à titre de traitement standard pour les patientes affectées d'un cancer du sein surexprimant le récepteur ErbB2 (revu dans [435, 436]). Des essais similaires ont été conduits dans l'EOC mais n'ont pas connu l'effet espéré. Donc, advenant une implication importante dans l'EOC de d'autres protéines ciblées et un effet réduit sur les cellules normales, leur potentiel en tant que cible thérapeutique pourrait être envisagé.

### **6.3.3.2 Étude de Ran**

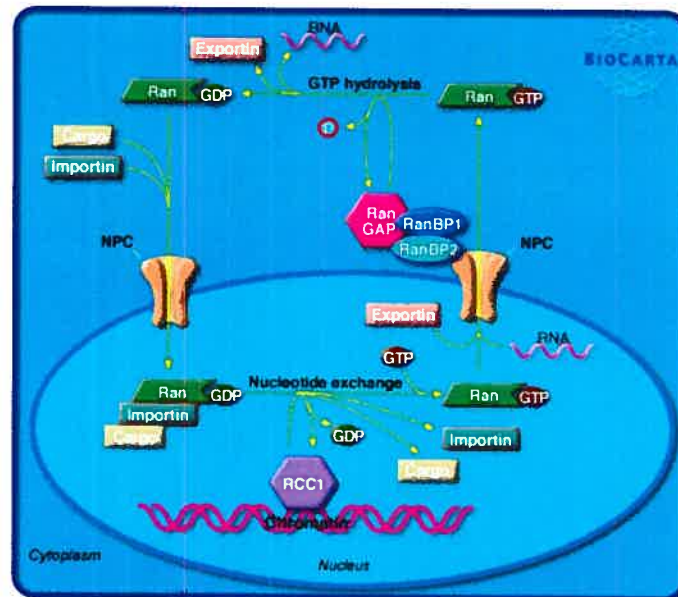
Trois gènes ont retenu notre attention pour des études de modulation d'expression dans les lignées cellulaires ovariennes. Il s'agit de Ran, Cdc20 et Cks1. Ran fut, sans équivoque, notre candidat de premier choix pour les études de suppression d'expression. En fait, il s'est montré être le marqueur le plus prometteur au niveau de la survie des patientes atteintes d'EOC en plus de permettre la distinction des LMP et des TOV de tous les grades.

De plus, différents groupes de chercheurs, incluant le nôtre, ont observé que Met (Chapitre III) et Dr5 (Chapitre V), deux protéines normalement localisées à la membrane plasmique, se retrouvent de façon surprenante dans le noyau des cellules

tumorales [437, 438]. Cette localisation nucléaire inattendue a également été constatée pour certains récepteurs à l'EGF (ErbB) [439-445]. L'altération de l'activité du complexe du pore nucléaire pourrait être en cause et les protéines de ce complexe se retrouvent surexprimées dans différents cancers [446] (et revu dans [447]). Puisque Ran fait partie de ce complexe, son étude au niveau fonctionnel n'en était que plus intéressante. En plus de ces fonctions dans le transport du pore nucléaire, Ran est impliqué dans la progression du cycle cellulaire, dans l'organisation nucléaire et dans l'assemblage de l'enveloppe nucléaire (revu dans [447-449]).

Un autre indice qui nous laisse soupçonner l'importance de Ran dans la tumorigenèse ovarienne est que l'altération du fonctionnement de son réseau entraîne une instabilité génomique dans les cellules. Comme discuté à la section 1.9, les cellules tumorales ovariennes sont truffées d'altérations génétiques. Le réseau de Ran (voir Figure 20) est constitué de Rcc1, une protéine qui a la capacité de lier la chromatine et dont le rôle de facteur d'échange de guanine permet la formation du Ran-GTP, la forme active de ce dernier. L'activateur de l'hydrolyse du GTP de Ran est la RanGAP1. L'autre membre du réseau est la RanBP1 qui consiste en l'effecteur de Ran dont la fonction est de moduler son recyclage en favorisant l'efficacité de l'hydrolyse de ce dernier par la RanGAP1. RanBP1 a également la capacité d'inhiber l'échange de guanine dépendante de Rcc1 (revu dans [447]). Un rôle étonnant de Ran dans la duplication des centrosomes, nécessaire à l'établissement du fuseau mitotique bipolaire, a été montré suite à des analyses effectuées à l'aide d'oncoprotéines virales (E1A de HPV et Hbx de HBV) qui ont la capacité de lier Ran [450-452]. Une altération du réseau de Ran entraîne donc une augmentation du nombre de centrosomes, donnant lieux à des mitoses multipolaires et à une ségrégation aberrante des chromosomes. Bien qu'il ne soit pas courant de voir l'infection des cellules de l'OSE par ces virus, une altération du niveau de base de certaines protéines pourrait entraîner un effet similaire à celui retrouvé chez les cancers causés par les virus. D'ailleurs, il a été montré que la surexpression de RanBP1 ou la localisation ectopique de Rcc1 est à l'origine d'anormalités mitotiques sévères comme la formation de fuseaux multipolaires, l'alignement inadéquat des chromosomes de

même que la duplication des centrioles [453-455]. C'est donc une diminution du ratio RanGTP/RanGDP qui induirait l'instabilité génomique dans les tumeurs.



**Figure 20 Réseau de Ran impliqué dans le transport nucléo-cytoplasmique (tirée de [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)). Le recyclage de Ran est contrôlé par le gradient de RanGTP-RanGDP généré par Rcc1 et RanGAP. Rcc1 sert de facteur d'échange de guanine et permet la formation du Ran-GTP, la forme active de ce Ran. L'activateur de l'hydrolyse du GTP de Ran est la RanGAP1. L'autre membre du réseau est la RanBP1 qui consiste en l'effecteur de Ran dont la fonction est de moduler son recyclage en favorisant l'efficacité de l'hydrolyse de ce dernier par la RanGAP1. RanBP1 a également la capacité d'inhiber l'échange de guanine dépendante de Rcc1.**

Bien que non testé jusqu'à maintenant sur les microétalage de tissus d'EOC par manque d'outils, nous avons noté une surexpression de RanBP1 dans les TOV de G3 lors de nos analyses de micropuces à ADN les comparant aux LMP (Chapitre II). Ce dernier a également été vu surexprimé dans plusieurs autres cancers dont ceux du poumon, de l'œsophage, du foie et de la prostate [456-458]. Des expériences évaluant les niveaux d'expression protéique des divers membres de ce réseau sont présentement en cours et nous permettront d'apprécier la dérégulation de ce dernier.

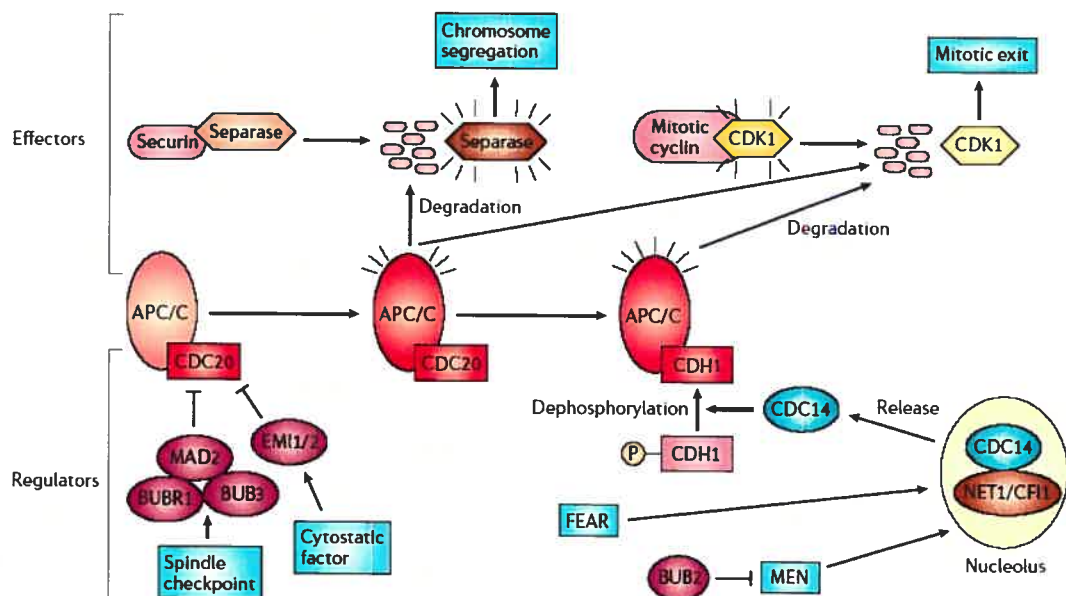
Le potentiel de Ran a également été montré en tant qu'antigène tumoral pour les cancers gastriques puisque son épitope a été reconnu par des cellules T cytotoxiques infiltrant ces tumeurs [446]. Selon cette étude, bien que l'expression de l'ARN de Ran est présente dans les tissus normaux et cancéreux, son expression protéique est restreinte aux tissus tumoraux et non pas aux cellules normales adjacentes. Ceci s'accorde avec son utilisation potentielle en vue d'une immunothérapie pour certains patients bien que des études cliniques restent à être effectuées. Toutes ces informations cumulées nous indiquent que ce réseau a son importance dans le développement de certains cancers et que son étude mérite notre attention dans l'EOC.

### **6.3.3.3 L'étude de Cdc20 et deCks1**

Notre choix de candidats à étudier s'est également arrêté sur Cdc20 puisque ce dernier montrait une association avec la survie des patientes atteintes d'EOC en plus d'être différentiellement exprimé entre les divers grades tumoraux (Chapitre II). Plusieurs études de micropuces à ADN ont montré une altération de son expression dans les tumeurs, mais également celle de son régulateur transcriptionnel, Cks1 [212, 352, 360, 410, 421, 422, 424].

Ces deux protéines (Cdc20 et Cks1) occupent des fonctions importantes pour la sortie de la mitose et plus particulièrement lors de l'anaphase. Plusieurs autres candidats impliqués dans cette phase de la mitose ont été sélectionnés lors de nos analyses de

micropuces à ADN (par exemple : Cks2, Ubch10, Ccnb1, Cdk1, Cdc25, Bub1, Msp1, Pttg) (voir Figure 19). Par exemple, Ubch10 joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire en agissant en tant que cofacteur du complexe promoteur de l'anaphase (anaphase-promoting complex/ cyclosome, APC). Ce complexe protéique est composé de diverses sous-unités dont Apc1/Tsg24, Apc2, Apc3/Cdc27, Apc4, Apc5, Apc6/Cdc16, Apc7, Apc8/Cdc23, Apc10, Apc11 et Cdc26. L'APC/C coordonne la mitose et l'entrée en G1 en promouvant séquentiellement la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire (revu dans [459]). L'APC/C est activé tôt en mitose par sa phosphorylation dépendante de Ccnb1/Cdk1 et la liaison de son activateur Cdc20 dont l'expression est dépendante de Cks1 (Figure 21) [460]. L'inhibition de l'APC/C, par les protéines du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, assure que la séparation des chromatides sœurs survienne seulement suite à l'attachement des kinétochores. Durant l'anaphase, Cdc20 est remplacé par son homologue Cdh1 et c'est lié à ce dernier que l'APC/C orchestre la sortie de la mitose et les événements qui surviennent en G1. L'APC/C est inactivé avant l'entrée en phase S par la dégradation de son E2 (Ubch10) et par l'expression dépendante des inhibiteurs d'E3F soit la CcnA et Emi1 [461-463].



**Figure 21 Régulation et fonctions de l'APC/C (tirée de [464])** Jusqu'au moment où les fuseaux mitotiques s'attachent aux kinétochores lors de la métaphase de la mitose, Cdc20 est inhibé par sa liaison aux membres du point de contrôle du fuseau mitotique (Mad2, BubR1 et Bub3). L'activation de l'APC/C-Cdc20, par perte de liaison aux protéines de contrôle, promouvoit la protéolyse de la sécurine afin de permettre à la séparase de cliver les cohésines ce qui résulte en la séparation des chromosomes. L'APC/C-Cdc20 cible donc les cyclines mitotiques pour leur dégradation. L'association subséquente de l'APC/C avec la Cdh1 à la fin de la phase M favorise la sortie de cette phase et le maintien en phase G1.

Donc, tout comme Ran, Cdc20 et Cks1 jouent un rôle lors de l'anaphase. L'altération de l'expression des différents gènes et/ou protéines requises lors de la mitose facilite les erreurs mitotiques et par le fait même, entraîne l'instabilité génomique. Pour ces différentes raisons, nous avons décidé d'étudier leur rôle dans la tumorigenèse ovarienne. L'approche utilisée reposait sur le système de vecteur non-inductible *pSilencer* mis en marché par Ambion (Ambion, TX, USA) avec lequel nous avons

tenté de supprimer l'expression de Ran, Cdc20 et Cks1 dans trois lignées cellulaires. Cependant, malgré notre acharnement pour dériver des clones dans lesquels une inhibition de l'expression de nos candidats était adéquate, nos efforts ont été infructueux. En fait, seuls des clones ne présentant pas de suppression adéquate des gènes ont été sélectionnés. Nous n'avons pu vérifier si cette piètre sous-expression des gènes était causée par un shARN trop peu efficace ou encore trop fortement actif causant l'arrêt de croissance des cellules. Cependant, afin de contrer ce problème, les expériences qui sont présentement en cours sont effectuées à l'aide de vecteurs inductibles, dans lesquels nos shARN sont introduits. Suite à l'ajout de la tétracycline, qui lèvera la répression de transcription du shARN, l'effet de l'inhibition de l'expression de nos candidats pourra être étudié.

#### **6.3.4 Perspectives futures des candidats dans le dépistage de l'EOC**

Sans nul doute, un des facteurs qui amplifie la létalité reliée à l'EOC est l'absence d'indice précoce de son développement. D'ailleurs, plus de 70% des patientes apprennent qu'elles souffrent de cette maladie quand celle-ci a déjà fait des ravages considérables (stade III-IV). Ceci rend leur espérance de vie à 5 ans inférieure à 30% et ce, malgré les interventions chirurgicales radicales et agressives de même que les nouvelles interventions chimiothérapeutiques prescrites. Le diagnostic tardif de l'EOC découle de l'absence de symptôme précis, mais aussi du manque de marqueurs ou de techniques de dépistage précoce.

Les marqueurs de dépistage se doivent, tout comme leur équivalents pronostiques, d'être sensibles (positifs chez les patientes atteintes) et spécifiques (négatifs chez les patientes saines). En fait, malgré une forte mortalité associée à l'EOC, cette maladie reste peu fréquente (revu dans [465]). De ce fait découle la préoccupation de la morbidité associée aux complications chirurgicales pouvant survenir chez les patientes faussement diagnostiquées ce qui réduirait les bénéfices associés au diagnostic précoce des patientes affectées. En fait, le nomogramme de dépistage constitué d'un ou de plusieurs marqueurs et/ou de techniques d'imagerie devraient

montrer une spécificité de 99.6% afin d'obtenir une valeur minimale de prédiction positive de 10% soit un maximum de neuf faux-positifs par cancer découvert (revu dans [465]).

L'autre objectif à atteindre est une sensibilité adéquate du ou des marqueurs afin de pouvoir détecter l'EOC chez des femmes qui ne présentent aucun symptôme clinique. Le défi provient du fait que la recherche de marqueurs potentiels se fait sur des échantillons provenant de patientes déjà diagnostiquées avec un EOC et souvent de stade avancé. Le CA125 constitue un bon outil de suivi. Il est cependant peu utilisé comme outil de dépistage dans la population générale puisqu'il est peu sensible pour la maladie précoce, car plus du tiers des patientes de SI expriment peu ou pas de CA125. Son manque de sensibilité et de spécificité l'empêche d'être un outil de dépistage routinier pour l'EOC. Donc, la découverte de marqueurs ou de techniques additionnels pour un dépistage sérique améliorant la sensibilité et la spécificité obtenues présentement avec le CA125 serait avantageuse et utile en vue du dépistage de l'EOC.

En fait, trois facteurs majeurs entravent l'utilisation clinique des différents marqueurs identifiés au cours des dernières années. Ceux-ci se reflètent par l'hétérogénéité entre les tumeurs et la prévalence de pathologies ovariennes non-invasives qui réduisent la spécificité des marqueurs pour le cancer. Finalement, la faible concentration des marqueurs particulièrement en stade précoce de la maladie, diminue la sensibilité du marqueur (revu dans [225]). Encore une fois, l'utilisation des micropuces à ADN comme outil de criblage pour découvrir des protéines potentiellement sécrétées qui pourraient servir au dépistage de l'EOC s'est avérée prometteuse. D'ailleurs, au laboratoire, suite aux comparaisons d'échantillons d'ovaires normaux et tumoraux, nous avons fait ressortir l'utilité de Il-18 et Fgf-2 en tant que marqueurs sériques du cancer de l'ovaire qui, en combinaison avec le CA-125, amélioreraient la sensibilité de ce dernier [359]. Aussi, bien que les LMP et les TOV soient toutes deux des tumeurs malignes, les candidats Slpi et Cxcl10 se sont avérés intéressants pour distinguer les patientes atteintes de TOV par ELISA (Ouellet V *et al.*, résultats non-publiés). Une



étude parue au même moment a montré l'utilité de Slpi pour améliorer la sensibilité et la spécificité pour la détection de l'EOC lorsque combiné au CA125 [466]. Cependant, ce ne sont pas toutes les protéines testées qui se sont avérées intéressantes puisque la  $\beta$ 2-microglobuline, la SerpinA1 et Trail se sont montrées inefficaces pour le dépistage de l'EOC. Plusieurs autres candidats seraient intéressants à tester mais, tout comme dans le cas de l'IHC, les ressources sont manquantes. Pour tous les candidats testés jusqu'à maintenant, des ensemble d'ELISA commerciaux étaient disponibles, tandis que pour les autres, un manque d'anticorps adéquat pour effectuer les essais d'ELISA de même que la mise au point de ces derniers limitent leur analyse.

Dans le but d'identifier des marqueurs de dépistage pour l'EOC, d'autres laboratoires se sont également penchés sur l'analyse génomique par micropuces à ADN (ex. [355-359]) ou protéomique par spectrométrie de masse effectuée sur le sérum des patientes [467-470]. Une analyse par chromatographie gazeuse effectuée sur le sérum des patientes a permis l'identification des lysophospholipides dans le diagnostic de l'EOC et l'intérêt particulier de l'acide lysophosphatidique dans la détections des patientes de stade I (positif chez neuf patientes sur 10) montrant une sensibilité supérieure au CA125 (deux patientes sur neuf) [471].

Une autre famille de protéines, les kallikréines (Klk), s'est avérée intéressante dans le diagnostic des patientes avec l'EOC. Parmi les 16 membres de la famille, 12 ont été étudiés dans l'EOC et plusieurs d'entre elles ont été également trouvées différemment exprimées entre les NOV et les TOV (revu dans [472]). Toutefois, leur utilisation semble plus associée au pronostic des patientes qu'au diagnostic de l'EOC (revu dans [225, 472]). Cependant, la combinaison des Klk 6, 8 ou 10 avec le CA125 améliorent la sensibilité et/ou la spécificité du diagnostic de l'EOC lorsque comparée au CA125 seul (revu dans [225, 472]). Le Vegf (vascular endothelial growth factor) a également été étudié sans toutefois donner des résultats de sensibilité et spécificité adéquats (54 et 77%, respectivement) pour la détection de l'EOC. He4 a été le premier candidats ressorti d'analyses de micropuces à ADN lors d'une comparaison entre les NOV et les TOV. Par ELISA, ce dernier s'est montré aussi

sensible et spécifique à la détection de l'EOC que le CA125, mais permettait une distinction plus précise entre les TOV et les BOV [358]. Un de nos candidats, la prostasine (Prss8), a également été identifié lors d'études de micropuces à ADN et a été analysé dans le sérum des patients. Ce dernier, en combinaison avec le CA125, améliorait la sensibilité et la spécificité reliées au CA125 (92 et 94%, respectivement) [355]. Basé sur leurs études de micropuces à ADN, un groupe a également évalué l'expression sérique simultanée de la leptine, la prolactine, l'ostéopontine et l'Igf-2 augmentant ainsi la sensibilité et spécificité de la détection de l'EOC à 95% [357].

### CONCLUSION

En rétrospective, les objectifs que nous voulions remplir au cours de ce projet de doctorat étaient tout d'abord de déterminer les conditions adéquates pour l'étude des profils moléculaires des tumeurs LMP et TOV de sous-type histologique séreux, le plus commun dans l'EOC. Ces dernières consistaient à déterminer les critères d'inclusion afin de constituer l'échantillonnage initial, les systèmes modèles, les algorithmes statistiques à utiliser afin de déterminer des gènes candidats exprimés de façon différentielle et enfin, la validation des différence d'expression par une technique quantitative. Par trois algorithmes différents, nous avons pu identifier des gènes candidats qui constituaient une signature génique des tumeurs LMP et TOV de G3, les deux extrêmes de l'agressivité parmi les tumeurs malignes séreuses ovariennes. Nous avons également validé l'expression différentielle de certains gènes par une méthode quantitative utilisant le PCR. De ces signatures géniques a découlé la sélection individuelle ou par complexe/voie de signalisation de gènes candidats dans le but de déterminer si leur expression était également modulée au niveau de la protéines. Nous avons montré leur potentiel en tant que marqueurs de différenciation tumorale et les protéines telles que Ran, Cdc20 et Dr5 se sont avérées être associées au pronostic de la patiente. Nous avons également fait ressortir la nécessité d'une combinaison de candidats afin d'améliorer les niveaux de sensibilité et de spécificité requis pour leur utilisation clinique. Finalement, une analyse fonctionnelle par la suppression de leur expression dans des lignées cellulaires d'EOC pourrait dévoiler

leur intérêt en tant que cible pour le développement de nouveaux agent anti-cancéreux.

En conclusion, les candidats sélectionnés lors des analyses de micropuces à ADN comparant les tumeurs séreuses LMP et TOV de G3 ont permis de pointer différents candidats qui, une fois leur étude approfondie, pourraient être intéressants en tant que marqueurs de dépistage, de diagnostic, de pronostic et peut être même en tant que cibles thérapeutiques.

1. Wilhelm, D., Palmer, S., and Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* **87**, 1-28.
2. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-4.
3. Cohen, D. R., Sinclair, A. H., and McGovern, J. D. (1994). SRY protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4372-6.
4. Dubin, R. A., and Ostrer, H. (1994). Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol* **8**, 1182-92.
5. Desclozeaux, M., Poulat, F., de Santa Barbara, P., Capony, J. P., Turowski, P., Jay, P., Mejean, C., Moniot, B., Boizet, B., and Berta, P. (1998). Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* **273**, 7988-95.
6. McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Herskowitz, I., and Fellous, M. (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3368-72.
7. Nikolova, G., and Vilain, E. (2006). Mechanisms of disease: Transcription factors in sex determination--relevance to human disorders of sex development. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **2**, 231-8.
8. de Santa Barbara, P., Mejean, C., Moniot, B., Malcles, M. H., Berta, P., and Boizet-Bonhoure, B. (2001). Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod* **64**, 775-83.

9. Pilon, N., Daneau, I., Paradis, V., Hamel, F., Lussier, J. G., Viger, R. S., and Silversides, D. W. (2003). Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod* **68**, 1098-106.
10. Sekido, R., Bar, I., Narvaez, V., Penny, G., and Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* **274**, 271-9.
11. Kidokoro, T., Matoba, S., Hiramatsu, R., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Taya, C., Kurohmaru, M., Kawakami, H., Hayashi, Y., Kanai, Y., and Yonekawa, H. (2005). Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev Biol* **278**, 511-25.
12. Hoang-Ngoc, M., Smadja, A., Herve de Sigalony, J. P., and Orcel, L. (1989). [Histologic study of the gonads in ovarian differentiation during organogenesis]. *Arch Anat Cytol Pathol* **37**, 201-7.
13. Satoh, M. (1991). Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* **177**, 85-107.
14. Chen, V. W., Ruiz, B., Killeen, J. L., Cote, T. R., Wu, X. C., and Correa, C. N. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* **97**, 2631-42.
15. Dauplat, J., and Guastalla, J. (1996). "Cancer de l'ovaire," Arnette Blackwell S.A., Paris.
16. Teixeira, J., Maheswaran, S., and Donahoe, P. K. (2001). Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* **22**, 657-74.
17. Voutilainen, R. (1992). Differentiation of the fetal gonad. *Horm Res* **38 Suppl 2**, 66-71.
18. Wartenberg, H. (1982). Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. *Anat Embryol (Berl)* **165**, 253-80.
19. Calas, A., Perrin, J., Plas, C., and Vanneste, P. (1997). "Précis de physiologie," Doin Éditeurs, Vélizi Cedex.

20. Jammongjit, M., and Hammes, S. R. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* **5**, 1178-83.
21. Marieb, E. (1993). "Anatomie et physiologie humaine," Éditions du Renouveau Pédagogique Inc, Montreal.
22. Allen, E. (1923). Ovogenesis during sexual maturity. *Am J Clin Anat* **31**, 439-481.
23. Osterholzer, H. O., Streibel, E. J., and Nicosia, S. V. (1985). Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* **33**, 247-58.
24. Bao, R., Selvakumaran, M., and Hamilton, T. C. (2002). Targeted gene therapy of ovarian cancer using an ovarian-specific promoter. *Gynecol Oncol* **84**, 228-34.
25. Heinzelmann-Schwarz, V. A., Gardiner-Garden, M., Henshall, S. M., Scurry, J. P., Scolyer, R. A., Smith, A. N., Bali, A., Vanden Bergh, P., Baron-Hay, S., Scott, C., Fink, D., Hacker, N. F., Sutherland, R. L., and O'Brien, P. M. (2006). A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* **94**, 904-13.
26. Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., and Leung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* **22**, 255-88.
27. Bjersing, L., and Cajander, S. (1975). Ovulation and the role of the ovarian surface epithelium. *Experientia* **31**, 605-8.
28. Espey, L. L. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* **50**, 233-8.
29. Kruk, P. A., Uitto, V. J., Firth, J. D., Dedhar, S., and Auersperg, N. (1994). Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. *Exp Cell Res*. **215**, 97-108.
30. Murdoch, W. J., and McDonnell, A. C. (2002). Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* **123**, 743-50.
31. Ackerman, R. C., and Murdoch, W. J. (1993). Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins* **45**, 475-85.

32. Murdoch, W. J. (1995). Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* **53**, 8-12.
33. Schumer, S. T., and Cannistra, S. A. (2003). Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol* **21**, 1180-9.
34. Hoskins, W. J., Young, R. C., Markman, M., Perez, A. P., Barakat, R. R., and Randall, M. (2005). "Principles and Practice of Gynecologic Oncology," 4th Edition ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
35. Franco, E. L., and Rohan, T. E. (2002). "Cancer Precursors; Epidemiology, Detection and Prevention," Springer-Verlag New York Inc., New York.
36. Katabuchi, H., and Okamura, H. (2003). Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis. *Med Electron Microsc* **36**, 74-86.
37. Bell, D. A. (2005). Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol* **18 Suppl 2**, S19-32.
38. Gusberg, S. B., and Deligdisch, L. (1984). Ovarian dysplasia. A study of identical twins. *Cancer* **54**, 1-4.
39. Bell, D. A., and Scully, R. E. (1994). Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. *Cancer* **73**, 1859-64.
40. Graham, J. B., and Graham, R. M. (1967). Cul-de-sac puncture in the diagnosis of early ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* **74**, 371-8.
41. Graham, R. M., Schueller, E. F., and Graham, J. B. (1965). Detection of Ovarian Cancer at an Early Stage. *Obstet Gynecol* **26**, 151-6.
42. Graham, J. B., Graham, R. M., and Schueller, E. F. (1964). Preclinical Detection of Ovarian Cancer. *Cancer* **17**, 1414-32.
43. Hutson, R., Ramsdale, J., and Wells, M. (1995). p53 protein expression in putative precursor lesions of epithelial ovarian cancer. *Histopathology* **27**, 367-71.
44. Werness, B. A., Parvatiyar, P., Ramus, S. J., Whittemore, A. S., Garlinghouse-Jones, K., Oakley-Girvan, I., DiCioccio, R. A., Wiest, J., Tsukada, Y., Ponder, B. A., and Piver, M. S. (2000). Ovarian carcinoma in

- situ with germline BRCA1 mutation and loss of heterozygosity at BRCA1 and TP53. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1088-91.
45. Gil, J., and Deligdisch, L. (1989). Interactive morphometric procedures and statistical analysis in the diagnosis of ovarian dysplasia and carcinoma. *Pathol Res Pract* **185**, 680-5.
  46. Tsukahara, Y., Shiozawa, I., Sakai, Y., Ishii, J., Iwai, S., and Fukuta, T. (1982). Study on the histogenesis of ovarian tumors--with special reference to five clinical cases with common epithelial tumors detected during the preclinical stage. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **34**, 959-65.
  47. Plaxe, S. C., Deligdisch, L., Dottino, P. R., and Cohen, C. J. (1990). Ovarian intraepithelial neoplasia demonstrated in patients with stage I ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* **38**, 367-72.
  48. Barakat, R. R., Federici, M. G., Saigo, P. E., Robson, M. E., Offit, K., and Boyd, J. (2000). Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimens from BRCA1 heterozygotes. *Cancer* **89**, 383-90.
  49. Stratton, J. F., Buckley, C. H., Lowe, D., and Ponder, B. A. (1999). Comparison of prophylactic oophorectomy specimens from carriers and noncarriers of a BRCA1 or BRCA2 gene mutation. United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Familial Ovarian Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* **91**, 626-8.
  50. Salazar, H., Godwin, A. K., Daly, M. B., Laub, P. B., Hogan, W. M., Rosenblum, N., Boente, M. P., Lynch, H. T., and Hamilton, T. C. (1996). Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1810-20.
  51. Tresserra, F., Grases, P. J., Labastida, R., and Ubeda, A. (1998). Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol* **71**, 437-41.
  52. Resta, L., Russo, S., Colucci, G. A., and Prat, J. (1993). Morphologic precursors of ovarian epithelial tumors. *Obstet Gynecol* **82**, 181-6.



53. Westhoff, C., Murphy, P., Heller, D., and Halim, A. (1993). Is ovarian cancer associated with an increased frequency of germinal inclusion cysts? *Am J Epidemiol* **138**, 90-3.
54. Kruk, P. A., and Auersperg, N. (1994). A line of rat ovarian surface epithelium provides a continuous source of complex extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol. Animal.* **30A**, 217-25.
55. Auersperg, N., Maines-Bandiera, S. L., Dyck, H. G., and Kruk, P. A. (1994). Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab. Invest.* **71**, 510-8.
56. Godwin, A. K., Perez, R. P., Johnson, S. W., Hamaguchi, K., and Hamilton, T. C. (1992). Growth regulation of ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* **6**, 829-41.
57. Testa, J. R., Getts, L. A., Salazar, H., Liu, Z., Handel, L. M., Godwin, A. K., and Hamilton, T. C. (1994). Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells results in well to poorly differentiated tumors with a parallel range of cytogenetic complexity. *Cancer Res* **54**, 2778-84.
58. Scully, R. E. (1995). Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl* **23**, 208-18.
59. Scott, I. S., Heath, T. M., Morris, L. S., Rushbrook, S. M., Bird, K., Vowler, S. L., Arends, M. J., and Coleman, N. (2004). A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens. *Br J Cancer* **90**, 1583-90.
60. Kabawat, S. E., Bast, R. C., Jr., Bhan, A. K., Welch, W. R., Knapp, R. C., and Colvin, R. B. (1983). Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol* **2**, 275-85.
61. Wang, D. P., Konishi, I., Koshiyama, M., Nanbu, Y., Iwai, T., Nonogaki, H., Mori, T., and Fujii, S. (1992). Immunohistochemical localization of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor in normal surface epithelium,

- surface inclusion cysts, and common epithelial tumours of the ovary. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **421**, 393-400.
62. Sundfeldt, K., Piontkewitz, Y., Ivarsson, K., Nilsson, O., Hellberg, P., Brannstrom, M., Janson, P. O., Enerback, S., and Hedin, L. (1997). E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. *Int J Cancer* **74**, 275-80.
63. Naora, H., Montz, F. J., Chai, C. Y., and Roden, R. B. (2001). Aberrant expression of homeobox gene HOXA7 is associated with mullerian-like differentiation of epithelial ovarian tumors and the generation of a specific autologous antibody response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15209-14.
64. Tonary, A. M., Macdonald, E. A., Faught, W., Senterman, M. K., and Vanderhyden, B. C. (2000). Lack of expression of c-KIT in ovarian cancers is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* **89**, 242-50.
65. Scully, R. E. (1995). Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions. *Int J Gynaecol Obstet* **49 Suppl**, S9-15.
66. Blaustein, A., Kaganowicz, A., and Wells, J. (1982). Tumor markers in inclusion cysts of the ovary. *Cancer* **49**, 722-6.
67. Wu, S., Rodabaugh, K., Martinez-Maza, O., Watson, J. M., Silberstein, D. S., Boyer, C. M., Peters, W. P., Weinberg, J. B., Berek, J. S., and Bast, R. C., Jr. (1992). Stimulation of ovarian tumor cell proliferation with monocyte products including interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Obstet Gynecol* **166**, 997-1007.
68. Berchuck, A., Kohler, M. F., Boente, M. P., Rodriguez, G. C., Whitaker, R. S., and Bast, R. C., Jr. (1993). Growth regulation and transformation of ovarian epithelium. [Review]. *Cancer* **71**, 545-51.
69. Wu, S., Boyer, C. M., Whitaker, R. S., Berchuck, A., Wiener, J. R., Weinberg, J. B., and Bast, R. C., Jr. (1993). Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Res* **53**, 1939-44.

70. Scott, M., and McCluggage, W. G. (2006). Current concepts in ovarian epithelial tumorigenesis: correlation between morphological and molecular data. *Histol Histopathol* **21**, 81-92.
71. Sato, N., Tsunoda, H., Nishida, M., Morishita, Y., Takimoto, Y., Kubo, T., and Noguchi, M. (2000). Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res* **60**, 7052-6.
72. Obata, K., Morland, S. J., Watson, R. H., Hitchcock, A., Chenevix-Trench, G., Thomas, E. J., and Campbell, I. G. (1998). Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* **58**, 2095-7.
73. Palacios, J., and Gamallo, C. (1998). Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* **58**, 1344-7.
74. Wu, R., Zhai, Y., Fearon, E. R., and Cho, K. R. (2001). Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* **61**, 8247-55.
75. Nezhat, F., Cohen, C., Rahaman, J., Gretz, H., Cole, P., and Kalir, T. (2002). Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. *Cancer* **94**, 2935-40.
76. Okuda, T., Otsuka, J., Sekizawa, A., Saito, H., Makino, R., Kushima, M., Farina, A., Kuwano, Y., and Okai, T. (2003). p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. *Gynecol Oncol* **88**, 318-25.
77. Crum, C. P., Drapkin, R., Miron, A., Ince, T. A., Muto, M., Kindelberger, D. W., and Lee, Y. (2007). The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol* **19**, 3-9.
78. (2006). Canadian Cancer Statistics 2006. Canadian Cancer Society, National Cancer Institute of Health of Canada, Statistic Canada, Provincial/ Territorial Cancer Registries, Public Health Agency of Canada.

79. Colombo, N., Van Gorp, T., Parma, G., Amant, F., Gatta, G., Sessa, C., and Vergote, I. (2006). Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **60**, 159-79.
80. Schulz, M., Lahmann, P. H., Riboli, E., and Boeing, H. (2004). Dietary determinants of epithelial ovarian cancer: a review of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer* **50**, 120-40.
81. Fleming, J. S., Beaugie, C. R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G., and Tan, O. L. (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol* **247**, 4-21.
82. Hanna, L., and Adams, M. (2006). Prevention of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **20**, 339-62.
83. Report, W. (1997). In Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. (W. C. R. Fund, Ed.) WRCF Report, Washington, DC.
84. Policy, C. o. M. A. o. F. a. N. (1998). In Report of the Working Group on Diet and Cancer. Nutritional Aspects of the Development of Cancer. (COMA, Ed.) London, Stationary Office.
85. Thomas, H. V., Davey, G. K., and Key, T. J. (1999). Oestradiol and sex hormone-binding globulin in premenopausal and post-menopausal meat-eaters, vegetarians and vegans. *Br J Cancer* **80**, 1470-5.
86. Bennett, F. C., and Ingram, D. M. (1990). Diet and female sex hormone concentrations: an intervention study for the type of fat consumed. *Am J Clin Nutr* **52**, 808-12.
87. Lampe, J. W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* **70**, 475S-490S.
88. Pan, S. Y., Ugnat, A. M., Mao, Y., Wen, S. W., and Johnson, K. C. (2004). Association of cigarette smoking with the risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* **111**, 124-30.
89. Modugno, F., Ness, R. B., and Cottreau, C. M. (2002). Cigarette smoking and the risk of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* **13**, 467-71.

90. Green, A., Purdie, D., Bain, C., Siskind, V., and Webb, P. M. (2001). Cigarette smoking and risk of epithelial ovarian cancer (Australia). *Cancer Causes Control* **12**, 713-9.
91. Marchbanks, P. A., Wilson, H., Bastos, E., Cramer, D. W., Schildkraut, J. M., and Peterson, H. B. (2000). Cigarette smoking and epithelial ovarian cancer by histologic type. *Obstet Gynecol* **95**, 255-60.
92. Kuper, H., Titus-Ernstoff, L., Harlow, B. L., and Cramer, D. W. (2000). Population based study of coffee, alcohol and tobacco use and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* **88**, 313-8.
93. Stockwell, H. G., and Lyman, G. H. (1987). Cigarette smoking and the risk of female reproductive cancer. *Am J Obstet Gynecol* **157**, 35-40.
94. Ness, R. B., and Cottreau, C. (1999). Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1459-67.
95. Green, A., Purdie, D., Bain, C., Siskind, V., Russell, P., Quinn, M., and Ward, B. (1997). Tubal sterilisation, hysterectomy and decreased risk of ovarian cancer. Survey of Women's Health Study Group. *Int J Cancer* **71**, 948-51.
96. Green, A., Purdie, D., Green, L., Dick, M. L., Bain, C., and Siskind, V. (1997). Validity of self-reported hysterectomy and tubal sterilisation. The Survey of Women's Health Study Group. *Aust N Z J Public Health* **21**, 337-40.
97. Harlow, B. L., Cramer, D. W., Bell, D. A., and Welch, W. R. (1992). Perineal exposure to talc and ovarian cancer risk. *Obstet Gynecol* **80**, 19-26.
98. Fathalla, M. F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* **2**, 163.
99. Wilson, J. E. (1958). Adeno-carcinomata in hens kept in a constant environment. *Poultry Sci* **37**, 1253.
100. Fredrickson, T. N. (1987). Ovarian tumors of the hen. *Environ Health Perspect* **73**, 35-51.
101. Siskind, V., Green, A., Bain, C., and Purdie, D. (2000). Beyond ovulation: oral contraceptives and epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* **11**, 106-10.

102. Gwinn, M. L., Lee, N. C., Rhodes, P. H., Layde, P. M., and Rubin, G. L. (1990). Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *J Clin Epidemiol* **43**, 559-68.
103. Cramer, D. W., and Welch, W. R. (1983). Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* **71**, 717-21.
104. Beltsos, A. N., and Odem, R. R. (1996). Ovulation induction and ovarian malignancy. *Semin Reprod Endocrinol* **14**, 367-74.
105. Risch, H. A. (1998). Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1774-86.
106. Schildkraut, J. M., Schwingl, P. J., Bastos, E., Evanoff, A., and Hughes, C. (1996). Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* **88**, 554-9.
107. Rossing, M. A., Daling, J. R., Weiss, N. S., Moore, D. E., and Self, S. G. (1994). Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* **331**, 771-6.
108. Harris, R., Whittemore, A. S., and Itnyre, J. (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* **136**, 1204-11.
109. Adami, H. O., Hsieh, C. C., Lambe, M., Trichopoulos, D., Leon, D., Persson, I., Ekblom, A., and Janson, P. O. (1994). Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. *Lancet* **344**, 1250-4.
110. Daly, M. B. (1992). The epidemiology of ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* **6**, 729-38.
111. Ness, R. B., Cramer, D. W., Goodman, M. T., Kjaer, S. K., Mallin, K., Mosgaard, B. J., Purdie, D. M., Risch, H. A., Vergona, R., and Wu, A. H. (2002). Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* **155**, 217-24.

112. Lukanova, A., and Kaaks, R. (2005). Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 98-107.
113. Whittemore, A. S., Harris, R., and Itnyre, J. (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* **136**, 1184-203.
114. Cannistra, S. A. (2004). Cancer of the ovary. *N Engl J Med* **351**, 2519-29.
115. Parazzini, F., Negri, E., La Vecchia, C., Restelli, C., and Franceschi, S. (1992). Family history of reproductive cancers and ovarian cancer risk: an Italian case-control study. *Am J Epidemiol* **135**, 35-40.
116. Tavani, A., Negri, E., Franceschi, S., Parazzini, F., and La Vecchia, C. (1993). Risk factors for epithelial ovarian cancer in women under age 45. *Eur J Cancer* **29A**, 1297-301.
117. Kerlikowske, K., Brown, J. S., and Grady, D. G. (1992). Should women with familial ovarian cancer undergo prophylactic oophorectomy? *Obstet Gynecol* **80**, 700-7.
118. Mink, P. J., Folsom, A. R., Sellers, T. A., and Kushi, L. H. (1996). Physical activity, waist-to-hip ratio, and other risk factors for ovarian cancer: a follow-up study of older women. *Epidemiology* **7**, 38-45.
119. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71.
120. Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., Fields, P., Marshall, G., Narod, S., Lenoir, G. M., Lynch, H., Feunteun, J., Devilee, P., Cornelisse, C. J., Menko, F. H., Daly, P. A., Ormiston, W., McManus, R., Pye, C., Lewis, C. M., Cannonalbright, L. A., Easton, D. F., and et al. (1994). Localization Of a Breast Cancer Susceptibility Gene, Brca2, to Chromosome 13q12-13. *Science* **265**, 2088-2090.

121. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-92.
122. Aunoble, B., Sanches, R., Didier, E., and Bignon, Y. J. (2000). Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol* **16**, 567-76.
123. McCoy, M. L., Mueller, C. R., and Roskelley, C. D. (2003). The role of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in sporadic epithelial ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 72.
124. Easton, D. F., Ford, D., Bishop, D. T., Haites, N., Milner, B., Allan, L., Easton, D. F., Ponder, B. A. J., Peto, J., Smith, S., Ford, D., Stratton, M., Narod, S. A., Lenoir, G. M., Feunteun, J., Lynch, H., Arason, A., Barkdardottir, R., Egilsson, D. V., Bishop, D. T., Black, D. M., Kelsell, D., Spurr, N. K., Devilee, P., Cornelisse, C. J., and et al. (1995). Breast and Ovarian Cancer Incidence In Brcai-Mutation Carriers. *Am J Hum Genet.* **56**, 265-271.
125. Risch, H. A., McLaughlin, J. R., Cole, D. E., Rosen, B., Bradley, L., Kwan, E., Jack, E., Vesprini, D. J., Kuperstein, G., Abrahamson, J. L., Fan, I., Wong, B., and Narod, S. A. (2001). Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* **68**, 700-10.
126. Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M. M., Brody, L. C., and Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* **336**, 1401-8.
127. Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjakoski, K., Kallioniemi, O. P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D. G., and Easton, D. F. (2003). Average risks



- of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**, 1117-30.
128. Kerr, P., and Ashworth, A. (2001). New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol* **11**, R668-76.
  129. Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171-82.
  130. Gayther, S. A., Harrington, P., Russell, P., Kharkevich, G., Garkavtseva, R. F., and Ponder, B. A. (1996). Rapid detection of regionally clustered germline BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. *Am J Hum Genet* **58**, 451-6.
  131. Pal, T., Permuth-Wey, J., Betts, J. A., Krischer, J. P., Fiorica, J., Arango, H., LaPolla, J., Hoffman, M., Martino, M. A., Wakeley, K., Wilbanks, G., Nicosia, S., Cantor, A., and Sutphen, R. (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* **104**, 2807-16.
  132. Lu, K. H., Dinh, M., Kohlmann, W., Watson, P., Green, J., Syngal, S., Bandipalliam, P., Chen, L. M., Allen, B., Conrad, P., Terdiman, J., Sun, C., Daniels, M., Burke, T., Gershenson, D. M., Lynch, H., Lynch, P., and Broaddus, R. R. (2005). Gynecologic cancer as a "sentinel cancer" for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstet Gynecol* **105**, 569-74.
  133. Olschwang, S., Bonaiti-Pellie, C., Feingold, J., Frebourg, T., Grandjouan, S., Lasset, C., Laurent-Puig, P., Lecuru, F., Millat, B., Sobol, H., Thomas, G., and Eisinger, F. (2006). [Identification and management of HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas]. *Pathol Biol (Paris)* **54**, 215-29.
  134. Olschwang, S., Bonaiti, C., Feingold, J., Frebourg, T., Grandjouan, S., Lasset, C., Laurent-Puig, P., Lecuru, F., Millat, B., Sobol, H., Thomas, G., and Eisinger, F. (2004). [Identification and management of HNPCC syndrome

- (hereditary non polyposis colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas]. *Bull Cancer* **91**, 303-15.
135. Heintz, A. P., Odicino, F., Maisonneuve, P., Beller, U., Benedet, J. L., Creasman, W. T., Ngan, H. Y., and Pecorelli, S. (2003). Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* **83 Suppl 1**, 135-66.
  136. Kennedy, A. W., Biscotti, C. V., Hart, W. R., and Webster, K. D. (1989). Ovarian clear cell adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* **32**, 342-9.
  137. Pectasides, D., Fountzilas, G., Aravantinos, G., Kalofonos, C., Efstathiou, H., Farmakis, D., Skarlos, D., Pavlidis, N., Economopoulos, T., and Dimopoulos, M. A. (2006). Advanced stage clear-cell epithelial ovarian cancer: the Hellenic Cooperative Oncology Group experience. *Gynecol Oncol* **102**, 285-91.
  138. Pectasides, D., Pectasides, E., Psyrris, A., and Economopoulos, T. (2006). Treatment issues in clear cell carcinoma of the ovary: a different entity? *Oncologist* **11**, 1089-94.
  139. Taylor, J. M. (1929). Malignant and semi-malignant tumors of the ovary. *Surg Gynecol Obstet* **48**, 204-230.
  140. Burger, C. W., Prinszen, H. M., Baak, J. P., Wagenaar, N., and Kenemans, P. (2000). The management of borderline epithelial tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* **10**, 181-197.
  141. Dietel, M., and Hauptmann, S. (2000). Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Arch* **436**, 403-12.
  142. Scully, R. E. (1982). Common epithelial tumors of borderline malignancy (carcinomas of low malignant potential). *Bull Cancer* **69**, 228-38.
  143. Hart, W. R. (2005). Borderline epithelial tumors of the ovary. *Mod Pathol* **18 Suppl 2**, S33-50.
  144. Bell, D. A., and Scully, R. E. (1990). Ovarian serous borderline tumors with stromal microinvasion: a report of 21 cases. *Hum Pathol* **21**, 397-403.
  145. Hanselaar, A. G., Vooijs, G. P., Mayall, B., Ras-Zeijlmans, G. J., and Chadha-Ajwani, S. (1993). Epithelial markers to detect occult microinvasion in serous ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol.* **12**, 20-7.

146. Tavassoli (1988). Serous tumor of low malignant potential with early stromal invasion (serous LMP with microinvasion). *Mod. Pathology* **1**, 407-414.
147. Jones, M. B. (2006). Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management. *Clin Obstet Gynecol* **49**, 517-25.
148. Bell, D. A., Longacre, T. A., Prat, J., Kohn, E. C., Soslow, R. A., Ellenson, L. H., Malpica, A., Stoler, M. H., and Kurman, R. J. (2004). Serous borderline (low malignant potential, atypical proliferative) ovarian tumors: workshop perspectives. *Hum Pathol* **35**, 934-48.
149. Longacre, T. A., McKenney, J. K., Tazelaar, H. D., Kempson, R. L., and Hendrickson, M. R. (2005). Ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): outcome-based study of 276 patients with long-term (> or =5-year) follow-up. *Am J Surg Pathol* **29**, 707-23.
150. Kennedy, A. W., and Hart, W. R. (1996). Ovarian papillary serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). A long-term follow-up study, including patients with microinvasion, lymph node metastasis, and transformation to invasive serous carcinoma. *Cancer* **78**, 278-86.
151. Young, R. H., and Scully, R. E. (1992). Pathology of epithelial tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* **6**, 739-60.
152. Seidman, J. D., Soslow, R. A., Vang, R., Berman, J. J., Stoler, M. H., Sherman, M. E., Oliva, E., Kajdacsy-Balla, A., Berman, D. M., and Copeland, L. J. (2004). Borderline ovarian tumors: diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images. *Hum Pathol* **35**, 918-33.
153. Nayar, R., Siriaunkgul, S., Robbins, K. M., McGowan, L., Ginzan, S., and Silverberg, S. G. (1996). Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary. *Hum Pathol* **27**, 521-7.
154. Seidman, J. D., and Kurman, R. J. (2000). Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum Pathol* **31**, 539-57.

155. Bell, D. A., Weinstock, M. A., and Scully, R. E. (1988). Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors. Histologic features and prognosis. *Cancer* **62**, 2212-22.
156. Segal, G. H., and Hart, W. R. (1992). Ovarian serous tumors of low malignant potential (serous borderline tumors). The relationship of exophytic surface tumor to peritoneal "implants". *Am J Surg Pathol* **16**, 577-83.
157. McCaughey, W. T., Kirk, M. E., Lester, W., and Dardick, I. (1984). Peritoneal epithelial lesions associated with proliferative serous tumours of ovary. *Histopathology* **8**, 195-208.
158. Gershenson, D. M., Silva, E. G., Levy, L., Burke, T. W., Wolf, J. K., and Tornos, C. (1998). Ovarian serous borderline tumors with invasive peritoneal implants. *Cancer* **82**, 1096-103.
159. Morice, P., Camatte, S., Rey, A., Atallah, D., Lhomme, C., Pautier, P., Pomel, C., Cote, J. F., Haie-Meder, C., Duvillard, P., and Castaigne, D. (2003). Prognostic factors for patients with advanced stage serous borderline tumours of the ovary. *Ann Oncol* **14**, 592-8.
160. Moore, W. F., Bentley, R. C., Berchuck, A., and Robboy, S. J. (2000). Some mullerian inclusion cysts in lymph nodes may sometimes be metastases from serous borderline tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol* **24**, 710-8.
161. Prat, J., and De Nictolis, M. (2002). Serous borderline tumors of the ovary: a long-term follow-up study of 137 cases, including 18 with a micropapillary pattern and 20 with microinvasion. *Am J Surg Pathol* **26**, 1111-28.
162. Bell, D. A., and Scully, R. E. (1990). Serous borderline tumors of the peritoneum. *Am J Surg Pathol* **14**, 230-9.
163. Biscotti, C. V., and Hart, W. R. (1992). Peritoneal serous micropapillomatosis of low malignant potential (serous borderline tumors of the peritoneum). A clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Surg Pathol* **16**, 467-75.
164. Sieben, N. L., Kolkman-Uljee, S. M., Flanagan, A. M., le Cessie, S., Cleton-Jansen, A. M., Cornelisse, C. J., and Fleuren, G. J. (2003). Molecular genetic evidence for monoclonal origin of bilateral ovarian serous borderline tumors. *Am J Pathol* **162**, 1095-101.

165. Zanotti, K. M., Hart, W. R., Kennedy, A. W., Belinson, J. L., and Casey, G. (1999). Allelic imbalance on chromosome 17p13 in borderline (low malignant potential) epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* **18**, 247-53.
166. Diebold, J., Seemuller, F., and Lohrs, U. (2003). K-RAS mutations in ovarian and extraovarian lesions of serous tumors of borderline malignancy. *Lab Invest* **83**, 251-8.
167. Gu, J., Roth, L. M., Younger, C., Michael, H., Abdul-Karim, F. W., Zhang, S., Ulbright, T. M., Eble, J. N., and Cheng, L. (2001). Molecular evidence for the independent origin of extra-ovarian papillary serous tumors of low malignant potential. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1147-52.
168. Lu, K. H., Bell, D. A., Welch, W. R., Berkowitz, R. S., and Mok, S. C. (1998). Evidence for the multifocal origin of bilateral and advanced human serous borderline ovarian tumors. *Cancer Res* **58**, 2328-30.
169. Ortiz, B. H., Ailawadi, M., Colitti, C., Muto, M. G., Deavers, M., Silva, E. G., Berkowitz, R. S., Mok, S. C., and Gershenson, D. M. (2001). Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors. *Cancer Res* **61**, 7264-7.
170. Silverberg, S. G., Bell, D. A., Kurman, R. J., Seidman, J. D., Prat, J., Ronnett, B. M., Copeland, L., Silva, E., Gorstein, F., and Young, R. H. (2004). Borderline ovarian tumors: key points and workshop summary. *Hum Pathol* **35**, 910-7.
171. Alvarez, A. A., Moore, W. F., Robboy, S. J., Bentley, R. C., Gumbs, C., Futreal, P. A., and Berchuck, A. (2001). K-ras mutations in Mullerian inclusion cysts associated with serous borderline tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* **80**, 201-6.
172. Burks, R. T., Sherman, M. E., and Kurman, R. J. (1996). Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors. *Am J Surg Pathol* **20**, 1319-30.
173. Seidman, J. D., and Kurman, R. J. (1996). Subclassification Of Serous Borderline Tumors Of the Ovary Into Benign and Malignant Types - a

- Clinicopathologic Study Of 65 Advanced Stage Cases. *American Journal of Surgical Pathology* **20**, 1331-1345.
174. Eichhorn, J. H., Bell, D. A., Young, R. H., and Scully, R. E. (1999). Ovarian serous borderline tumors with micropapillary and cribriform patterns: a study of 40 cases and comparison with 44 cases without these patterns. *Am J Surg Pathol* **23**, 397-409.
  175. Crispens, M. A., Bodurka, D., Deavers, M., Lu, K., Silva, E. G., and Gershenson, D. M. (2002). Response and survival in patients with progressive or recurrent serous ovarian tumors of low malignant potential. *Obstet Gynecol* **99**, 3-10.
  176. Seidman, J. D., and Kurman, R. J. (2002). Treatment of micropapillary serous ovarian carcinoma (the aggressive variant of serous borderline tumors). *Cancer* **95**, 675-6.
  177. Deavers, M. T., Gershenson, D. M., Tortolero-Luna, G., Malpica, A., Lu, K. H., and Silva, E. G. (2002). Micropapillary and cribriform patterns in ovarian serous tumors of low malignant potential: a study of 99 advanced stage cases. *Am J Surg Pathol* **26**, 1129-41.
  178. Smith Sehdev, A. E., Sehdev, P. S., and Kurman, R. J. (2003). Noninvasive and invasive micropapillary (low-grade) serous carcinoma of the ovary: a clinicopathologic analysis of 135 cases. *Am J Surg Pathol* **27**, 725-36.
  179. Zanetta, G., Rota, S., Chiari, S., Bonazzi, C., Bratina, G., and Mangioni, C. (2001). Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* **19**, 2658-64.
  180. Lee, K. R., Castrillon, D. H., and Nucci, M. R. (2001). Pathologic findings in eight cases of ovarian serous borderline tumors, three with foci of serous carcinoma, that preceded death or morbidity from invasive carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **20**, 329-34.
  181. Silva, E. G., Tornos, C., Zhuang, Z., Merino, M. J., and Gershenson, D. M. (1998). Tumor recurrence in stage I ovarian serous neoplasms of low malignant potential. *Int J Gynecol Pathol* **17**, 1-6.

182. Link, C. J., Jr., Kohn, E., and Reed, E. (1996). The relationship between borderline ovarian tumors and epithelial ovarian carcinoma: epidemiologic, pathologic, and molecular aspects. *Gynecol Oncol* **60**, 347-54.
183. Trope, C., and Kaern, J. (1998). Management of borderline tumors of the ovary: state of the art. *Semin Oncol* **25**, 372-80.
184. Silverberg, S. G. (2000). Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* **19**, 7-15.
185. Gardner, G. J., and Birrer, M. J. (2001). Ovarian tumors of low malignant potential: Can molecular biology solve this enigma? *J Natl Cancer Inst* **93**, 1122-3.
186. Fukumoto, M., and Nakayama, K. (2006). Ovarian epithelial tumors of low malignant potential: are they precursors of ovarian carcinoma? *Pathol Int* **56**, 233-9.
187. Mok, S. C., Bell, D. A., Knapp, R. C., Fishbaugh, P. M., Welch, W. R., Muto, M. G., Berkowitz, R. S., and Tsao, S. W. (1993). Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res.* **53**, 1489-92.
188. Singer, G., Stohr, R., Cope, L., Dehari, R., Hartmann, A., Cao, D. F., Wang, T. L., Kurman, R. J., and Shih Ie, M. (2005). Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol* **29**, 218-24.
189. Mayr, D., Hirschmann, A., Lohrs, U., and Diebold, J. (2006). KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol* **103**, 883-7.
190. Russell, S. E., and McCluggage, W. G. (2004). A multistep model for ovarian tumorigenesis: the value of mutation analysis in the KRAS and BRAF genes. *J Pathol* **203**, 617-9.

191. Fabjani, G., Kriegshaeuser, G., Schuetz, A., Prix, L., and Zeillinger, R. (2005). Biochip for K-ras mutation screening in ovarian cancer. *Clin Chem* **51**, 784-7.
192. Kim, Y. W., Srodon, M., and Bristow, R. E. (2005). Stage IV micropapillary serous ovarian carcinoma: a report of three cases. *Int J Gynecol Pathol* **24**, 235-8.
193. Shih Ie, M., and Kurman, R. J. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* **164**, 1511-8.
194. Sieben, N. L., Macropoulos, P., Roemen, G. M., Kolkman-Uljee, S. M., Jan Fleuren, G., Houmadi, R., Diss, T., Warren, B., Al Adnani, M., De Goeij, A. P., Krausz, T., and Flanagan, A. M. (2004). In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* **202**, 336-40.
195. Kurman, R. J., Seidman, J. D., and Shih, I. M. (2005). Serous borderline tumours of the ovary. *Histopathology* **47**, 310-5.
196. Feeley, K. M., and Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* **38**, 87-95.
197. Schuijjer, M., and Berns, E. M. (2003). TP53 and ovarian cancer. *Hum Mutat* **21**, 285-91.
198. Teneriello, M. G., Ebina, M., Linnoila, R. I., Henry, M., Nash, J. D., Park, R. C., and Birrer, M. J. (1993). p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res.* **53**, 3103-8.
199. Wertheim, I., Muto, M. G., Welch, W. R., Bell, D. A., Berkowitz, R. S., and Mok, S. C. (1994). p53 gene mutation in human borderline epithelial ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1549-51.
200. Singer, G., Kurman, R. J., Chang, H. W., Cho, S. K., and Shih Ie, M. (2002). Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol* **160**, 1223-8.
201. Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B. G., Sidransky, D., Kurman, R. J., and Shih Ie, M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the



- development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **95**, 484-6.
202. Staebler, A., Heselmeyer-Haddad, K., Bell, K., Riopel, M., Perlman, E., Ried, T., and Kurman, R. J. (2002). Micropapillary serous carcinoma of the ovary has distinct patterns of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization compared with atypical proliferative serous tumors and serous carcinomas. *Hum Pathol* **33**, 47-59.
203. Shih Ie, M., and Kurman, R. J. (2005). Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges. *Clin Cancer Res* **11**, 7273-9.
204. Bourne, T. H., Whitehead, M. I., Campbell, S., Royston, P., Bhan, V., and Collins, W. P. (1991). Ultrasound screening for familial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **43**, 92-7.
205. Horiuchi, A., Itoh, K., Shimizu, M., Nakai, I., Yamazaki, T., Kimura, K., Suzuki, A., Shiozawa, I., Ueda, N., and Konishi, I. (2003). Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. *Gynecol Oncol* **88**, 309-17.
206. Puls, L. E., Powell, D. E., DePriest, P. D., Gallion, H. H., Hunter, J. E., Kryscio, R. J., and van Nagell, J. R., Jr. (1992). Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecol Oncol* **47**, 53-7.
207. Marks, J. R., Davidoff, A. M., Kerns, B. J., Humphrey, P. A., Pence, J. C., Dodge, R. K., Clarke-Pearson, D. L., Iglehart, J. D., Bast, R. C., Jr., and Berchuck, A. (1991). Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* **51**, 2979-84.
208. Berchuck, A., Kohler, M. F., Hopkins, M. P., Humphrey, P. A., Robboy, S. J., Rodriguez, G. C., Soper, J. T., Clarke-Pearson, D. L., and Bast, R. C. (1994). Overexpression of p53 is not a feature of benign and early-stage borderline epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* **52**, 232-6.

209. Kmet, L. M., Cook, L. S., and Magliocco, A. M. (2003). A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer* **97**, 389-404.
210. Zheng, J., Benedict, W. F., Xu, H. J., Hu, S. X., Kim, T. M., Velicescu, M., Wan, M., Cofer, K. F., and Dubeau, L. (1995). Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *J Natl Cancer Inst* **87**, 1146-53.
211. Reed, M. J., Penn, P. E., Li, Y., Birnbaum, R., Vernon, R. B., Johnson, T. S., Pendergrass, W. R., Sage, E. H., Abrass, I. B., and Wolf, N. S. (1996). Enhanced cell proliferation and biosynthesis mediate improved wound repair in refed, caloric-restricted mice. *Mech Ageing Dev* **89**, 21-43.
212. Warrenfeltz, S., Pavlik, S., Datta, S., Kraemer, E. T., Benigno, B., and McDonald, J. F. (2004). Gene expression profiling of epithelial ovarian tumours correlated with malignant potential. *Mol Cancer* **3**, 27.
213. Tapper, J., Kettunen, E., El-Rifai, W., Seppala, M., Andersson, L. C., and Knuutila, S. (2001). Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **128**, 1-6.
214. Nnene, I. O., Nieto, J. J., Crow, J. C., Sundaresan, M., MacLean, A. B., Perrett, C. W., and Hardiman, P. (2004). Cell cycle and apoptotic proteins in relation to ovarian epithelial morphology. *Gynecol Oncol* **92**, 247-51.
215. Caduff, R. F., Svoboda-Newman, S. M., Ferguson, A. W., Johnston, C. M., and Frank, T. S. (1999). Comparison of mutations of Ki-RAS and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors. *Am J Surg Pathol* **23**, 323-8.
216. Singer, G., Shih Ie, M., Truskinovsky, A., Umudum, H., and Kurman, R. J. (2003). Mutational Analysis of K-ras Segregates Ovarian Serous Carcinomas into Two Types: Invasive MPSC (Low-grade Tumor) and Conventional Serous Carcinoma (High-grade Tumor). *Int J Gynecol Pathol* **22**, 37-41.
217. Haas, C. J., Diebold, J., Hirschmann, A., Rohrbach, H., and Lohrs, U. (1999). In serous ovarian neoplasms the frequency of Ki-ras mutations correlates with their malignant potential. *Virchows Arch* **434**, 117-20.

218. Dodson, M. K., Hartmann, L. C., Cliby, W. A., DeLacey, K. A., Keeney, G. L., Ritland, S. R., Su, J. Q., Podratz, K. C., and Jenkins, R. B. (1993). Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **53**, 4456-60.
219. Hauptmann, S., and Dietel, M. (2001). Serous tumors of low malignant potential of the ovary-molecular pathology: part 2. *Virchows Arch* **438**, 539-51.
220. Bast, R. C., Jr., Klug, T. L., St John, E., Jenison, E., Niloff, J. M., Lazarus, H., Berkowitz, R. S., Leavitt, T., Griffiths, C. T., Parker, L., Zurawski, V. R., Jr., and Knapp, R. C. (1983). A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **309**, 883-7.
221. Bast, R. C., Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L. M., Colvin, R. B., and Knapp, R. C. (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* **68**, 1331-7.
222. O'Brien, T. J., Beard, J. B., Underwood, L. J., Dennis, R. A., Santin, A. D., and York, L. (2001). The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol* **22**, 348-66.
223. Yin, B. W., and Lloyd, K. O. (2001). Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* **276**, 27371-5.
224. Patankar, M. S., Jing, Y., Morrison, J. C., Belisle, J. A., Lattanzio, F. A., Deng, Y., Wong, N. K., Morris, H. R., Dell, A., and Clark, G. F. (2005). Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol* **99**, 704-13.
225. Gogoi, R., Srinivasan, S., and Fishman, D. A. (2006). Progress in biomarker discovery for diagnostic testing in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* **6**, 627-37.
226. Chambers, J. T. (1989). Borderline ovarian tumors: a review of treatment. [Review]. *Yale Biol Med.* **62**, 351-65.
227. Colombo, N., Chiari, S., Maggioni, A., Bocciolone, L., Torri, V., and Mangioni, C. (1994). Controversial issues in the management of early

- epithelial ovarian cancer: conservative surgery and role of adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* **55**, S47-51.
228. Young, R. C., Walton, L. A., Ellenberg, S. S., Homesley, H. D., Wilbanks, G. D., Decker, D. G., Miller, A., Park, R., and Major, F., Jr. (1990). Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* **322**, 1021-7.
229. Richardson, G. S., Scully, R. E., Nikrui, N., and Nelson, J. H., Jr. (1985). Common epithelial cancer of the ovary (2). *N Engl J Med* **312**, 415-24.
230. Young, R. C. (2003). Early-stage ovarian cancer: to treat or not to treat. *J Natl Cancer Inst* **95**, 94-5.
231. Young, R. C., Brady, M. F., Nieberg, R. K., Long, H. J., Mayer, A. R., Lentz, S. S., Hurteau, J., and Alberts, D. S. (2003). Adjuvant treatment for early ovarian cancer: a randomized phase III trial of intraperitoneal 32P or intravenous cyclophosphamide and cisplatin--a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* **21**, 4350-5.
232. Trimbos, J. B., Parmar, M., Vergote, I., Guthrie, D., Bolis, G., Colombo, N., Vermorken, J. B., Torri, V., Mangioni, C., Pecorelli, S., Lissoni, A., and Swart, A. M. (2003). International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **95**, 105-12.
233. Trimbos, J. B., Vergote, I., Bolis, G., Vermorken, J. B., Mangioni, C., Madronal, C., Franchi, M., Tateo, S., Zanetta, G., Scarfone, G., Giurgea, L., Timmers, P., Coens, C., and Pecorelli, S. (2003). Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* **95**, 113-25.
234. Hacker, N. F., Berek, J. S., Lagasse, L. D., Nieberg, R. K., and Elashoff, R. M. (1983). Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* **61**, 413-20.

235. Heintz, A. P., Van Oosterom, A. T., Trimpos, J. B., Schaberg, A., Van der Velde, E. A., and Nooy, M. (1988). The treatment of advanced ovarian carcinoma (I): clinical variables associated with prognosis. *Gynecol Oncol* **30**, 347-58.
236. Heintz, A. P., Hacker, N. F., Berek, J. S., Rose, T. P., Munoz, A. K., and Lagasse, L. D. (1986). Cytoreductive surgery in ovarian carcinoma: feasibility and morbidity. *Obstet Gynecol* **67**, 783-8.
237. Vergote, I., De Brabanter, J., Fyles, A., Bertelsen, K., Einhorn, N., Sevelde, P., Gore, M. E., Kaern, J., Verrelst, H., Sjøvall, K., Timmerman, D., Vandewalle, J., Van Gramberen, M., and Trope, C. G. (2001). Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* **357**, 176-82.
238. Berek, J. S., Trope, C., and Vergote, I. (1999). Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol* **10 Suppl 1**, 3-7.
239. Bolis, G., Colombo, N., Pecorelli, S., Torri, V., Marsoni, S., Bonazzi, C., Chiari, S., Favalli, G., Mangili, G., Presti, M., and et al. (1995). Adjuvant treatment for early epithelial ovarian cancer: results of two randomised clinical trials comparing cisplatin to no further treatment or chromic phosphate (32P). G.I.C.O.G.: Gruppo Interregionale Collaborativo in Ginecologia Oncologica. *Ann Oncol* **6**, 887-93.
240. Aabo, K., Adams, M., Adnitt, P., Alberts, D. S., Athanazziou, A., Barley, V., Bell, D. R., Bianchi, U., Bolis, G., Brady, M. F., Brodovsky, H. S., Bruckner, H., Buyse, M., Canetta, R., Chylak, V., Cohen, C. J., Colombo, N., Conte, P. F., Crowther, D., Edmonson, J. H., Gennatas, C., Gilbey, E., Gore, M., Guthrie, D., Yeap, B. Y., and et al. (1998). Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. *Br J Cancer* **78**, 1479-87.
241. Rose, P. G., Fusco, N., Fluellen, L., and Rodriguez, M. (1998). Second-line therapy with paclitaxel and carboplatin for recurrent disease following first-

- line therapy with paclitaxel and platinum in ovarian or peritoneal carcinoma. *J Clin Oncol* **16**, 1494-7.
242. Dizon, D. S., Hensley, M. L., Poynor, E. A., Sabbatini, P., Aghajanian, C., Hummer, A., Venkatraman, E., and Spriggs, D. R. (2002). Retrospective analysis of carboplatin and paclitaxel as initial second-line therapy for recurrent epithelial ovarian carcinoma: application toward a dynamic disease state model of ovarian cancer. *J Clin Oncol* **20**, 1238-47.
243. Creasman, W. T., Park, R., Norris, H., Disaia, P. J., Morrow, C. P., and Hreshchyshyn, M. M. (1982). Stage I borderline ovarian tumors. *Obstet Gynecol* **59**, 93-6.
244. Kaern, J., Trope, C., Kjorstad, K. E., Abeler, V., and Pettersen, E. O. (1990). Cellular DNA content as a new prognostic tool in patients with borderline tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* **38**, 452-7.
245. Drescher, C. W., Flint, A., Hopkins, M. P., and Roberts, J. A. (1993). Prognostic significance of DNA content and nuclear morphology in borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol* **48**, 242-6.
246. Padberg, B. C., Arps, H., Franke, U., Thiedemann, C., Rehpenning, W., Stegner, H. E., Lietz, H., Schroder, S., and Dietel, M. (1992). DNA cytophotometry and prognosis in ovarian tumors of borderline malignancy. A clinicomorphologic study of 80 cases. *Cancer* **69**, 2510-4.
247. Dedrick, R. L., Myers, C. E., Bungay, P. M., and DeVita, V. T., Jr. (1978). Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat Rep* **62**, 1-11.
248. Myers, C. (1984). The use of intraperitoneal chemotherapy in the treatment of ovarian cancer. *Semin Oncol* **11**, 275-84.
249. McClay, E. F., and Howell, S. B. (1990). A review: intraperitoneal cisplatin in the management of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **36**, 1-6.
250. Piccart, M. J., Speyer, J. L., Markman, M., ten Bokkel Huinink, W. W., Alberts, D., Jenkins, J., and Muggia, F. (1985). Intraperitoneal chemotherapy: technical experience at five institutions. *Semin Oncol* **12**, 90-6.

251. Markman, M. (1998). Intraperitoneal therapy of ovarian cancer. *Semin Oncol* **25**, 356-60.
252. Barakat, R. R., Almadrones, L., Venkatraman, E. S., Aghajanian, C., Brown, C., Shapiro, F., Curtin, J. P., and Spriggs, D. (1998). A phase II trial of intraperitoneal cisplatin and etoposide as consolidation therapy in patients with Stage II-IV epithelial ovarian cancer following negative surgical assessment. *Gynecol Oncol* **69**, 17-22.
253. Howell, S. B., Zimm, S., Markman, M., Abramson, I. S., Cleary, S., Lucas, W. E., and Weiss, R. J. (1987). Long-term survival of advanced refractory ovarian carcinoma patients with small-volume disease treated with intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* **5**, 1607-12.
254. Alberts, D. S., Liu, P. Y., Hannigan, E. V., O'Toole, R., Williams, S. D., Young, J. A., Franklin, E. W., Clarke-Pearson, D. L., Malviya, V. K., and DuBeshter, B. (1996). Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Engl J Med* **335**, 1950-5.
255. Markman, M., Bundy, B. N., Alberts, D. S., Fowler, J. M., Clark-Pearson, D. L., Carson, L. F., Wadler, S., and SICKEL, J. (2001). Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* **19**, 1001-7.
256. Markman, M. (1991). Intraperitoneal chemotherapy. *Semin Oncol* **18**, 248-54.
257. Markman, M., Liu, P. Y., Wilczynski, S., Monk, B., Copeland, L. J., Alvarez, R. D., Jiang, C., and Alberts, D. (2003). Phase III randomized trial of 12 versus 3 months of maintenance paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer after complete response to platinum and paclitaxel-based chemotherapy: a Southwest Oncology Group and Gynecologic Oncology Group trial. *J Clin Oncol* **21**, 2460-5.

258. Markman, M., Brady, M. F., Spirto, N. M., Hanjani, P., and Rubin, S. C. (1998). Phase II trial of intraperitoneal paclitaxel in carcinoma of the ovary, tube, and peritoneum: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **16**, 2620-4.
259. Ozols, R. F. (2003). Maintenance therapy in advanced ovarian cancer: progression-free survival and clinical benefit. *J Clin Oncol* **21**, 2451-3.
260. Armstrong, D. K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H. Q., Baergen, R., Lele, S., Copeland, L. J., Walker, J. L., and Burger, R. A. (2006). Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* **354**, 34-43.
261. Dembo, A. J., Bush, R. S., Beale, F. A., Bean, H. A., Pringle, J. F., Sturgeon, J., and Reid, J. G. (1979). Ovarian carcinoma: improved survival following abdominopelvic irradiation in patients with a completed pelvic operation. *Am J Obstet Gynecol* **134**, 793-800.
262. Dembo, A. J. (1985). Abdominopelvic radiotherapy in ovarian cancer. A 10-year experience. *Cancer* **55**, 2285-90.
263. Hruby, G., Bull, C. A., Langlands, A. O., and Gebiski, V. (1997). WART revisited: the treatment of epithelial ovarian cancer by whole abdominal radiotherapy. *Australas Radiol* **41**, 276-80.
264. Therasse, P., Arbuck, S. G., Eisenhauer, E. A., Wanders, J., Kaplan, R. S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A. T., Christian, M. C., and Gwyther, S. G. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* **92**, 205-16.
265. Armstrong, D. K. (2002). Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease. *Oncologist* **7 Suppl 5**, 20-8.
266. McGuire, W. P., Hoskins, W. J., Brady, M. F., Kucera, P. R., Partridge, E. E., Look, K. Y., Clarke-Pearson, D. L., and Davidson, M. (1996). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *New Engl. J. Medicine* **334**, 1-6.



267. Neijt, J. P., Engelholm, S. A., Tuxen, M. K., Sorensen, P. G., Hansen, M., Sessa, C., de Swart, C. A., Hirsch, F. R., Lund, B., and van Houwelingen, H. C. (2000). Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* **18**, 3084-92.
268. Gronlund, B., Hogdall, C., Hansen, H. H., and Engelholm, S. A. (2001). Results of reinduction therapy with paclitaxel and carboplatin in recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **83**, 128-34.
269. Christian, M. C., and Korn, E. L. (1994). The limited precision of phase I trials. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1662-3.
270. Thigpen, J. T., Vance, R. B., and Khansur, T. (1993). Second-line chemotherapy for recurrent carcinoma of the ovary. *Cancer* **71**, 1559-64.
271. Kavanagh, J., Tresukosol, D., Edwards, C., Freedman, R., Gonzalez de Leon, C., Fishman, A., Mante, R., Hord, M., and Kudelka, A. (1995). Carboplatin reinduction after taxane in patients with platinum-refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* **13**, 1584-8.
272. Friedlander, M. L. (1998). Prognostic factors in ovarian cancer. *Semin Oncol* **25**, 305-14.
273. Griffiths, C. T., and Fuller, A. F. (1978). Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surg Clin North Am* **58**, 131-42.
274. Hoskins, W. J., McGuire, W. P., Brady, M. F., Homesley, H. D., Creasman, W. T., Berman, M., Ball, H., and Berek, J. S. (1994). The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* **170**, 974-9; discussion 979-80.
275. Potter, M. E., Partridge, E. E., Hatch, K. D., Soong, S. J., Austin, J. M., and Shingleton, H. M. (1991). Primary surgical therapy of ovarian cancer: how much and when. *Gynecol Oncol* **40**, 195-200.
276. Bristow, R. E., Tomacruz, R. S., Armstrong, D. K., Trimble, E. L., and Montz, F. J. (2002). Survival effect of maximal cytoreductive surgery for

- advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **20**, 1248-59.
277. Akahira, J. I., Yoshikawa, H., Shimizu, Y., Tsunematsu, R., Hirakawa, T., Kuramoto, H., Shiromizu, K., Kuzuya, K., Kamura, T., Kikuchi, Y., Kodama, S., Yamamoto, K., and Sato, S. (2001). Prognostic factors of stage IV epithelial ovarian cancer: a multicenter retrospective study. *Gynecol Oncol* **81**, 398-403.
278. Holschneider, C. H., and Berek, J. S. (2000). Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* **19**, 3-10.
279. Clark, T. G., Stewart, M. E., Altman, D. G., Gabra, H., and Smyth, J. F. (2001). A prognostic model for ovarian cancer. *Br J Cancer* **85**, 944-52.
280. Makar, A. P., Baekelandt, M., Trope, C. G., and Kristensen, G. B. (1995). The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **56**, 175-80.
281. Mayer, A. R., Chambers, S. K., Graves, E., Holm, C., Tseng, P. C., Nelson, B. E., and Schwartz, P. E. (1992). Ovarian cancer staging: does it require a gynecologic oncologist? *Gynecol Oncol* **47**, 223-7.
282. Zanetta, G., Rota, S., Chiari, S., Bonazzi, C., Bratina, G., Torri, V., and Mangioni, C. (1998). The accuracy of staging: an important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol* **9**, 1097-101.
283. Young, R. C., Decker, D. G., Wharton, J. T., Piver, M. S., Sindelar, W. F., Edwards, B. K., and Smith, J. P. (1983). Staging laparotomy in early ovarian cancer. *Jama* **250**, 3072-6.
284. Goff, B. A., Sainz de la Cuesta, R., Muntz, H. G., Fleischhacker, D., Ek, M., Rice, L. W., Nikrui, N., Tamimi, H. K., Cain, J. M., Greer, B. E., and Fuller, A. F., Jr. (1996). Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol* **60**, 412-7.

285. Pal, T., Permuth-Wey, J., Kapoor, R., Cantor, A., and Sutphen, R. (2006). Improved survival in BRCA2 carriers with ovarian cancer. *Fam Cancer*.
286. Ben David, Y., Chetrit, A., Hirsh-Yechezkel, G., Friedman, E., Beck, B. D., Beller, U., Ben-Baruch, G., Fishman, A., Levavi, H., Lubin, F., Menczer, J., Piura, B., Struewing, J. P., and Modan, B. (2002). Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol* **20**, 463-6.
287. Rubin, S. C., Benjamin, I., Behbakht, K., Takahashi, H., Morgan, M. A., LiVolsi, V. A., Berchuck, A., Muto, M. G., Garber, J. E., Weber, B. L., Lynch, H. T., and Boyd, J. (1996). Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1 [see comments]. *N Engl J Med* **335**, 1413-6.
288. Aida, H., Takakuwa, K., Nagata, H., Tsuneki, I., Takano, M., Tsuji, S., Takahashi, T., Sonoda, T., Hatae, M., Takahashi, K., Hasegawa, K., Mizunuma, H., Toyoda, N., Kamata, H., Torii, Y., Saito, N., Tanaka, K., Yakushiji, M., and Araki, T. (1998). Clinical features of ovarian cancer in Japanese women with germ-line mutations of BRCA1. *Clin Cancer Res* **4**, 235-40.
289. Cass, I., Baldwin, R. L., Varkey, T., Moslehi, R., Narod, S. A., and Karlan, B. Y. (2003). Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* **97**, 2187-95.
290. Boyd, J., Sonoda, Y., Federici, M. G., Bogomolny, F., Rhei, E., Maresco, D. L., Saigo, P. E., Almadrones, L. A., Barakat, R. R., Brown, C. L., Chi, D. S., Curtin, J. P., Poynor, E. A., and Hoskins, W. J. (2000). Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *Jama* **283**, 2260-5.
291. Johannsson, O. T., Ranstam, J., Borg, A., and Olsson, H. (1998). Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. *J Clin Oncol* **16**, 397-404.
292. Pharoah, P. D., Easton, D. F., Stockton, D. L., Gayther, S., and Ponder, B. A. (1999). Survival in familial, BRCA1-associated, and BRCA2-associated epithelial ovarian cancer. United Kingdom Coordinating Committee for

- Cancer Research (UKCCCR) Familial Ovarian Cancer Study Group. *Cancer Res* **59**, 868-71.
293. Taetle, R., Aickin, M., Yang, J. M., Panda, L., Emerson, J., Roe, D., Adair, L., Thompson, F., Liu, Y., Wisner, L., Davis, J. R., Trent, J., and Alberts, D. S. (1999). Chromosome abnormalities in ovarian adenocarcinoma: I. Nonrandom chromosome abnormalities from 244 cases. *Genes Chromosomes Cancer* **25**, 290-300.
294. Watson, R. H., Neville, P. J., Roy, W. J., Jr., Hitchcock, A., and Campbell, I. G. (1998). Loss of heterozygosity on chromosomes 7p, 7q, 9p and 11q is an early event in ovarian tumorigenesis. *Oncogene* **17**, 207-12.
295. Gallion, H. H., Powell, D. E., Morrow, J. K., Pieretti, M., Case, E., Turker, M. S., DePriest, P. D., Hunter, J. E., and van Nagell, J. R., Jr. (1992). Molecular genetic changes in human epithelial ovarian malignancies. *Gynecol Oncol* **47**, 137-42.
296. Zheng, J. P., Robinson, W. R., Ehlen, T., Yu, M. C., and Dubeau, L. (1991). Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res.* **51**, 4045-51.
297. Presneau, N., Dewar, K., Forgetta, V., Provencher, D., Mes-Masson, A. M., and Tonin, P. N. (2005). Loss of heterozygosity and transcriptome analyses of a 1.4 MB candidate ovarian cancer tumor suppressor locus region at 17q25.1-q25.2. *Mol Carcinog* **In press**.
298. Lounis, H., Mes-Masson, A.-M., Dion, F., Bradley, W. E., Seymour, R. J., Provencher, D., and Tonin, P. (1998). Mapping of chromosome arm 3p deletions in unselected human epithelial ovarian cancers. *Oncogene* **17**, 2359-2366.
299. Yang-Feng, T. L., Han, H., Chen, K. C., Li, S. B., Claus, E. B., Carcangiu, M. L., Chambers, S. K., Chambers, J. T., and Schwartz, P. E. (1993). Allelic loss in ovarian cancer. *International Journal of Cancer* **54**, 546-51.
300. Manderson, E. N., Presneau, N., Provencher, D., Mes-Masson, A. M., and Tonin, P. N. (2002). Comparative analysis of loss of heterozygosity of

- specific chromosome 3, 13, 17, and X loci and TP53 mutations in human epithelial ovarian cancer. *Mol Carcinog* **34**, 78-90.
301. Fullwood, P., Marchini, S., Rader, J. S., Martinez, A., Macartney, D., Broggin, M., Morelli, C., Barbanti-Brodano, G., Maher, E. R., and Latif, F. (1999). Detailed genetic and physical mapping of tumor suppressor loci on chromosome 3p in ovarian cancer. *Cancer Res* **59**, 4662-7.
302. Wang, N. (2002). Cytogenetics and molecular genetics of ovarian cancer. *Am J Med Genet* **115**, 157-63.
303. Cvetkovic, D. (2003). Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 68.
304. Tanner, M. M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A., and Isola, J. J. (2000). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 1833-9.
305. Arcand, S. L., Mes-Masson, A. M., Provencher, D., Hudson, T. J., and Tonin, P. N. (2004). Gene expression microarray analysis and genome databases facilitate the characterization of a chromosome 22 derived homogeneously staining region. *Mol Carcinog* **41**, 17-38.
306. Berchuck, A. (1995). Biomarkers in the ovary. *J Cell Biochem Suppl* **23**, 223-6.
307. Berchuck, A., Kohler, M. F., and Bast, R. C., Jr. (1992). Oncogenes in ovarian cancer. [Review]. *Hematology - Oncology Clinics of North America* **6**, 813-27.
308. Berchuck, A., Elbendary, A., Havrilesky, L., Rodriguez, G. C., and Bast, R. C., Jr. (1994). Pathogenesis of ovarian cancers. *J Soc Gynecol Investig* **1**, 181-90.
309. Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-92.
310. Wenham, R. M., Lancaster, J. M., and Berchuck, A. (2002). Molecular aspects of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **16**, 483-97.

311. Fujita, M., Enomoto, T., Yoshino, K., Nomura, T., Buzard, G. S., Inoue, M., and Okudaira, Y. (1995). Microsatellite instability and alterations in the hMSH2 gene in human ovarian cancer. *Int J Cancer* **64**, 361-6.
312. Jhanwar-Uniyal, M. (2003). BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability. *Front Biosci* **8**, s1107-17.
313. Geisler, J. P., Hatterman-Zogg, M. A., Rathe, J. A., and Buller, R. E. (2002). Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**, 61-7.
314. Zheng, W., Luo, F., Lu, J. J., Baltayan, A., Press, M. F., Zhang, Z. F., and Pike, M. C. (2000). Reduction of BRCA1 expression in sporadic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **76**, 294-300.
315. Russell, P. A., Pharoah, P. D., De Foy, K., Ramus, S. J., Symmonds, I., Wilson, A., Scott, I., Ponder, B. A., and Gayther, S. A. (2000). Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int J Cancer* **87**, 317-21.
316. Chan, K. Y., Ozcelik, H., Cheung, A. N., Ngan, H. Y., and Khoo, U. S. (2002). Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* **62**, 4151-6.
317. Mueller, C. R., and Roskelley, C. D. (2003). Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* **5**, 45-52.
318. Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C. F., and Solomon, E. (1999). Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* **18**, 1957-65.
319. Atlas, E., Stramwasser, M., Whiskin, K., and Mueller, C. R. (2000). GA-binding protein alpha/beta is a critical regulator of the BRCA1 promoter. *Oncogene* **19**, 1933-40.
320. Beger, C., Pierce, L. N., Kruger, M., Marcusson, E. G., Robbins, J. M., Welch, P., Welch, P. J., Welte, K., King, M. C., Barber, J. R., and Wong-Staal, F. (2001). Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by

- using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 130-5.
321. Yu, Y. H., Xu, F. J., Peng, H. Q., Fang, X. J., Zhao, S. L., Li, Y., Cuevas, B., Kuo, W. L., Gray, J. W., Siciliano, M., Mills, G. B., and Bast, R. C. (1999). NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 214-219.
322. Peng, H., Xu, F., Pershad, R., Hunt, K. K., Frazier, M. L., Berchuck, A., Gray, J. W., Hogg, D., Bast, R. C., Jr., and Yu, Y. (2000). ARHI is the center of allelic deletion on chromosome 1p31 in ovarian and breast cancers. *Int J Cancer* **86**, 690-4.
323. Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286-98.
324. Boente, M. P., Hurteau, J., Rodriguez, G. C., Bast, R. C., Jr., and Berchuck, A. (1993). The biology of ovarian cancer. *Curr Opin Oncol* **5**, 900-7.
325. Berchuck, A., and Carney, M. (1997). Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochem Pharmacol* **54**, 541-4.
326. Kruk, P. A., Maines-Bandiera, S. L., and Auersperg, N. (1990). A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab. Invest.* **63**, 132-6.
327. Lounis, H., Provencher, D., Godbout, C., Fink, D., Milot, M. J., and Mes-Masson, A. M. (1994). Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp. Cell Res.* **215**, 303-9.
328. Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S. S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J. C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T. G., Weinstein, J. N., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* **24**, 227-35.
329. Tonin, P. N., Hudson, T. J., Rodier, F., Bossolasco, M., Lee, P. D., Novak, J., Manderson, E. N., Provencher, D., and Mes-Masson, A. M. (2001).

- Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene* **20**, 6617-26.
330. Provencher, D. M., Lounis, H., Champoux, L., Tetrault, M., Manderson, E. N., Wang, J. C., Eydoux, P., Savoie, R., Tonin, P. N., and Mes-Masson, A. M. (2000). Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**, 357-61.
331. Wen, W. H., Bernstein, L., Lescallett, J., Beazer-Barclay, Y., Sullivan-Halley, J., White, M., and Press, M. F. (2000). Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res* **60**, 2716-22.
332. Simone, N. L., Paweletz, C. P., Charboneau, L., Petricoin, E. F., 3rd, and Liotta, L. A. (2000). Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics. *Mol Diagn* **5**, 301-7.
333. Sutherland, R. M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**, 177-84.
334. Zietarska, M., Maugard, C. M., Filali-Mouhim, A., Alam-Fahmy, M., Tonin, P. N., Provencher, D. M., and Mes-Masson, A. M. (2007). Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog*.
335. Connolly, D. C., Bao, R., Nikitin, A. Y., Stephens, K. C., Poole, T. W., Hua, X., Harris, S. S., Vanderhyden, B. C., and Hamilton, T. C. (2003). Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **63**, 1389-97.
336. Dinulescu, D. M., Ince, T. A., Quade, B. J., Shafer, S. A., Crowley, D., and Jacks, T. (2005). Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* **11**, 63-70.
337. Flesken-Nikitin, A., Choi, K. C., Eng, J. P., Shmidt, E. N., and Nikitin, A. Y. (2003). Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium. *Cancer Res* **63**, 3459-63.
338. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.



339. Schwartz, D. R., Kardia, S. L., Shedden, K. A., Kuick, R., Michailidis, G., Taylor, J. M., Misek, D. E., Wu, R., Zhai, Y., Darrah, D. M., Reed, H., Ellenson, L. H., Giordano, T. J., Fearon, E. R., Hanash, S. M., and Cho, K. R. (2002). Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res* **62**, 4722-9.
340. Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., and Nakamura, Y. (2000). Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* **60**, 5007-11.
341. Heller, M. J. (2002). DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* **4**, 129-53.
342. Tamayo, P., Slonim, D., Mesirov, J., Zhu, Q., Kitareewan, S., Dmitrovsky, E., Lander, E. S., and Golub, T. R. (1999). Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2907-12.
343. Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5116-21.
344. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
345. Mocellin, S., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D., and Marincola, F. M. (2003). Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med* **9**, 189-95.
346. Gollub, J., Ball, C. A., Binkley, G., Demeter, J., Finkelstein, D. B., Hebert, J. M., Hernandez-Boussard, T., Jin, H., Kaloper, M., Matese, J. C., Schroeder, M., Brown, P. O., Botstein, D., and Sherlock, G. (2003). The Stanford Microarray Database: data access and quality assessment tools. *Nucleic Acids Res* **31**, 94-6.

347. Moreau, Y., Aerts, S., De Moor, B., De Strooper, B., and Dabrowski, M. (2003). Comparison and meta-analysis of microarray data: from the bench to the computer desk. *Trends Genet* **19**, 570-7.
348. Le Page, C., Provencher, D., Maugard, C. M., Ouellet, V., and Mes-Masson, A. M. (2004). Signature of a silent killer: expression profiling in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* **4**, 157-67.
349. Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., and Vingron, M. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**, 365-71.
350. Song, M., Ramaswamy, S., Ramachandran, S., Flowers, L. C., Horowitz, I. R., Rock, J. A., and Parthasarathy, S. (2001). Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9265-70.
351. Meinhold-Heerlein, I., Bauerschlag, D., Hilpert, F., Dimitrov, P., Sapinoso, L. M., Orlowska-Volk, M., Bauknecht, T., Park, T. W., Jonat, W., Jacobsen, A., Sehouli, J., Luttes, J., Krajewski, M., Krajewski, S., Reed, J. C., Arnold, N., and Hampton, G. M. (2005). Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential. *Oncogene* **24**, 1053-65.
352. Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., and Chinnaiyan, A. M. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9309-14.
353. Gilks, C. B., Vanderhyden, B. C., Zhu, S., van de Rijn, M., and Longacre, T. A. (2005). Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* **96**, 684-94.

354. Welsh, J. B., Zarrinkar, P. P., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Behling, C. A., Monk, B. J., Lockhart, D. J., Burger, R. A., and Hampton, G. M. (2001). Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1176-81.
355. Mok, S. C., Chao, J., Skates, S., Wong, K., Yiu, G. K., Muto, M. G., Berkowitz, R. S., and Cramer, D. W. (2001). Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1458-64.
356. Kim, J. H., Skates, S. J., Uede, T., Wong, K. K., Schorge, J. O., Feltmate, C. M., Berkowitz, R. S., Cramer, D. W., and Mok, S. C. (2002). Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *Jama* **287**, 1671-9.
357. Mor, G., Visintin, I., Lai, Y., Zhao, H., Schwartz, P., Rutherford, T., Yue, L., Bray-Ward, P., and Ward, D. C. (2005). Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7677-82.
358. Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J. A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., and Hellstrom, K. E. (2003). The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* **63**, 3695-700.
359. Le Page, C., Ouellet, V., Madore, J., Hudson, T. J., Tonin, P. N., Provencher, D. M., and Mes-Masson, A. M. (2006). From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* **118**, 1750-8.
360. Ouellet, V., Provencher, D. M., Maugard, C. M., Le Page, C., Ren, F., Lussier, C., Novak, J., Ge, B., Hudson, T. J., Tonin, P. N., and Mes-Masson, A. M. (2005). Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* **24**, 4672-4687.
361. Ouellet, V., Guyot, M. C., Le Page, C., Filali-Mouhim, A., Lussier, C., Tonin, P. N., Provencher, D. M., and Mes-Masson, A. M. (2006). Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated

- with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* **119**, 599-607.
362. Mayr, D., Kanitz, V., Anderegg, B., Luthardt, B., Engel, J., Lohrs, U., Amann, G., and Diebold, J. (2006). Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays. *Am J Clin Pathol* **126**, 101-9.
363. Lancaster, J. M., Dressman, H. K., Whitaker, R. S., Havrilesky, L., Gray, J., Marks, J. R., Nevins, J. R., and Berchuck, A. (2004). Gene expression patterns that characterize advanced stage serous ovarian cancers. *J Soc Gynecol Investig* **11**, 51-9.
364. Berchuck, A., Iversen, E. S., Lancaster, J. M., Pittman, J., Luo, J., Lee, P., Murphy, S., Dressman, H. K., Febbo, P. G., West, M., Nevins, J. R., and Marks, J. R. (2005). Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clin Cancer Res* **11**, 3686-96.
365. Sakamoto, M., Kondo, A., Kawasaki, K., Goto, T., Sakamoto, H., Miyake, K., Koyamatsu, Y., Akiya, T., Iwabuchi, H., Muroya, T., Ochiai, K., Tanaka, T., Kikuchi, Y., and Tenjin, Y. (2001). Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell* **14**, 305-15.
366. Selvanayagam, Z. E., Cheung, T. H., Wei, N., Vittal, R., Lo, K. W., Yeo, W., Kita, T., Ravatn, R., Chung, T. K., Wong, Y. F., and Chin, K. V. (2004). Prediction of chemotherapeutic response in ovarian cancer with DNA microarray expression profiling. *Cancer Genet Cytogenet* **154**, 63-6.
367. Goto, T., Takano, M., Sakamoto, M., Kondo, A., Hirata, J., Kita, T., Tsuda, H., Tenjin, Y., and Kikuchi, Y. (2006). Gene expression profiles with cDNA microarray reveal RhoGDI as a predictive marker for paclitaxel resistance in ovarian cancers. *Oncol Rep* **15**, 1265-71.
368. De Smet, F., Pochet, N. L., Engelen, K., Van Gorp, T., Van Hummelen, P., Marchal, K., Amant, F., Timmerman, D., De Moor, B. L., and Vergote, I. B.

- (2006). Predicting the clinical behavior of ovarian cancer from gene expression profiles. *Int J Gynecol Cancer* **16 Suppl 1**, 147-51.
369. Roberts, D., Schick, J., Conway, S., Biade, S., Laub, P. B., Stevenson, J. P., Hamilton, T. C., O'Dwyer, P. J., and Johnson, S. W. (2005). Identification of genes associated with platinum drug sensitivity and resistance in human ovarian cancer cells. *Br J Cancer* **92**, 1149-58.
370. Bachvarov, D., L'Esperance, S., Popa, I., Bachvarova, M., Plante, M., and Tetu, B. (2006). Gene expression patterns of chemoresistant and chemosensitive serous epithelial ovarian tumors with possible predictive value in response to initial chemotherapy. *Int J Oncol* **29**, 919-33.
371. Ouellet, V., Le Page, C., Guyot, M. C., Lussier, C., Tonin, P. N., Provencher, D. M., and Mes-Masson, A. M. (2006). SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* **119**, 2119-26.
372. Ouellet, V., Le Page, C., Madore, J., Guyot, M. C., Barres, V., Lussier, C., Tonin, P. N., Provencher, D. M., and Mes-Masson, A. M. (2007). An apoptotic molecular network identified by microarray: On the TRAIL to new insights in epithelial ovarian cancer. *Cancer*.
373. Diallo, J. S., Aldejmah, A., Filali-Mouhim, A., Péant, B., Alam-Fahmy, M., Koumakpayi, I. H., Sircar, K., Bégin, L. R., Mes-Masson, A. M., and Saad, F. (2007). NOXA and PUMA Expression Add to Clinical Markers in Predicting Biochemical Recurrence of Prostate Cancer Patients in a Survival Tree Model. *Clin Cancer Res* **In Press**.
374. Wagner, K. W., Sapinoso, L. M., El-Rifai, W., Frierson, H. F., Butz, N., Mestan, J., Hofmann, F., Deveraux, Q. L., and Hampton, G. M. (2004). Overexpression, genomic amplification and therapeutic potential of inhibiting the UbcH10 ubiquitin conjugase in human carcinomas of diverse anatomic origin. *Oncogene* **23**, 6621-9.
375. Pallante, P., Berlingieri, M. T., Troncone, G., Kruhoffer, M., Orntoft, T. F., Viglietto, G., Caleo, A., Migliaccio, I., Decaussin-Petrucci, M., Santoro, M., Palombini, L., and Fusco, A. (2005). UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* **93**, 464-71.

376. Okamoto, Y., Ozaki, T., Miyazaki, K., Aoyama, M., Miyazaki, M., and Nakagawara, A. (2003). UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res* **63**, 4167-73.
377. Berlingieri, M. T., Pallante, P., Guida, M., Nappi, C., Masciullo, V., Scambia, G., Ferraro, A., Leone, V., Sboner, A., Barbareschi, M., Ferro, A., Troncone, G., and Fusco, A. (2007). UbcH10 expression may be a useful tool in the prognosis of ovarian carcinomas. *Oncogene* **26**, 2136-40.
378. Kettunen, E., Anttila, S., Seppanen, J. K., Karjalainen, A., Edgren, H., Lindstrom, I., Salovaara, R., Nissen, A. M., Salo, J., Mattson, K., Hollmen, J., Knuutila, S., and Wikman, H. (2004). Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **149**, 98-106.
379. Wikman, H., Kettunen, E., Seppanen, J. K., Karjalainen, A., Hollmen, J., Anttila, S., and Knuutila, S. (2002). Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene* **21**, 5804-13.
380. Koon, N., Schneider-Stock, R., Sarlomo-Rikala, M., Lasota, J., Smolkin, M., Petroni, G., Zaika, A., Boltze, C., Meyer, F., Andersson, L., Knuutila, S., Miettinen, M., and El-Rifai, W. (2004). Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut* **53**, 235-40.
381. Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J., and Hunt, T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4344-9.
382. Spruck, C. H., Won, K. A., and Reed, S. I. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* **401**, 297-300.
383. Boulaire, J., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2000). The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)* **48**, 190-202.
384. Macaluso, M., Montanari, M., Cinti, C., and Giordano, A. (2005). Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol* **32**, 452-7.

385. Edmonston, T. B., Cuesta, K. H., Burkholder, S., Barusevicius, A., Rose, D., Kovatich, A. J., Boman, B., Fry, R., Fishel, R., and Palazzo, J. P. (2000). Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* **31**, 1506-14.
386. Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G. J., Ogawa, A., Dorfman, I., Loda, M., and Fuchs, C. S. (2006). Down-regulation of p21 (CDKN1A/CIP1) is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *J Pathol* **210**, 147-54.
387. Kim, T. K. (1997). In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 300-2.
388. Bukholm, I. K., Nesland, J. M., Karesen, R., Jacobsen, U., and Borresen, A. L. (1997). Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. *J Pathol* **181**, 140-5.
389. Shannon, B. A., and Iacopetta, B. J. (2001). Methylation of the hMLH1, p16, and MDR1 genes in colorectal carcinoma: associations with clinicopathological features. *Cancer Lett* **167**, 91-7.
390. Xu, X. L., Yu, J., Zhang, H. Y., Sun, M. H., Gu, J., Du, X., Shi, D. R., Wang, P., Yang, Z. H., and Zhu, J. D. (2004). Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* **10**, 3441-54.
391. Hashiguchi, Y., Tsuda, H., Inoue, T., Nishimura, S., Suzuki, T., and Kawamura, N. (2004). Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients. *Hum Pathol* **35**, 165-75.
392. Grabsch, H., Dattani, M., Barker, L., Maughan, N., Maude, K., Hansen, O., Gabbert, H. E., Quirke, P., and Mueller, W. (2006). Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 1494-500.
393. Gumy-Pause, F., Wacker, P., Maillet, P., Betts, D. R., and Sappino, A. P. (2006). ATM alterations in childhood non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* **166**, 101-11.

394. Waha, A., Sturme, C., Kessler, A., Koch, A., Kreyer, E., Fimmers, R., Wiestler, O. D., von Deimling, A., Krebs, D., and Schmutzler, R. K. (1998). Expression of the ATM gene is significantly reduced in sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer* **78**, 306-9.
395. Ye, C., Cai, Q., Dai, Q., Shu, X. O., Shin, A., Gao, Y. T., and Zheng, W. (2007). Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Cancer* **109**, 1729-35.
396. Tort, F., Hernandez, S., Bea, S., Camacho, E., Fernandez, V., Esteller, M., Fraga, M. F., Burek, C., Rosenwald, A., Hernandez, L., and Campo, E. (2005). Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* **19**, 112-7.
397. Tao, Z. F., and Lin, N. H. (2006). Chk1 inhibitors for novel cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem* **6**, 377-88.
398. Bertoni, F., Codegani, A. M., Furlan, D., Tibiletti, M. G., Capella, C., and Broggin, M. (1999). CHK1 frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **26**, 176-80.
399. Menoyo, A., Alazzouzi, H., Espin, E., Armengol, M., Yamamoto, H., and Schwartz, S., Jr. (2001). Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res* **61**, 7727-30.
400. Vassileva, V., Millar, A., Briollais, L., Chapman, W., and Bapat, B. (2002). Genes involved in DNA repair are mutational targets in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* **62**, 4095-9.
401. Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**, 421-9.
402. Tort, F., Hernandez, S., Bea, S., Martinez, A., Esteller, M., Herman, J. G., Puig, X., Camacho, E., Sanchez, M., Nayach, I., Lopez-Guillermo, A., Fernandez, P. L., Colomer, D., Hernandez, L., and Campo, E. (2002). CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **100**, 4602-8.



403. Sullivan, A., Yuille, M., Repellin, C., Reddy, A., Reelfs, O., Bell, A., Dunne, B., Gusterson, B. A., Osin, P., Farrell, P. J., Yulug, I., Evans, A., Ozcelik, T., Gasco, M., and Crook, T. (2002). Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* **21**, 1316-24.
404. Haruki, N., Saito, H., Tatematsu, Y., Konishi, H., Harano, T., Masuda, A., Osada, H., Fujii, Y., and Takahashi, T. (2000). Histological type-selective, tumor-predominant expression of a novel CHK1 isoform and infrequent in vivo somatic CHK2 mutation in small cell lung cancer. *Cancer Res* **60**, 4689-92.
405. Reddy, A., Yuille, M., Sullivan, A., Repellin, C., Bell, A., Tidy, J. A., Evans, D. J., Farrell, P. J., Gusterson, B., Gasco, M., and Crook, T. (2002). Analysis of CHK2 in vulval neoplasia. *Br J Cancer* **86**, 756-60.
406. Miller, C. W., Ikezoe, T., Krug, U., Hofmann, W. K., Tavor, S., Vegesna, V., Tsukasaki, K., Takeuchi, S., and Koeffler, H. P. (2002). Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **33**, 17-21.
407. Hofmann, W. K., Miller, C. W., Tsukasaki, K., Tavor, S., Ikezoe, T., Hoelzer, D., Takeuchi, S., and Koeffler, H. P. (2001). Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene CHK2 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leuk Res* **25**, 333-8.
408. Kristjansdottir, K., and Rudolph, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol* **11**, 1043-51.
409. Bjorck, E., Ek, S., Landgren, O., Jerkeman, M., Ehinger, M., Bjorkholm, M., Borrebaeck, C. A., Porwit-MacDonald, A., and Nordenskjold, M. (2005). High expression of cyclin B1 predicts a favorable outcome in patients with follicular lymphoma. *Blood* **105**, 2908-15.
410. Bonome, T., Lee, J. Y., Park, D. C., Radonovich, M., Pise-Masison, C., Brady, J., Gardner, G. J., Hao, K., Wong, W. H., Barrett, J. C., Lu, K. H., Sood, A. K., Gershenson, D. M., Mok, S. C., and Birrer, M. J. (2005). Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res* **65**, 10602-12.

411. Strebhardt, K., and Ullrich, A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 321-30.
412. Schummer, M., Ng, W. V., Bumgarner, R. E., Nelson, P. S., Schummer, B., Bednarski, D. W., Hassell, L., Baldwin, R. L., Karlan, B. Y., and Hood, L. (1999). Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* **238**, 375-85.
413. Lee, H. (2003). Impaired phosphorylation and mis-localization of Bub1 and BubR1 are responsible for the defective mitotic checkpoint function in Brca2-mutant thymic lymphomas. *Exp Mol Med* **35**, 448-53.
414. Grabsch, H., Takeno, S., Parsons, W. J., Pomjanski, N., Boecking, A., Gabbert, H. E., and Mueller, W. (2003). Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *J Pathol* **200**, 16-22.
415. Yuan, B., Xu, Y., Woo, J. H., Wang, Y., Bae, Y. K., Yoon, D. S., Wersto, R. P., Tully, E., Wilsbach, K., and Gabrielson, E. (2006). Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res* **12**, 405-10.
416. Yang, S., Jeung, H. C., Jeong, H. J., Choi, Y. H., Kim, J. E., Jung, J. J., Rha, S. Y., Yang, W. I., and Chung, H. C. (2007). Identification of genes with correlated patterns of variations in DNA copy number and gene expression level in gastric cancer. *Genomics* **89**, 451-9.
417. Yamamoto, Y., Matsuyama, H., Chochi, Y., Okuda, M., Kawauchi, S., Inoue, R., Furuya, T., Oga, A., Naito, K., and Sasaki, K. (2007). Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **174**, 42-7.
418. Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S. W., and Cordon-Cardo, C. (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* **430**, 797-802.

419. Mondal, G., Sengupta, S., Panda, C. K., Gollin, S. M., Saunders, W. S., and Roychoudhury, S. (2007). Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis* **28**, 81-92.
420. Li, D., Zhu, J., Firozi, P. F., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Cleary, K., Friess, H., and Sen, S. (2003). Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 991-7.
421. Singhal, S., Amin, K. M., Kruklitis, R., DeLong, P., Friscia, M. E., Litzky, L. A., Putt, M. E., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M. (2003). Alterations in cell cycle genes in early stage lung adenocarcinoma identified by expression profiling. *Cancer Biol Ther* **2**, 291-8.
422. Kim, J. M., Sohn, H. Y., Yoon, S. Y., Oh, J. H., Yang, J. O., Kim, J. H., Song, K. S., Rho, S. M., Yoo, H. S., Kim, Y. S., Kim, J. G., and Kim, N. S. (2005). Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* **11**, 473-82.
423. Kawakami, K., Enokida, H., Tachiwada, T., Nishiyama, K., Seki, N., and Nakagawa, M. (2007). Increased SKP2 and CKS1 gene expression contributes to the progression of human urothelial carcinoma. *J Urol* **178**, 301-7.
424. Adib, T. R., Henderson, S., Perrett, C., Hewitt, D., Bourmpoulia, D., Ledermann, J., and Boshoff, C. (2004). Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays. *Br J Cancer* **90**, 686-92.
425. Tsai, Y. S., Chang, H. C., Chuang, L. Y., and Hung, W. C. (2005). RNA silencing of Cks1 induced G2/M arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *IUBMB Life* **57**, 583-9.
426. Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Bashir, T., Kitagawa, M., Miyauchi, M., Pagano, M., and Takata, T. (2004). Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation. *Am J Pathol* **165**, 2147-55.

427. Inui, N., Kitagawa, K., Miwa, S., Hattori, T., Chida, K., Nakamura, H., and Kitagawa, M. (2003). High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 978-84.
428. Lin, S. C., Wang, C. P., Chen, Y. M., Lu, S. Y., Fann, M. J., Liu, C. J., Kao, S. Y., and Chang, K. W. (2002). Regulation of IGFBP-5 expression during tumorigenesis and differentiation of oral keratinocytes. *J Pathol* **198**, 317-25.
429. Uchikado, Y., Inoue, H., Haraguchi, N., Mimori, K., Natsugoe, S., Okumura, H., Aikou, T., and Mori, M. (2006). Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **29**, 1337-47.
430. Kawakami, K., Enokida, H., Tachiwada, T., Gotanda, T., Tsuneyoshi, K., Kubo, H., Nishiyama, K., Takiguchi, M., Nakagawa, M., and Seki, N. (2006). Identification of differentially expressed genes in human bladder cancer through genome-wide gene expression profiling. *Oncol Rep* **16**, 521-31.
431. Vlotides, G., Eigler, T., and Melmed, S. (2007). Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev* **28**, 165-86.
432. Dorsett, Y., and Tuschl, T. (2004). siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 318-29.
433. Mittal, V. (2004). Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* **5**, 355-65.
434. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-82.
435. Demonty, G., Bernard-Marty, C., Puglisi, F., Mancini, I., and Piccart, M. (2007). Progress and new standards of care in the management of HER-2 positive breast cancer. *Eur J Cancer* **43**, 497-509.
436. Meric-Bernstam, F., and Hung, M. C. (2006). Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **12**, 6326-30.
437. Ma, P. C., Jagadeeswaran, R., Jagadeesh, S., Tretiakova, M. S., Nallasura, V., Fox, E. A., Hansen, M., Schaefer, E., Naoki, K., Lader, A., Richards, W.,

- Sugarbaker, D., Husain, A. N., Christensen, J. G., and Salgia, R. (2005). Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **65**, 1479-88.
438. Saitoh, K., Takahashi, H., Sawada, N., and Parsons, P. G. (1994). Detection of the c-met proto-oncogene product in normal skin and tumours of melanocytic origin. *J Pathol* **174**, 191-9.
439. Koumakpayi, I. H., Diallo, J. S., Le Page, C., Lessard, L., Gleave, M., Begin, L. R., Mes-Masson, A. M., and Saad, F. (2006). Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 2730-7.
440. Oksvold, M., Huitfeldt, H., Stang, E., and Madshus, I. (2002). Localizing the EGF receptor. *Nat Cell Biol* **4**, E22; author reply E22-3.
441. Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., and Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* **3**, 802-8.
442. Raabe, T. D., Deadwyler, G., Varga, J. W., and Devries, G. H. (2004). Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia* **45**, 197-207.
443. Hughes, D. P., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Baker, L. H., and McDonagh, K. T. (2004). Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and Her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma. *Cancer Res* **64**, 2047-53.
444. Waugh, M. G., and Hsuan, J. J. (2001). EGF receptors as transcription factors: ridiculous or sublime? *Nat Cell Biol* **3**, E209-11.
445. Offterdinger, M., Schofer, C., Weipoltshammer, K., and Grunt, T. W. (2002). c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* **157**, 929-39.
446. Azuma, K., Sasada, T., Takedatsu, H., Shomura, H., Koga, M., Maeda, Y., Yao, A., Hirai, T., Takabayashi, A., Shichijo, S., and Itoh, K. (2004). Ran, a small GTPase gene, encodes cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes capable

- of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin Cancer Res* **10**, 6695-702.
447. Di Fiore, B., Ciciarello, M., and Lavia, P. (2004). Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* **3**, 305-13.
448. Sazer, S., and Dasso, M. (2000). The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* **113** ( Pt 7), 1111-8.
449. Moore, J. D. (2001). The Ran-GTPase and cell-cycle control. *Bioessays* **23**, 77-85.
450. De Luca, A., Mangiacasale, R., Severino, A., Malquori, L., Baldi, A., Palena, A., Mileo, A. M., Lavia, P., and Paggi, M. G. (2003). E1A deregulates the centrosome cycle in a Ran GTPase-dependent manner. *Cancer Res* **63**, 1430-7.
451. Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P., and Munger, K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10002-7.
452. Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P., and Munger, K. (2001). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* **61**, 2356-60.
453. Guarguaglini, G., Renzi, L., D'Ottavio, F., Di Fiore, B., Casenghi, M., Cundari, E., and Lavia, P. (2000). Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. *Cell Growth Differ* **11**, 455-65.
454. Moore, W., Zhang, C., and Clarke, P. R. (2002). Targeting of RCC1 to chromosomes is required for proper mitotic spindle assembly in human cells. *Curr Biol* **12**, 1442-7.
455. Di Fiore, B., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Tassin, A. M., Cundari, E., and Lavia, P. (2003). Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. *J Cell Sci* **116**, 3399-411.

456. Troyanskaya, O. G., Garber, M. E., Brown, P. O., Botstein, D., and Altman, R. B. (2002). Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data. *Bioinformatics* **18**, 1454-61.
457. Xu, S. H., Qian, L. J., Mou, H. Z., Zhu, C. H., Zhou, X. M., Liu, X. L., Chen, Y., and Bao, W. Y. (2003). Difference of gene expression profiles between esophageal carcinoma and its pericancerous epithelium by gene chip. *World J Gastroenterol* **9**, 417-22.
458. Damm, K., Hemmann, U., Garin-Chesa, P., Huel, N., Kauffmann, I., Priepke, H., Niestroj, C., Daiber, C., Enenkel, B., Guilliard, B., Lauritsch, I., Muller, E., Pascolo, E., Sauter, G., Pantic, M., Martens, U. M., Wenz, C., Lingner, J., Kraut, N., Rettig, W. J., and Schnapp, A. (2001). A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *Embo J* **20**, 6958-68.
459. Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**, 931-43.
460. Morris, M. C., Kaiser, P., Rudyak, S., Baskerville, C., Watson, M. H., and Reed, S. I. (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* **423**, 1009-13.
461. Lukas, C., Sorensen, C. S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindene, C., Peters, J. M., Bartek, J., and Lukas, J. (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**, 815-8.
462. Hsu, J. Y., Reimann, J. D., Sorensen, C. S., Lukas, J., and Jackson, P. K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* **4**, 358-66.
463. Rape, M., and Kirschner, M. W. (2004). Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* **432**, 588-95.
464. Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-81.

465. Jacobs, I. J., and Menon, U. (2004). Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* **3**, 355-66.
466. Tsukishiro, S., Suzumori, N., Nishikawa, H., Arakawa, A., and Suzumori, K. (2005). Use of serum secretory leukocyte protease inhibitor levels in patients to improve specificity of ovarian cancer diagnosis. *Gynecol Oncol* **96**, 516-9.
467. Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C., and Liotta, L. A. (2002). Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **359**, 572-7.
468. Lowenthal, M. S., Mehta, A. I., Frogale, K., Bandle, R. W., Araujo, R. P., Hood, B. L., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Goldsmith, P., Fishman, D., Petricoin, E. F., 3rd, and Liotta, L. A. (2005). Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin Chem* **51**, 1933-45.
469. Zhang, Z., Bast, R. C., Jr., Yu, Y., Li, J., Sokoll, L. J., Rai, A. J., Rosenzweig, J. M., Cameron, B., Wang, Y. Y., Meng, X. Y., Berchuck, A., Van Haaften-Day, C., Hacker, N. F., de Bruijn, H. W., van der Zee, A. G., Jacobs, I. J., Fung, E. T., and Chan, D. W. (2004). Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* **64**, 5882-90.
470. Kozak, K. R., Amneus, M. W., Pusey, S. M., Su, F., Luong, M. N., Luong, S. A., Reddy, S. T., and Farias-Eisner, R. (2003). Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12343-8.
471. Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W., Wu, M., Morton, R. E., Elson, P., Kennedy, A. W., Belinson, J., Markman, M., and Casey, G. (1998). Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *Jama* **280**, 719-23.
472. Obiezu, C. V., and Diamandis, E. P. (2005). Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett* **224**, 1-22.