

Université de Montréal

Implication de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ dans la promotion de l'invasion
des cellules du cancer épithélial de l'ovaire

Par

Jacinthe Roussy

Département de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Biologie moléculaire

Janvier 2015

©Jacinthe Roussy, 2015

Résumé

Le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO) est le cancer gynécologique le plus létal. Bien que certains progrès aient été accomplis, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ce cancer est requise. Notre laboratoire a démontré que la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 était impliquée dans l'activation de Src, la survie, la migration et l'invasion des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Des études ont proposé que Src ait également un rôle important dans la progression tumorale du CÉO. Ainsi, nous nous intéressons au rôle de DEP-1 dans le potentiel invasif du CÉO. Nous avons observé des niveaux d'expression variables de DEP-1 dans 6 lignées cellulaires du CÉO et constaté que ceux-ci corrèlent positivement avec le potentiel invasif des cellules dans le Matrigel. Des expériences d'ARNi ont démontré que la réduction de l'expression de DEP-1 inhibe des voies de signalisation pro-invasives telles que la phosphorylation de Src et de Cortactine, ainsi que la localisation de Cortactine aux lamellipodes. Cette déplétion de DEP-1 a également eu pour effet de diminuer d'autres voies de signalisation pro-tumorales, tel que la phosphorylation de l'EGFR et de P65 (NfκB). Conséquemment, la déplétion de DEP-1 par transfection d'ARNi se traduit par une perte du potentiel invasif des cellules, et une diminution de la résistance des cellules au Carboplatin. L'analyse de l'expression de DEP-1 par immunohistochimie dans les tumeurs ovariennes révèle l'existence d'une corrélation positive entre l'expression en protéine de DEP-1 et le cancer de l'ovaire de grade élevé et la survie des patientes, qui a également été confirmé sur une puce à ARN. Nos résultats suggèrent que DEP-1 favoriserait la progression tumorale du cancer épithélial de l'ovaire. Nous avons démontré que DEP-1 est impliquée dans l'invasion in vitro, et que son expression est associée à un cancer de l'ovaire plus agressif, faisant ainsi de DEP-1 une cible thérapeutique potentiellement intéressante.

Mots clés : Invasion cellulaire, DEP-1, Src, progression tumorale, immunohistochimie, *in vitro*, *in situ*.

Abstract

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecological cancer. Our laboratory has previously shown that the protein tyrosine phosphatase DEP-1 is involved in Src activation, survival, migration and invasion of endothelial cells in response to VEGF. Studies have shown that Src may be implicated in the progression of epithelial ovarian cancer progression. Thus, we were interested in determining if DEP-1 had a role in the promotion of the Src invasive pathway in EOC. First, we have observed a variable protein expression of DEP-1 in six EOC cell lines, and that there was a positive correlation with invasion in Matrigel. We also showed in RNAi experiments that inhibition of DEP-1 expression resulted in the decreased phosphorylation of Src and Cortactin, also loss of Cortactin localisation at the cellular membrane. We also observed dysregulation of other pro-tumoral pathways like EGFR and P65 (NfκB) diminution of phosphorylation. Consequently, DEP-1 depletion resulted in loss of invasive capacities of most of the cell lines, and diminution of chemoresistance in response to Carboplatin. Analysis of DEP-1 in EOC tumors revealed the existence of a positive correlation with an aggressive form of ovarian cancer, high grade status, and poorer survival. These results suggest a positive role of DEP-1 in tumor progression of EOC. Our results show for the first time that DEP-1 is implicated in invasion *in vitro*, and is associated with the most aggressive form of EOC. Thus, DEP-1 is an interesting therapeutical target for EOC.

Keywords: Invasion, DEP-1, Src, tumor progression, immunohistochemistry, *in vitro*, *in situ*

Table des matières

| | |
|---------------------------------------|-----|
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | v |
| Liste des figures et tableaux..... | vii |
| Liste des abréviations..... | ix |
| Remerciements..... | xi |
| CHAPITRE 1 Introduction | 12 |
| CHAPITRE 2 Matériel et méthodes | 27 |
| CHAPITRE 3 Résultats | 35 |
| CHAPITRE 4 Discussion | 58 |
| CHAPITRE 5 Perspectives..... | 64 |
| CHAPITRE 6 Conclusion..... | 67 |
| CHAPITRE 7 Références | 69 |
| ANNEXES | |

Liste des figures et tableaux

Chapitre 1 :

Figure 1. Caractéristiques des cancers.

Figure 2. Coupe transversale d'un ovaire.

Figure 3. Marquage H&E typique des différents histotypes du cancer épithélial de l'ovaire.

Figure 4. Étalement des métastases du cancer de l'ovaire dans l'organisme.

Figure 5. Statistique Canadienne sur le cancer chez les femmes 2013.

Figure 6. Membres de la famille des PTPs.

Figure 7. Structure de DEP-1.

Figure 8. Mutations de DEP-1 dans les cancers humains.

Figure 9. Mécanisme d'activation de Src par DEP-1.

Figure 10. Effets des niveaux d'expression de DEP-1 sur l'activation de Src.

Figure 11. Angiogenèse embryonnaire déficiente suite au knock-in de DEP-1.

Figure 12. Rôle fonctionnel de DEP-1 dans l'angiogenèse.

Chapitre 3 :

Figure 13. L'expression de DEP-1 corrèle avec la capacité invasive des cellules du CÉO.

Figure 14. La déplétion de DEP-1 abolit des fonctions pro-invasives.

Figure 15. DEP-1 est impliquée dans la signalisation de P65 et EGFR *dans les TOV21G*.

Figure 16. Immunohistochimie de DEP-1 sur les tumeurs épithéliales ovariennes d'histotype séreux.

Figure 17. Corrélation de survie sur un microarray comportant des tumeurs du CÉO séreux.

Tableau 1. Caractéristiques de la cohorte de patientes du TMA des patientes ayant un CÉO d'histotype séreux.

Tableau 2. Corrélation de Pearson selon les données cliniques du TMA des patientes ayant un CÉO d'histotype séreux.

Annexes :

Figure S1. Schématisation de différentes techniques utilisées lors de ses travaux.

Figure S2. DEP-1 est nécessaire pour les voies de signalisation invasive dans la plupart des lignées du CÉO.

Figure S3. DEP-1 est nécessaire pour l'invasion cellulaire dans la plupart des lignées du CÉO.

Figure S4. La déplétion en DEP-1 par ARNi perturbe la localisation membranaire de la Cortactin dans la lignée SKOV3.

Tableau S1. Descriptions des lignées cellulaires du CÉO.

Tableau S2. Corrélation de Pearson selon les données cliniques du TMA des patientes ayant un CÉO d'histotype à cellules claires.

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ARNi: ARN interférant

BOV: tumeur ovarienne bénigne (benign ovarian tumor)

BRCA1/2: breast cancer gene 1/2

BSA: bovine serum albumin

CÉO: Cancer épithélial de l'ovaire

DEP-1: Density-enhanced phosphatase-1

DTT: Dithiotreitol

EOC: Epithelial ovarian cancer

Erk: Extracellular-regulated kinase

FBS: Fetal bovine serum

FIGO: Federation international de gynécologie et d'obstétrique

GFP: Green fluorescent protein

H&E: Hematoxyline & Eosine

IB: immunobuvardage

IF: Immunofluorescence

kDa: kilodalton

LMP: low malignant potential tumor; borderline tumor)

LOH : loss of heterozygoty

MMP: métalloprotéinase

NfκB: Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells

PBS: phosphate buffered saline

PTP: protein tyrosine phosphatase

SDS: sodium dodecyl-sulfate

SFK: Src family kinase

SNP: single nucleotide polymorphism

Src: Sarcome

TMA: Tumor micro array (micro étalage de tumeurs)

TOV: tumeur solide

WT: wild-type (type sauvage)

Y: tyrosine

S-C : sous-cutanée

I-P : intra-péritonéale

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres de l'Institut du Cancer de Montréal qui ont contribué de près ou de loin à mon épanouissement professionnel. J'aimerais tout particulièrement remercier mes deux directrices D^{re} Isabelle Royal et D^{re} Anne-Marie Mes-Masson, ainsi que les membres des laboratoires pour l'aide qu'ils m'ont apportée, autant au niveau des expériences qu'au niveau des connaissances. Simon Langlois, Christine Caron et Line Lapointe pour m'avoir initiée au laboratoire de recherche, Kathleen Spring pour m'avoir initiée officiellement aux cellules cancéreuses et au projet DEP-1, à Patrick Fournier pour ses critiques constructives, Liliane Meunier pour avoir contribué à l'analyse des TMAs, à Hubert Fleury pour les essais clonogéniques, à Katia Cacérés pour sa rigueur avec l'usage de drogues de chimiothérapie et l'analyse des TMA, et à Pouding, le chien Mira, qui est venu nous encourager lors du défi CRCHUM.

J'aimerais également remercier ma famille (surtout Papa et Maman) qui me soutiennent dans mes choix de carrière, et tout particulièrement mon conjoint qui a toujours été là pour écouter mes pratiques de présentations. Merci pour avoir été à l'écoute même si c'était « plate »!

Sans oublier mes deux chiens, Chuck et Baileys, parce qu'ils aiment tellement ça m'écouter présenter eux aussi!

Merci, merci, merci.

CHAPITRE 1
Introduction

1. Cancer

Le cancer se caractérise comme une masse tumorale dans un site de l'organisme. Cette masse tumorale apparaît lorsque les cellules qui la composent ont un dérèglement au niveau de la prolifération cellulaire. En plus d'avoir une prolifération incontrôlée, les cellules cancéreuses peuvent également se détacher de la tumeur primaire pour aller former des métastases (tumeurs à distance de la tumeur primaire). Le processus par lequel le cancer se développe nécessite l'acquisition de plusieurs propriétés pro-tumorales, qui ont été généralisées et répertoriées par Hanahan *et al.* 2000 (Fig.1). Parmi ceux-ci, nous pouvons compter l'évasion à l'apoptose (processus de mort cellulaire), une autosuffisance aux facteurs de croissance, une insensibilité aux facteurs de croissance, ainsi qu'un potentiel répliatif illimité, permettant aux cellules de se reproduire indéfiniment. Ensuite, la stimulation de l'angiogenèse, processus par lequel il y a formation de nouveaux vaisseaux sanguin à partir d'un réseau préexistant, va permettre à la tumeur en croissance d'obtenir un apport en oxygène et nutriment constant. La stimulation de l'invasion va permettre aux cellules tumorales d'initier la formation de métastases, ainsi que de s'installer à un site secondaire de la tumeur primaire. (Hannahan *et al.* 2000) Dans le cadre de ma maîtrise, je me suis intéressée au cancer de l'ovaire, qui sera discuté dans la section 2, et nous nous sommes intéressées à l'acquisition des propriétés pro-invasives par les cellules cancéreuses, tout particulièrement à la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 qui est impliquée dans ses fonctions, qui sera discuté dans la section 3.

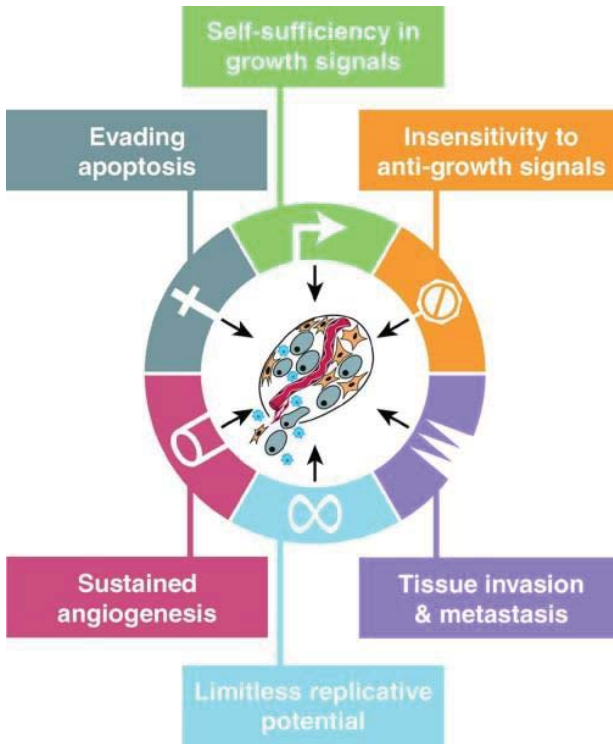


Figure 1. Caractéristiques des cellules cancéreuses. (Tiré de Hanahan *et al.* 2000)

2. Cancer des ovaires

2.1 Les tumeurs de l'ovaire

Le cancer des ovaires, comme son nom l'indique, prend naissance dans l'un ou les deux ovaires. Il peut avoir plusieurs origines cellulaires, soit les cellules germinales, stromales, et dans la grande majorité des cas, les cellules épithéliales (Fig. 2)

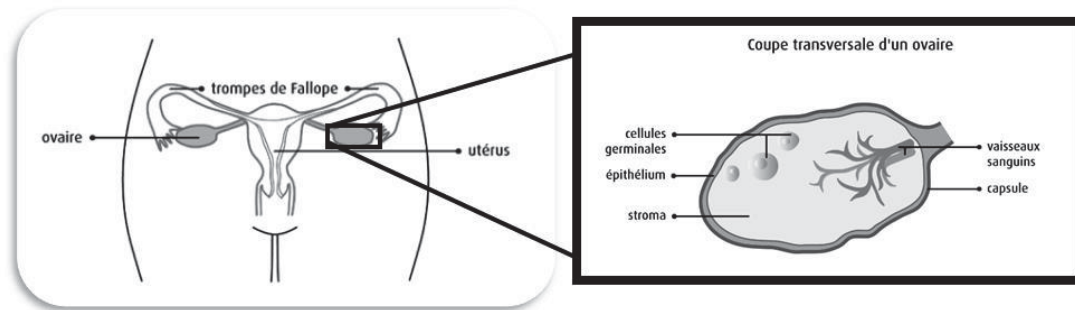


Figure 2. Coupe transversale d'un ovaire. (Adapté de la Société Canadienne du Cancer)

Les cellules germinales sont les précurseurs des ovules. La forme de cancer de l'ovaire qui provient de ces cellules représente 10-15 % des tumeurs malignes de l'ovaire et survient généralement chez les enfants et les jeunes femmes, lors de la puberté, et le taux de survie est généralement favorable (Chen *et al.* 2003).

Les cellules stromales de l'ovaire vont représenter environ 5-10 % des cas des cancers de l'ovaire malin. Ces cellules sont dérivées du mésenchyme et peuvent mener à la sécrétion d'hormones favorisant l'apparition de traits masculins chez les patientes. Cette forme de cancer de l'ovaire est également associée avec un bon pronostic (Chen *et al.* 2003).

Dans la majorité des cas de cancer de l'ovaire malin, soit environ 80 %, le cancer va avoir pour origine les cellules de l'épithélium, qui est la couche de cellules qui recouvrent l'ovaire (Chen *et al.* 2003). Il y a également de plus en plus d'évidence, sur la possibilité que d'autres sources de cellules épithéliales tel que les trompes de Fallope, ou celle de l'endomètre puissent donner naissance à des tumeurs de l'ovaire, d'histotype séreux et à cellules claires respectivement (Erickson *et al.* 2013; Tan *et al.* 2007). Les différents histotypes de cancer épithélial de l'ovaire (CÉO) seront discutés dans la section 2.2.

2.2 Classification histopathologique

1.2.1 Séreux

L'histotype séreux du cancer épithélial de l'ovaire représente 50 % des tumeurs épithéliales de l'ovaire, en faisant ainsi le sous-type majoritaire du CÉO (Chen *et al.* 2003). Ces cellules ont une morphologie similaire à celle des cellules tapissant la paroi interne des trompes de Fallope (Fig. 3). Il existe d'ailleurs une certaine continuité entre l'épithélium des trompes de Fallope qui rejoint celui des ovaires. La majorité des tumeurs de ce sous-type sont bilatérales (Chen *et al.* 2003). Le taux de survie sur cinq ans de la forme maligne de ce sous-type varie de 76% à 9% selon la présence ou non de métastases au moment du diagnostic (Chen *et al.* 2003).

2.2.2 Mucineux

Ce sous-type du cancer épithélial de l'ovaire représente 5-10 % des cas et leur morphologie rappelle l'épithélium endocervical, ou celle de l'épithélium intestinal dans la majorité des cas (Fig. 3). Dans la majorité des cas ce type de cancer est bénin. Le taux de

survie pour la forme maligne varie de 80 à 10 % dépendamment de la présence ou non de métastases chez la patiente (Chen *et al.* 2003).

2.2.3 Endométriöide

Les tumeurs épithéliales de l'ovaire endométriöides possèdent une morphologie s'apparentant aux cellules de l'endomètre, c'est-à-dire la couche de cellules épithéliales recouvrant la paroi interne de l'utérus (Fig. 3). Elles représentent 10-25 % des cas du cancer épithélial de l'ovaire, sont généralement malignes, unilatérales et ont un meilleur pronostic que les autres sous-types (Chen *et al.* 2003).

2.2.4 Cellules claires

Les tumeurs à cellules claires représentent la forme la plus rare, soit 4-5 % des tumeurs épithéliales de l'ovaire, mais également la forme la plus agressive ayant le plus mauvais pronostic, avec un taux de survie de 69 à 4%, dépendamment de l'étendu des métastases. La forme bénigne est plutôt rare, et la majorité des femmes atteintes de cette forme de cancer épithélial de l'ovaire n'ont jamais enfanté (Chen *et al.* 2003). Leur morphologie s'apparente aux cellules riches en glycogène et lipides des cellules vaginales (Kaku 2003) (Fig. 3).

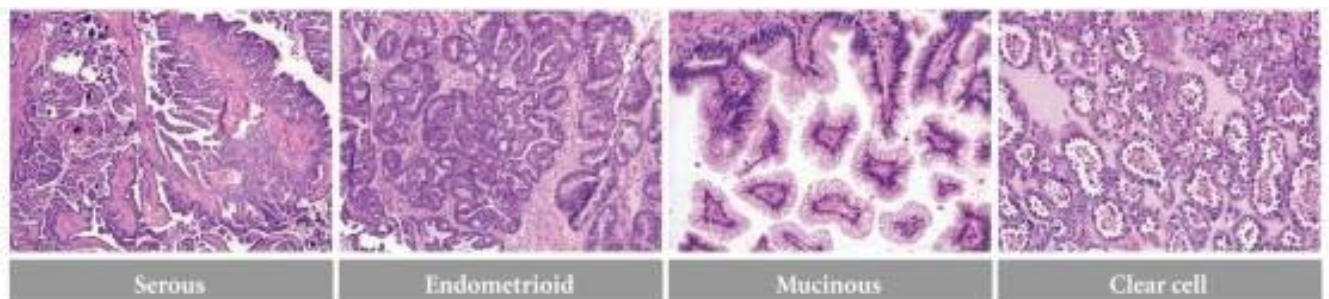


Figure 3. Marquage H&E typique des différents histotypes du cancer épithélial de l'ovaire. (Tiré de Karst *et al.* 2010)

2.3 Stade et grade du cancer de l'ovaire

Ces deux caractéristiques vont avoir des conséquences sur la nature des traitements qu'obtiendront les patientes, ainsi que sur l'établissement du pronostic et de la prédiction de la réponse aux agents de chimiothérapie (Silverberg *et al.* 2000).

2.3.1 Stade

Le stade désigne le niveau d'étalement du cancer dans l'organisme, ou l'étalement des métastases. Le stade est désigné selon le système de classification FIGO. En stade I, la tumeur est confinée à l'un ou aux deux ovaires, il n'y a donc pas de métastases. Ce stade est associé avec le meilleur pronostic. Au stade II, il y a étendue de la tumeur au niveau du bassin, soit les trompes de Fallope, l'utérus, etc. En stade III, il y a présence de métastases aux ganglions lymphatiques et extra pelviennes. Généralement, les patientes ayant un cancer de l'ovaire en stade III ont présence d'ascites (liquide dans la cavité intrapéritonéale), et métastases implantées dans la cavité intrapéritonéale. Le stade IV est le stade le plus avancé, et il y a présence de métastases aux organes éloignés de la tumeur primaire. Généralement les métastases les plus éloignées vont atteindre les poumons et le foie, et dans certains cas, le cerveau. En figure 4 nous pouvons apprécier les possibilités d'étalement du cancer de l'ovaire. (Naora *et al.* 2005)

2.3.2 Grade

Le grade définit le degré de malignité de la tumeur. Les tumeurs de l’ovaire sont catégorisées en trois groupes, soit les tumeurs bénignes, de bas grade et de haut grade. Les tumeurs bénignes se désignent par une absence d’infiltration des cellules tumorales dans le tissu périphérique à la tumeur. Ces tumeurs sont bien différenciées, et les cellules qui composent la tumeur ont la morphologie normale de l’ovaire. Les cancers de bas grade sont généralement bien différenciés, alors que les cancers de haut grade sont faiblement différenciés. L’activité mitotique est également plus élevée dans les cancers de haut grade, accompagnée d’une instabilité génomique plus élevée. Dans les cancers de bas grade, le suppresseur de tumeur P53 est généralement de type sauvage, alors qu’il est fréquemment muté/déléte dans les cancers de haut grade (Laframboise *et al.* 2000; Berek *et al.* 2012; Chen *et al.* 2003).

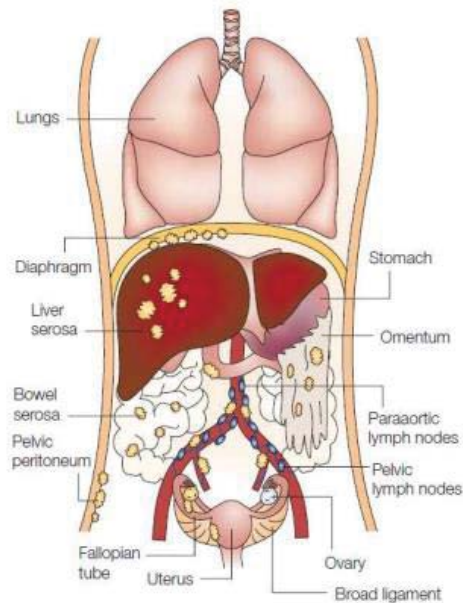


Figure 4. Étalement des métastases du cancer de l’ovaire dans l’organisme (Tiré de Naora *et al.* 2005).

2.5 Statistiques

Le cancer de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus létal. Au Canada, il est au huitième rang des cancers les plus diagnostiqués chez la femme (Fig. 5), et représente la cinquième cause de mort par cancer (Fig. 2). En Amérique (2011), le taux de survie moyen sur cinq ans est de 40 % (American Cancer Society 2013). Par contre, lorsqu’on divise les patientes en deux groupes, soit les patientes de bas grade et de haut grade, on peut voir qu’il y a une grande différence dans leur espérance de vie. Les patientes avec un diagnostic de bas grade ont un taux de survie sur cinq ans variant de 99 % (lorsque le cancer est limité aux ovaires : stade I) à 77 % (lorsque le cancer s’est répandu : stade IV). Par contre, le taux de survie sur cinq ans chute drastiquement pour les patientes avec un diagnostic de haut grade, passant de 89 % (lorsque le cancer est limité aux ovaires : stade I), à 34 % (stade III), jusqu’à 18 % (stade IV) lorsque le cancer s’est répandu à des sites très éloignés de la tumeur primaire (American Cancer Society 2013).

Si ce cancer est autant meurtrier, c’est entre autres par le manque de biomarqueurs spécifiques au cancer de l’ovaire, ainsi que le manque de symptômes spécifiques. Par conséquent, ce cancer est généralement diagnostiqué à des stades avancés, permettant ainsi au cancer d’acquies des fonctions pro-invasives et la formation de métastases. Il existe donc un grand intérêt pour l’étude de ce cancer, que ce soit pour la recherche de nouveaux biomarqueurs permettant le diagnostic précoce de la maladie, ou pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer le traitement et la survie des patientes.

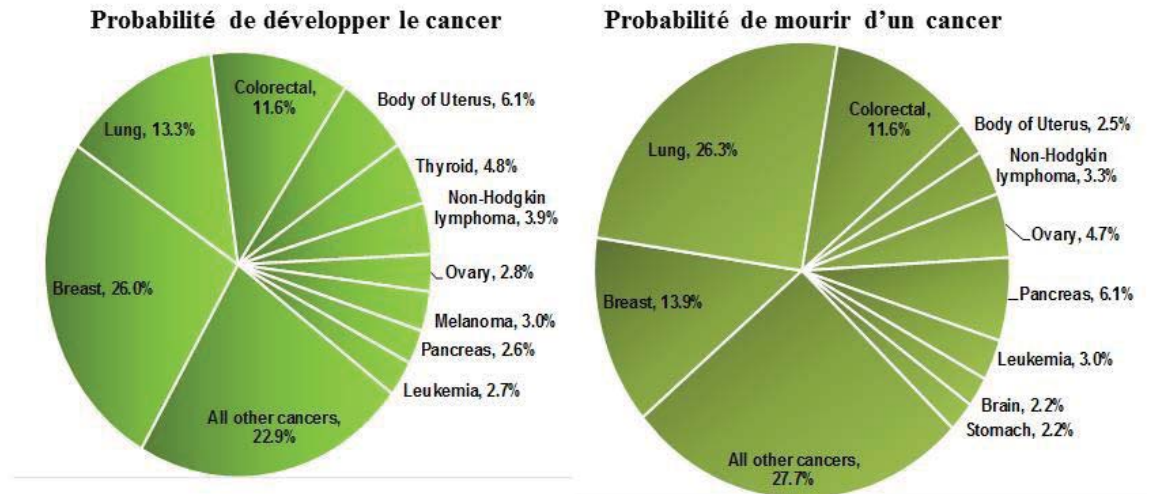


Figure 5. Statistique Canadienne sur le cancer chez les femmes 2013 (Tiré de Advisory Committee on Cancer Statistics 2013).

2.6 Biologie moléculaire du CÉO

Le premier biomarqueur pour le cancer épithélial de l’ovaire a été les niveaux sériques de CA125. Cette protéine est exprimée par les cellules de l’épithélium ovarien, et sécrétée dans le système vasculaire. Dans certains cas, les cellules cancéreuses vont produire plus de CA125, ce qui permettra d’établir un diagnostic, et un suivi de la guérison de la patiente suite aux traitements. (Bast *et al.* 1998) Malheureusement, ce test est peu fiable pour la détection précoce du cancer. En effet, 20% des patientes n’ont pas de fluctuations du taux de CA125, et 80% des patientes qui auront un test positif pour le taux de CA125 auront un cancer de stades avancés. D’où l’attrait pour l’étude de nouveaux biomarqueurs. (Rustin *et al.* 1996)

Une forme héréditaire du cancer épithélial de l’ovaire est attribué à une mutation des gènes BRCA1 et/ou BRCA2. En fait, ces protéines réparatrices de l’ADN sont la source familiale des cancers féminins du sein et de l’ovaire. (Welch *et al.* 2001) La raison pour

laquelle une mutation de ces protéines bénéficie spécifiquement ces deux formes de cancer plutôt que les autres est à ce jour inconnu (Miki *et al.* 1994).

Des études menées à partir d'échantillons (tumeurs/sang) de patientes, ainsi que des études de progression tumorales *in vivo*, ont démontrés que plusieurs oncogènes reconnues dans la littérature semblait contribuer au faible taux de survie des patientes et/ou à la progression du cancer : l'EGFR (Faruk *et al.* 2014), IL-6/IL-8 (Dobrzycka *et al.* 2013), NfκB (Huang *et al.* 2000), etc.

3. DEP-1

3.1 Protéines tyrosine phosphatases

Les protéines tyrosine-phosphatases font partie d'une grande famille de protéines ayant pour fonction la déphosphorylation sur tyrosine. Deux grandes sous-familles regroupent les PTPs classiques, soit les PTP de type récepteur, et les PTP cytosoliques (Fig. 6) (Florio *et al.* 2008). La structure des PTP de type récepteur inclut un domaine extracellulaire, transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique contient généralement 2 domaines catalytiques. Quelques PTP membres de la sous-famille R3, incluant DEP-1, VE-PTP, GLEPP1 et SAP-1, ne possèdent qu'un seul domaine catalytique (Tonks *et al.* 2006).

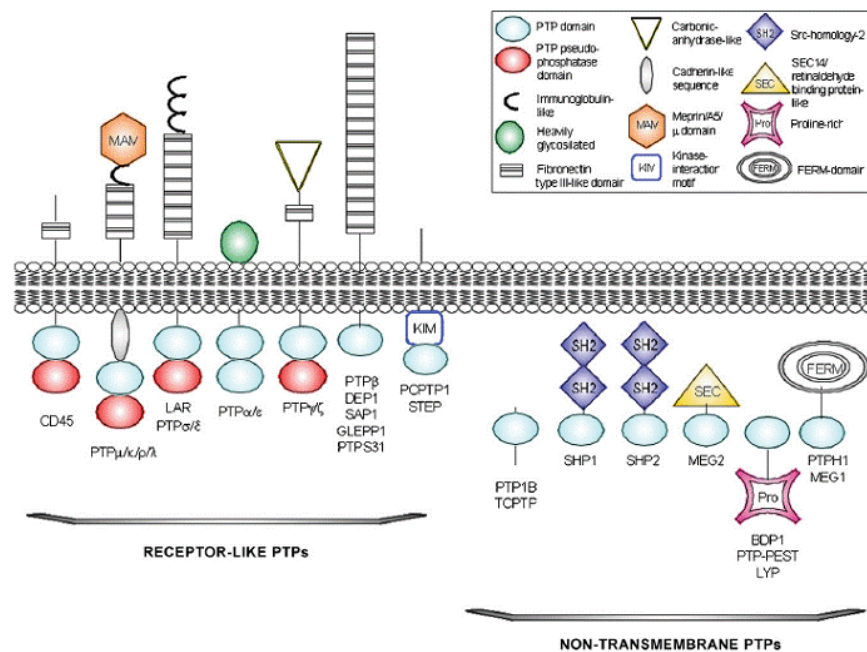


Figure 6. Membres de la famille des PTPs (Tiré de Florio *et al.* 2008).

3.2 Structure et domaines

La protéine tyrosine-phosphatase DEP-1, également connue sous les noms CD148, PTPRJ et PTP η , est une phosphatase membranaire de type récepteur, dont l'expression est ubiquitaire (Borges *et al.* 1996; De la Fuente-Garcia *et al.* 1998; Honda *et al.* 1994; Autschbach *et al.* 1999; Lin *et al.* 2004), qui a été décrite pour la première fois par Östman *et al.* en 1994. Cette protéine est composée de trois régions (Fig. 6): une région extracellulaire comportant 8 domaines de types fibronectine III, une région transmembranaire et une région intracellulaire qui comporte un domaine KIM, un domaine catalytique et une queue carboxyle-terminale (Östman *et al.* 1994).

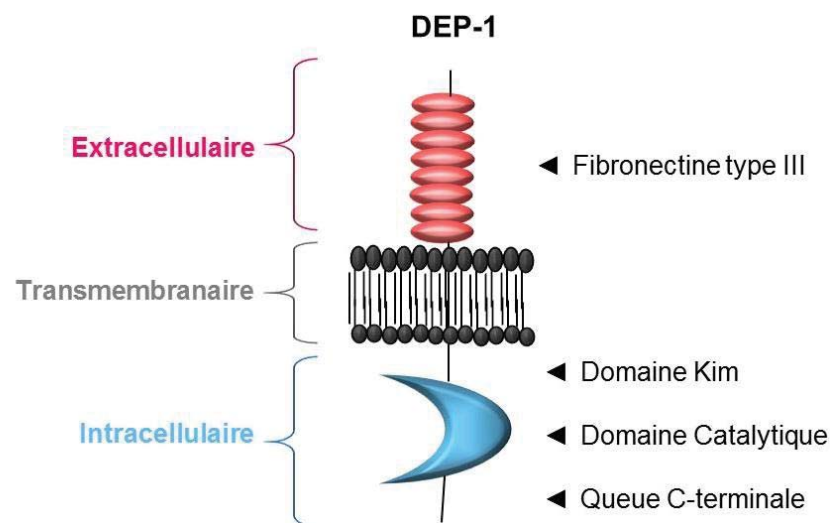


Figure 7. Structure de DEP-1 (Adapté de Spring *et al.* 2012).

3.2.1 Région extracellulaire

La région extracellulaire possède 8 domaines de type fibronectine III, similaires aux molécules d'adhésion cellulaire, suggérant un rôle dans les liens cellules-cellules ou avec un contact avec la matrice extracellulaire (Tonks *et al.* 2006). Il a été démontré que ce domaine pouvait interagir avec des ligands tels que le Syndecan-2 (Whiteford *et al.* 2011), une protéine membranaire impliquée dans la signalisation du cytosquelette, et la Thrombospondin-1 (Takahashi *et al.* 2012). L'interaction de Syndecan-2 avec DEP-1 permettrait de médier des fonctions d'adhérence, alors que son interaction avec la Thrombospondin-1 permettrait d'activer les fonctions antiprolifératives de DEP-1.

3.2.2 Région transmembranaire

Cette région glycosylée de DEP-1 permet un ancrage à la membrane cytoplasmique des cellules. De plus, il a été démontré que DEP-1 pouvait former des homodimères, de par une interaction entre ces régions transmembranaires, promouvant ainsi son activité, par un mécanisme similaire aux PTPs CD45 et PTP α (Chin *et al.* 2005).

3.2.3 Région intracellulaire

La région intracellulaire de DEP-1 possède un domaine kim (recrutement des MAP kinases ERK1/2), ainsi qu'un domaine catalytique et une queue c-terminale (Sacco *et al.* 2009). C'est ce domaine qui permet à DEP-1 d'exercer son rôle de phosphatase, qui sera discutés dans la section 3.3.1.

3.3 Fonctions biologiques

3.3.1 Substrats

La région intracellulaire possède un domaine Kim, à proximité du domaine catalytique, qui est connu pour le recrutement de la MAPkinase ERK1/2 (Sacco *et al.* 2009), permettant ainsi à DEP-1 de déphosphoryler et d'inhiber cette protéine impliquée dans la prolifération cellulaire.

Plusieurs substrats ont été identifiés dans la littérature, notamment Flt3 (Arora *et al.* 2001), EGFR (Berset *et al.* 2005; Tarcic *et al.* 2009), les kinases de la famille Src (LePera *et al.* 2005; Chabot *et al.* 2009 :Immunity 2008), PDGF- β (Kolavenko *et al.* 2000), VEGFR2 (Lampugnani *et al.* 2003; chabot *et al.* 2009), la sous-unité p85 de PI3K (Tsuboi 2008), HGFR également appelée c-Met (Palka *et al.* 2003) et Ret (Iervolino *et al.* 2006).

Quant à la queue carboxy-terminale de DEP-1, il a été démontré qu'elle pouvait interagir avec la Syntenin (Iuliano *et al.* 2001), toutefois, le rôle de cette interaction est inconnu. Il est également intéressant de souligner qu'une étude a démontré que la Syntenin pouvait interagir avec les protéines Syndecan aux jonctions adhérentes (Zimmermann *et al.* 2001). Nos travaux ont également montrés d'autres fonctions et interactions importantes de la queue en C-terminales, tel que le le recrutement potentiel de Src par les tyrosines 1311 et 1320 (Spring *et al.* 2012).

3.3.2 DEP-1 et Cancer

DEP-1, comme son nom l'indique (Density-enhanced phosphatase-1), est une protéine dont les niveaux d'expression augmentent avec la confluence des cellules, augmentant ainsi son activité antiproliférative (Ostman *et al.* 1994). Étant donné : (1) Le vaste nombre de substrats de DEP-1 impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase EGFR, PDGFR- β , HGFR, VEGFR2, ainsi que ERK1/2, et étant donné sa perte d'expression (perte d'hétérozygotie), (2) La présence de plusieurs mutations de DEP-1 répertoriées dans les cancers du côlon, sein et poumon (Fig. 8) (Ruivenkamp *et al.* 2002; Mita *et al.* 2010), (3) Le rôle anti-prolifératif de DEP-1 dans les cellules saines (Ostman *et al.* 1994), qui a été confirmé dans certaines études de cancer tel que le cancer du sein (Trapasso *et al.* 2000, Keane *et al.* 1996), le méningiome (Petermann *et al.* 2011), cancer du pancréas (Trapasso *et al.* 2004) et cancer du côlon (Balavenkatraman *et al.* 2006) notamment, (4) DEP-1 a également été associée avec une plus forte différenciation dans plusieurs types de cellules cancéreuses, suggérant un rôle inhibiteur de DEP-1 dans la transformation (Zhang *et al.* 1997), il a été suggéré que DEP-1 serait potentiellement un suppresseur de tumeur.

Or, il a également été démontré que DEP-1 avait la capacité d'activer l'oncogène Src, en déphosphorylant sa tyrosine inhibitrice 529, dans les cellules du système immunitaire (Zhu *et al.* 2008), et dans les cellules endothéliales (Chabot *et al.* 2009; Spring *et al.* 2012).

3.3.2.1 Mutations

Les mutations répertoriées sont assez nombreuses dans les cancers humains, et le mécanisme d'inactivation consiste généralement en une méthylation du gène résultant en une perte de l'hétérozygotie (Fig. 8) (Ruivenkamp *et al.* 2002). L'effet de ses mutations est trop peu décrit dans la littérature. Deux mutations ont été identifiées dans le cancer du sein, l'une

dans le domaine Kim (recrutement de ERK1/2), et l'autre dans le domaine extracellulaire (Keanne *et al.* 1996; Lesueur *et al.* 2005). Une mutation (G338S) dans l'un des domaines de type fibronectine de DEP-1 a également été identifié dans un cas de cancer épithélial de l'ovaire séreux de haut grade, associé avec une surexpression de DEP-1 chez la patiente (Fig. 8) (TCGA 2011).

Chez la souris, le gène PTPRJ a été associé avec le locus de susceptibilité au cancer du côlon *Scc1*, les chercheurs ont identifiés que les polymorphismes de DEP-1 promouvait la susceptibilité au cancer du côlon par une perte d'activité de DEP-1. Une perte de l'hétérozygotie du gène DEP-1 a été identifiée dans plusieurs cancers, tels le cancer colorectal, du sein, du poumon, de la glande thyroïde et du méningiome (Ruivenkamp *et al.* 2002; Ruivenkamp *et al.* 2003; Moen *et al.* 1996; Petermann *et al.* 2011; Iuliano *et al.* 2004).

De plus, des SNPs (single nucleotide polymorphisms) sur le gène de DEP-1 ont été identifiés dans les cancers, incluant le cancer colorectal, du poumon et le cancer de la tête et du cou. Dans la souris, ces SNPs ont généré divers variants de DEP-1 qui différaient de l'original par le domaine extracellulaire (Ruivenkamp *et al.* 2002; Ruivenkamp *et al.* 2003; Moen *et al.* 1996; Petermann *et al.* 2011; Iuliano *et al.* 2004).

Le récepteur de l'EGF, l'EGFR, est associé avec la progression de certains cancers, tels que le cancer du sein (Citri *et al.* 2006) et le cancer de l'ovaire (Faruk *et al.* 2014). Il est étonnant que malgré la diminution de l'activité de DEP-1 dans les différents cancers humains, qu'il soit également impliqué dans la stabilité de l'EGFR en le protégeant de son endocytose tout en le déphosphorylant (Tarcic *et al.* 2009).

Donc, selon ces résultats, la mutation de DEP-1, entraînant son inactivation, pourrait être favorable à la progression tumorale. D'ailleurs, certaines mutations telles que D1016E défavorisent l'interaction de DEP-1 avec ERK1/2. Ces mutants sont d'ailleurs incapables de déphosphoryler ERK1/2, résultant en une augmentation de la prolifération des cellules (Sacco *et al.* 2009). Le mutant K1017N de DEP-1 découvert dans une métastase au cerveau du cancer du sein, pourrait avoir des effets semblables à ceux du mutant D1016E, et favoriser la croissance tumorale, puisque les deux mutations sont situées dans le domaine Kim (Fig. 7, 8) (Ding *et al.* 2010; Lesueur *et al.* 2005; Keanne *et al.* 1996).

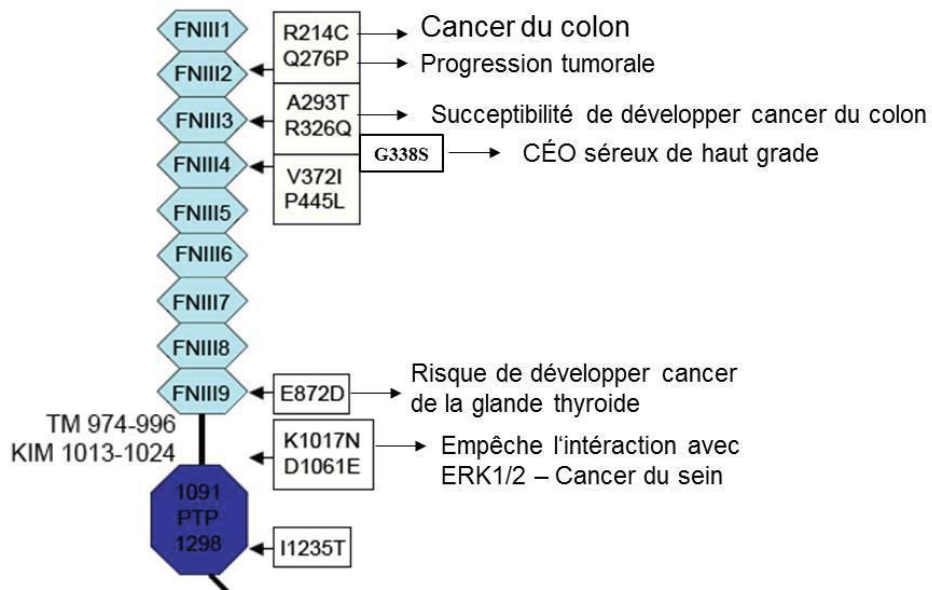


Figure 8. Mutations de DEP-1 dans les cancers humains.

3.3.3 Src

3.3.3.1 Mécanismes d'activation de Src

Un mécanisme par lequel Src est activé par DEP-1 a été élucidé dans notre laboratoire (Fig. 9). Selon nos études menées dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale

humaine (HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells), il y a phosphorylation de DEP-1 sur les résidus tyrosines 1311 et 1320 en réponse au VEGF. Cela crée un point d'ancrage pour le domaine SH2 de Src qui interagit avec ces résidus de DEP-1. Comme Src à l'état inactif est replié sur lui-même, dû à une interaction entre sa tyrosine 529 phosphorylé et son propre domaine SH2 (domaine reconnaissant les tyrosines phosphorylées), l'interaction entre DEP-1 et Src et la déphosphorylation de la Y529 permet un changement de la conformation de Src libérant ainsi sa tyrosine inhibitrice. Src étant ainsi déplié et déphosphorylé, une phosphorylation sur sa tyrosine 418 est induite, permettant ainsi son activation. (Spring *et al.* 2012)

Notre laboratoire a également démontré que les effets de DEP-1 sur Src dépendaient de ses niveaux d'expression. Nous avons alors effectué des expériences où l'activité de Src a été mesurée avec des niveaux d'expression croissants en DEP-1 (Fig. 10). Nous avons démontré que des concentrations minimales, ainsi que de forte expression de DEP-1 ne permettaient pas une activité adéquate de Src, mais que son effet était à son maximum à des concentrations dites intermédiaires. La raison pour laquelle la forte expression en DEP-1 ne résulte pas en une meilleure activation de Src peut s'expliquer par une perte de spécificité enzymatique de DEP-1 lorsqu'il est fortement exprimé, faisant ainsi de la tyrosine 418 de Src (forme active de Src) un autre substrat potentiel de DEP-1 (Spring *et al.* 2012).

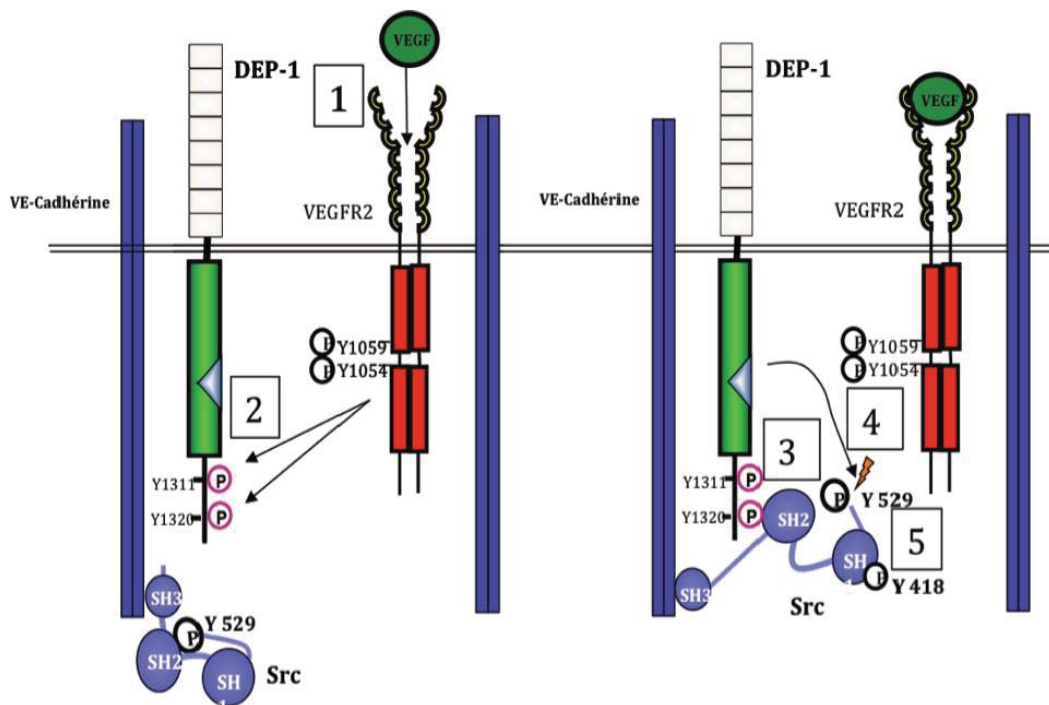


Figure 9. Mécanisme d'activation de Src par DEP-1. (1) activation du récepteur du VEGFR2 par son ligand, (2) phosphorylation sur tyrosine 1311 et 1320 de DEP-1 par le VEGFR2, (3) recrutement du domaine SH2 de Src par DEP-1 (Y1320), (4) déphosphorylation sur Y529 de Src par le domaine catalytique de DEP-1, (5) phosphorylation de Src en Y418. (Spring *et al.* 2012)

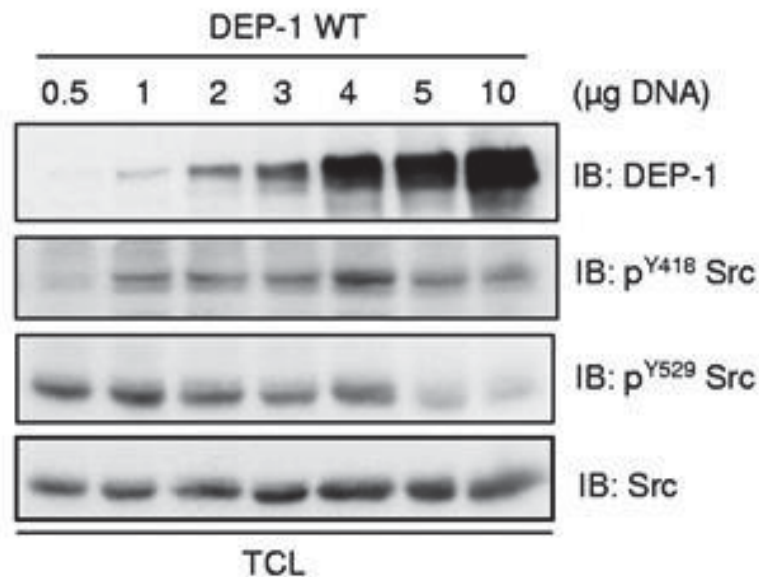


Figure 10. Effets des niveaux d'expression de DEP-1 sur l'activation de Src. (Tiré de Spring *et al.* 2012)

3.3.1.2 Src et le cancer des ovaires

Src est un oncogène abondamment décrit dans la littérature, découvert chez le poulet par Francis Peyton Rous en 1911. Depuis, son expression et son activité ont été observées dans plusieurs types de cancer humain, tels le cancer colorectal (Irby *et al.* 1999), pancréatique (Lutz *et al.* 1998), du sein (Biscardi *et al.* 1998) et de l'ovaire (Wiener *et al.* 1999). Des mutations de Src sont rarement observées dans les cancers, suggérant que ses niveaux d'expression et d'activité sont influencés par l'altération en amont des voies de signalisation (Banibrata *et al.* 2011). Les membres de la famille Src sont impliqués dans la progression et la croissance tumorale, ainsi que dans la division cellulaire, l'adhésion, l'angiogenèse et la survie (Parsons *et al.* 2004; Tolsma *et al.* 1997; Boyer *et al.* 2002).

D'ailleurs, de plus en plus d'études tendent à démontrer l'importance de Src pour la progression du cancer épithélial de l'ovaire. Wiener *et al* (2003) ont démontré une augmentation de l'expression de Src de près de 90 %, et de sa forme active, dans les tumeurs ovariennes de stade avancé, et que cette expression était associée avec une surexpression de Her2. L'utilisation d'inhibiteur de Src chez la souris nue a également démontré son efficacité à diminuer la masse tumorale, en combinaison avec d'autres agent chimiothérapeutique (Han *et al.*2006).

Des études cliniques démontrent que des inhibiteurs de Src, tel le Dasatinib, sont des traitements intéressants pour le traitement du cancer épithélial de l'ovaire, toutefois, le traitement au Dasatinib seul n'est pas suffisant pour sauver les patientes (Schilder *et al.* 2012).

Étant donné le large spectre des membres de la famille des kinases Src, l'inhibition d'un membre spécifique de cette famille de kinases n'est pas totalement efficace, due à la compensation des autres membres pour son activité (Kim *et al.* 2011).

3.3.1.3 Src et NfκB

NfκB a été reconnu comme ayant un rôle dans l'inflammation et les cancers (Hoesel *et al.* 2013). Son rôle dans les cancers est entre autre reconnu pour sa capacité à transcrire le gène IL-6 (Alberti *et al.* 2012) et des métalloprotéinases (Bond 2001), Certaines études ont également suggérées que NfκB aurait un rôle à jouer dans la chimiorésistance du cancer épithélial de l'ovaire. (Yang *et al.* 2011)

NfκB est un hétéro/homo dimère (complexe de 2 protéines) possédant un rôle dans la transcription d'ADN. Cinq membres de la famille NfκB ont été identifiés: P65, RelB, c-Rel,

NFκB1 et NFκB2. Dépendamment du couple de dimère formé, le complexe aura différente affinité de séquence de liaison à l'ADN. (Wong *et al.* 2011) La forme inactive de NFκB se retrouve dans le cytoplasme des cellules et forme un complexe avec une protéine inhibitrice appelé IκBα. Lorsque des signaux extracellulaires viennent activer une protéine kinase IκK, celle-ci va venir phosphoryler IκBα résultant en son ubiquitination suivie de sa dégradation par le protéasome. La forme libre de NFκB peut maintenant se localiser au noyau de la cellule. (Birbach *et al.* 2002)

Cette phosphorylation de IκBα peut se faire via la kinase Src résultant en l'activation de NFκB. Cette activation de NFκB par Src a été démontré dans plusieurs types cellulaires. (Storz *et al.* 2003 : Liu *et al.* 2005 : Funakoshi-Tago *et al.* 2005 : Lee *et al.* 2007) Il a également été suggéré que cette activation permettrait la progression tumorale. (Boukerche *et al.* 2007)

3.3.2 Système immunitaire

DEP-1 semble jouer un rôle important dans la régulation de l'immunité. Dans les cellules B et les plaquettes, DEP-1 est impliqué dans l'activation de Src, stimulant l'activation de voies de signalisation de l'immunorécepteur et l'activation des plaquettes (Zhu *et al.* 2008; Hermiston *et al.* 2009; Senis *et al.* 2009). Par contre, dans les cellules T, DEP-1 est très peu exprimée, et son expression apparaît suite à l'activation de l'immunorécepteur (Zhu *et al.* 2008).

3.3.3 Études *in vivo*

Des études *in vivo* consolident les résultats obtenus dans notre laboratoire pour ce qui est du potentiel angiogénique de DEP-1. En effet, alors que les souris knock-out pour DEP-1 sont parfaitement viables et fertiles (Trapasso *et al.*2006), le Knock-in de DEP-1, par le remplacement de son domaine intracellulaire par GFP, abolit l'apparition d'un réseau vasculaire mature chez l'embryon, causant le décès avant le jour 11.5 (Fig. 11) (Takahashi *et al.* 2003). Les travaux de Takahashi *et al.* 2003 démontrent que DEP-1 n'est pas essentiel pour le développement, mais la létalité du phénotype (lorsque DEP-1 est exprimée mais mutée), démontrent que les fonctions de DEP-1 sont essentielles.

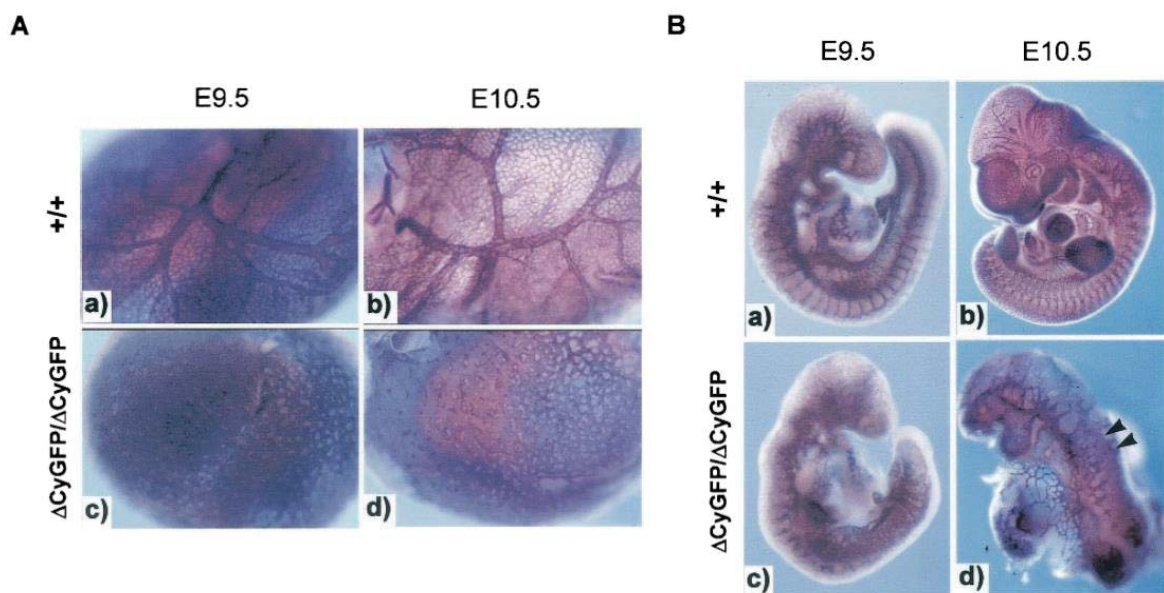


Figure 11. Angiogenèse embryonnaire déficiente suite au knock-in de DEP-1 (Tiré de Takahashi *et al.* 2003).

4 Objectifs

Des travaux précédents du laboratoire ont démontré que DEP-1 est nécessaire pour l'activation de Src en réponse au VEGF, et que cette activation de Src mène à l'activation des fonctions biologiques associées à l'angiogenèse. Ces fonctions impliquent la formation de capillaires, l'invasion cellulaire, la perméabilité vasculaire ainsi que la survie cellulaire (Fig. 12) (Chabot *et al.* 2009; Spring *et al.* 2012). Comme Src est impliquée dans la progression de plusieurs cancers, dont le cancer de l'ovaire et que le processus d'invasion cellulaire promeut la formation de métastases, notre hypothèse était donc que DEP-1, de par sa capacité à activer Src, pourrait être impliquée dans la promotion de l'invasion du cancer épithélial de l'ovaire.

Nos objectifs étaient tout d'abord d'évaluer les niveaux d'expression de DEP-1 en fonction du potentiel invasif, de lignées cellulaires dérivées du cancer épithélial de l'ovaire. Ensuite, l'objectif a été d'évaluer les effets de DEP-1 sur des voies de signalisation pro-invasive. Nous avons également voulu évaluer la corrélation entre le niveau d'expression de protéines (et ARN) de DEP-1, les données clinico-pathologiques et la survie des patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire.

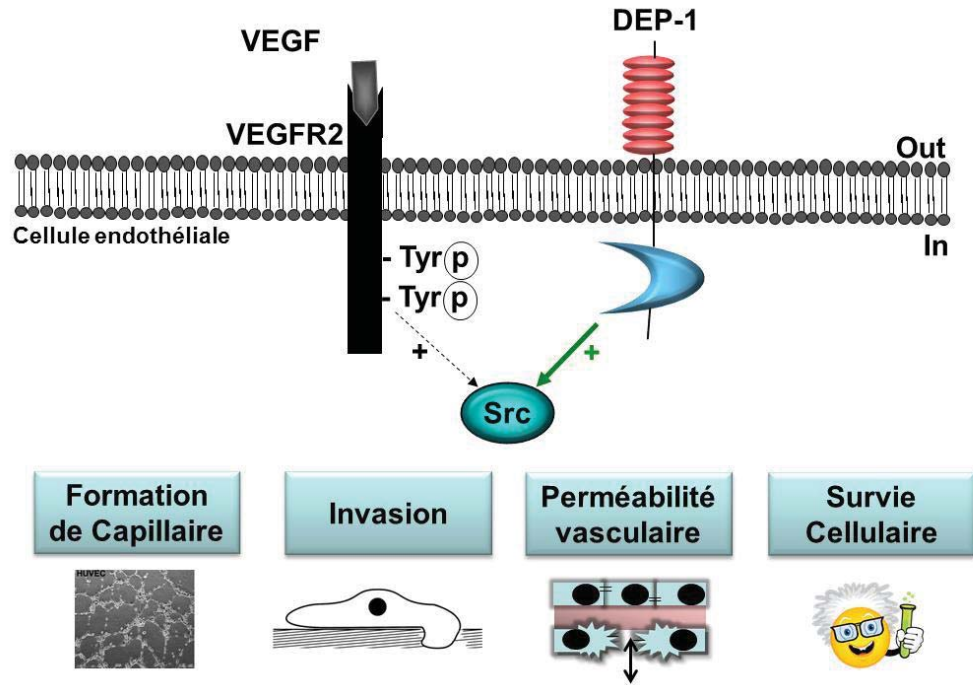


Figure 12. Rôle fonctionnel de DEP-1 dans l'angiogenèse. (Chabot *et al.*2009; Spring *et al.* 2012)

CHAPITRE 2
Matériel et méthodes

Culture Cellulaire

La lignée SKOV3 a été obtenue chez ATCC, et les autres lignées de cancer épithélial de l'ovaire TOV21G, TOV2223G, TOV1946, OV90 et TOV112D ont été élaborées dans le laboratoire du D^{re} Anne-Marie Mes-Masson. Les lignées sont décrites dans le tableau SI. Les lignées ont été maintenues dans du milieu de culture OSE (WISSENT Inc.), contenant 10 % de FBS (WISSENT Inc.) et 50 µg/mL de Gentamycine (Gibco Invitrogen) à 37 °C avec 5 % CO₂.

Transfections d'ARNi

Les cellules ont été transfectées avec des ARNi ciblant DEP-1 (HS-PTPRJ-3 : 5'-ACCCGTATCTTCTACAATCAA-3') et ARNi contrôle (AllStars) ont été obtenus chez Qiagen. La transfection a eu lieu 24 h après l'étalement, à une confluence d'environ 90 % et à une concentration de 50 nM pour les OV90 et à 25 nM pour les TOV21G, SKOV3, TOV2223G et les TOV1946, en utilisant le réactif de transfection Lipofectamine2000 (Invitrogen), en suivant les instructions du fabricant. Le milieu a été changé 18 h post-transfection.

Immunohistochimie

Un bloc de paraffine contenant différents échantillons de tumeurs (fixés à la formaline) de patientes ayant un cancer épithélial de l'ovaire de type séreux, ou à cellules claires, a été tranché en fines couches de 4 µm, lesquelles ont été fixées sur une lame de microscopie. Le marquage de DEP-1 a été réalisé à l'aide d'un anticorps de lapin polyclonal acheté chez Sigma (#cat : HPA006026), à une dilution de 1:20, en utilisant le système automatique BenchMark XT (Ventana Medical System Inc.). En parallèle, une coloration à l'hématoxyline et éosine

(H&E) a été effectuée pour différencier les cellules épithéliales cancéreuses du stroma. La lame a ensuite été scannée à l'aide d'un microscope avec un objectif de grossissement 20X.

Analyse statistique du TMA (voir immunohistochimie)

Deux observateurs indépendants ont évalué les niveaux d'expression de DEP-1 en attribuant un score de 0, 1, 2 et 3. Les patientes ont été séparées en trois groupes selon une expression faible ([0, 1]), intermédiaire ([1, 2]), ou élevée ([2, 3]) Les tests statistiques (Corrélation de Pearson, et Kaplan-Meier) ont été effectués par le logiciel SPSS, à l'aide des données cliniques connues des patientes. Toutes les patientes ayant subi une chimiothérapie ont été éliminées de l'étude.

Prolifération cellulaire

Les cellules ont été étalées à confluence, puis transfectées 24 h plus tard avec des ARNi contrôles et ciblant DEP-1 (voir transfection). Après 24 h de transfection, les cellules ont été trypsinisées, puis comptées en utilisant l'hémacytomètre. Un nombre de 10^5 cellules ont été étalées dans des pétris de 35 mm en triplicat pour chacun des comptes (24 h, 48 h et 72 h). Les cellules rincées au PBS ont ensuite été trypsinisées, resuspendues dans du milieu OSE complet puis diluées 1:100 dans la solution CASYTON et comptées via le compteur de cellules CASY (CASY Analyzer System). L'expérience a été répétée trois fois, en triplicat.

Essais d'invasion

La capacité invasive des cellules pour les six lignées du cancer épithélial de l'ovaire transfectées ou non avec des ARNi ciblant DEP-1 ou contrôle, a été testée en utilisant une chambre de Boyden modifiée (Fig. S1A). Un volume de 50 μ L de Matrigel (BD Biosciences),

dilué à une concentration de 1mg/mL dans du milieu OSE (WISSENT Inc.), a été déposé sur les inserts de polycarbonate (pores de 8µm)(Costar) qui ont ensuite été incubés trois heures à 37 °C. Les cellules à environ 80 % de confluence, 48 h post-transfection, ont été rincées au PBS, trypsinisées, puis resuspendues dans du milieu OSE (WISSENT Inc.) contenant 1 % FBS. Après avoir été comptées à l'hémacytomètre, 20000 cellules, diluées dans un total de 350µL OSE 1 % FBS ont été déposées sur le Matrigel solidifié. Dans la chambre du bas, du milieu OSE 5 % FBS a été déposé pour créer un gradient de FBS. Les cellules ont ensuite été incubées 16 h à 37 °C et 5 % CO₂. Les cellules ont ensuite été fixées 20 minutes à la formaline et colorées en utilisant une solution de 0,1 % Crystal violet (20% MeOH, dilué dans l'eau). Les cellules se trouvant sous l'insert ont été comptées. L'expérience a été répétée trois fois, en duplicatas.

Zymographie

L'activité des MMP9 et MMP2 sécrétées dans le milieu extracellulaire a été mesurée par zymographie sur gélatine (Fig. S1B). Trente-six heures post-transfection, les cellules ont été sevrées dans un milieu sans sérum pour deux heures, puis stimulées avec 5 % FBS. Le milieu a été collecté à chaque temps indiqué, puis centrifugé pour cinq minutes à 10000 g. Un volume égal de milieu a été dilué dans le tampon de séparation, puis a été déposé sur un gel de polyacrylamide (10 %) contenant 0,1 % (p/v) de gélatine. Après la migration, les gels ont été incubés 2 fois 30 minutes dans une solution de 2,5 % (v/v) Triton, suivi d'une incubation de 30 minutes dans le tampon de développement (200mM NaCl, 5mM CaCl₂, 2.5% Triton, 52mM Tris-HCl) à température pièce. Enfin, les gels ont été incubés 16 à 48 h à 37 °C dans le tampon de développement, suivi d'une coloration au Bleu de Coomassie (Bio-Rad), puis

décolorés (30 % MeOH, 10 % AcCOOH) jusqu'à l'apparition de bandes de décoloration correspondant aux MMP actives.

Immunobuvardage

Les cellules ont été lysées dans un tampon Hepes (50mM pH 7,5) composé de (, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % Igepal, 10 % glycérol, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM phénylméthanesulfonyl fluoride, 1mM Sodium Vanadate, 5mM Sodium Fluoride, 10 µg/ml Aprotinine et 10µg/ml de Leupeptine, puis centrifugées 15' à 13000 g. La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad), puis 30 à 60 µg ont été dilués dans le tampon d'échantillon Laemmli contenant du DTT (100 mM), puis dénaturés 5 minutes à 95 °C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel de polyacrylamide (8 %), suivi d'un transfert sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Bio-Rad). Les membranes ont ensuite été bloquées 60 minutes avec une solution de lait 5% (dilué dans le tampon TBST) pour l'anticorps de DEP-1, et 5 % BSA (dilué dans le tampon TBST) pour les autres anticorps. L'incubation avec les anticorps primaires a eu lieu à 4°C pour 16 à 24 heures. Un lavage de 20' et de 5' au TBST (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, 2.5 mM EDTA) a précédé l'incubation avec l'anticorps secondaire anti IgG de Lapin, Souris ou Chèvre (1:5000), pour une durée de 60 minutes. Suite à 4 lavages de 5 minutes au TBST, la détection des anticorps a été réalisée à l'aide de systèmes à base de chimioluminescence ECL, ECLplus (Amersham) et Visualizer (Millipore).

Anticorps et réactifs

L'anticorps DEP-1 a été acheté chez R&D Technologies. Les anticorps Src (clone 36D10), ERK1/2, p^{S536}P65, p^{Y421}Cortactine, p^{Y1173}EGFR et nonp^{Y529}Src ont été obtenus de Cell

Signaling Technologies. Les anticorps PLC γ et Cortactine (clone AF11) ont été obtenus de Millipore. L'anticorps p^{Y418}Src a été acheté chez BioSource Inc. L'anticorps EGFR vient de chez Santa Cruz. Les anticorps secondaires anti-IgGs de lapin, souris et chèvre, conjugués à la « horseradish peroxidase » (HRP), ont été achetés chez Cell Signaling technologies et utilisés à des dilutions de 1:2500 à 1:10000 (dilués dans le tampon TBST). L'anticorps P65 (clone F-6, Santa Cruz) et l'EGF nous a été fournis par le laboratoire de Dre Anne-Marie Mes-Masson.

Immunofluorescence

Les cellules ont été étalées 24 h post-transfection sur des lamelles de verre à une confluence de 75000 cellules/lamelle, dans une plaque 24 puits. Puis, 36 heures post-transfection, les cellules ont été sevrées pour une durée de 2 heures et stimulées avec 5 % FBS pour les temps indiqués. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline, perméabilisées avec 0,2 % Triton/PBS et bloquées avec une solution de 8 % FBS/PBS. Les lamelles ont ensuite été incubées une heure avec l'anticorps primaire anti-Cortactine, suivi d'une incubation de 45 minutes avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Alexa488 (dilution). Les lamelles ont ensuite été fixées sur une lame de microscopie en utilisant le réactif DAPI Pro-Long Gold (Invitrogen) puis conservées à 4 °C à la noirceur. La fluorescence a été visualisée en utilisant le microscope Nikon Eclipse E600, en utilisant le programme NIS Elements. Le temps d'exposition pour le DAPI était de 200 ms, et 2 s pour la Cortactine. Les photos sont représentatives des résultats obtenus lors de 3 expériences différentes.

La quantification a été effectuée en comptant le nombre total de cellules dans un champ de vision et la population de ces cellules comptant une forte fluorescence au niveau des membranes. Le ratio consiste au nombre de cellules avec la localisation membranaire de la

Cortactine divisé par le nombre total de cellules. Le tout a été rapporté sur le ratio des cellules contrôles non stimulées.

Essai clonogénique

Les cellules préalablement transfectées avec des ARNi contrôles ou ciblant DEP-1 ont été rincées au PBS, trypsinisées, puis étalées dans des pétris de 35 mm à une confluence de 1000 cellules par pétris 24h après la transfection. Vingt-quatre heures plus tard, nous avons ajouté les drogues de chimiothérapie à différentes concentrations, pour une durée de 24 h, ou du milieu sans drogue utilisé comme contrôle. Nous avons arrêté l'essai clonogénique 72h plus tard en fixant les cellules au méthanol (MeOH), suivi d'une coloration avec une solution de 0,1 % Crystal Violet. Le nombre de clones formés par conditions ont ensuite été comptés à l'aide du binoculaire, et l'IC50 a été calculée à partir de la formule suivante :

$$IC50=10^{(\text{Log}EC50-(\text{Log}_{10}((\text{top}-50)/(50-\text{bottom})))}$$

Dans cette formule, *top* désigne la valeur maximale de la courbe de survie, déterminée selon une courbe du pourcentage de survie (pourcentage du nombre de clones de la concentration X/nombre de clones de la condition sans drogue) en fonction de la concentration des drogues à l'échelle logarithmique, et où *bottom* représente la valeur minimale. Ces deux valeurs, ainsi que l'EC50 (concentration ayant un effet à 50%), ont été calculées avec l'aide du logiciel Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc.). Les drogues ont été obtenues à la pharmacie de l'Hôpital Notre-Dame (Carboplatin 10 mg/mL : Paclitaxel 0,25 mg/mL).

ELISA (IL6)

Le kit ELISA pour IL6 a été acheté chez R&D Systems (Minneapolis, MN). L'ELISA a été réalisé selon les instructions du fabricant.

CHAPITRE 3
Résultats

Les niveaux d'expression de DEP-1 corrént avec le potentiel invasif des cellules du cancer épithélial de l'ovaire

Nous avons débuté notre étude en évaluant les niveaux d'expression protéique de DEP-1 par immunobuvardage (IB), à partir de lysats totaux de lignées cellulaires provenant du cancer épithélial de l'ovaire (Tab. S1). Nous avons tout d'abord observé que les lignées exprimaient des niveaux variables en DEP-1 (Fig. 13A), ainsi que le poids moléculaire de DEP-1 était différent dans la lignée TOV1946, suggérant ainsi une mutation pouvant lui conférer un niveau de phosphorylation ou glycosylation différent de celui présent dans les autres lignées. En utilisant un anticorps phospho-spécifique de Src pour sa forme active (p^{Y418}Src), nous n'avons pas observé de corrélation avec les niveaux en DEP-1. Ceci peut s'expliquer par le fait que toutes les lignées sont dérivées de tumeurs de patientes qui présentaient une maladie de grade et de stade élevés (Tab. S1), ayant donc une forme du cancer plus agressive. Comme Src est associé avec la progression de la plupart des cancers (Summy *et al.* 2003), nous croyons que Src est donc fortement activé dans ces lignées et que la présence de DEP-1 va contribuer à l'activation de Src lorsqu'il est présent. Dans la figure 13A nous observons également que les lignées ayant peu de DEP-1 (TOV112D) ont également des niveaux en p^{Y418}Src élevés. Notre hypothèse est donc que DEP-1 n'est pas nécessaire à l'activation de Src mais sa présence dans une lignée cellulaire permettrait de contribuer à l'activation de Src.

Nous avons par la suite effectué des essais d'invasion dans des chambres de Boyden modifiées, c'est-à-dire contenant une couche de Matrigel, mimant ainsi la matrice extracellulaire (Fig. S1A). Ceci nous a permis d'observer une corrélation entre les niveaux d'expression de DEP-1 et la capacité invasive des cellules, dans le sens où la lignée cellulaire

la plus invasive (la lignée TOV21G), est également la lignée exprimant le plus de DEP-1, et ainsi de suite. D'ailleurs, en figure 13C nous pouvons apprécier la corrélation entre le potentiel invasif des différentes lignées cellulaires et les niveaux d'expression de DEP-1 mesurés par densitométrie.

Par contre, ces résultats d'invasion ne corrélient pas avec ce qui a été reporté dans la littérature. Entre autres, selon Ouellet *et al* (2008), la lignée TOV1946 serait plus invasive que la lignée TOV2223G (Tab. S1), alors que nous avons obtenu le résultat opposé. Ceci peut s'expliquer par la méthodologie, puisque dans cette étude, la concentration du Matrigel était plus faible, soit 0,4 mg/ml, alors que dans notre étude nous l'avons utilisé à une concentration de 1 mg/mL, soit plus de 2.5 fois plus concentrée. En effet, lorsque la concentration de Matrigel est en bas de 1mg/mL celui-ci ne forme pas de gel. Avec des concentrations de Matrigel en bas de 1 mg/mL ce serait plutôt une mesure de migration cellulaire au lieu du processus d'invasion cellulaire. Ces deux processus utilisent des voies de signalisations différentes. Entre autre, l'invasion cellulaire requiert la digestion du milieu extracellulaire alors que la migration implique seulement le déplacement cellulaire.

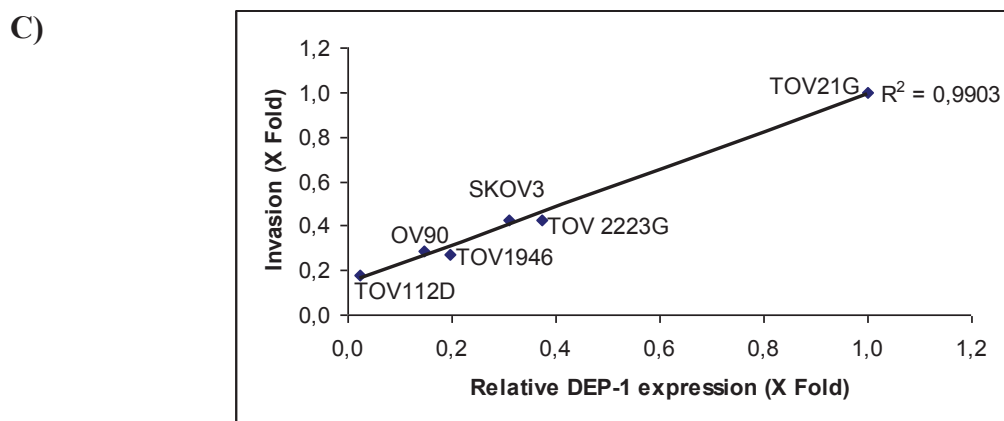
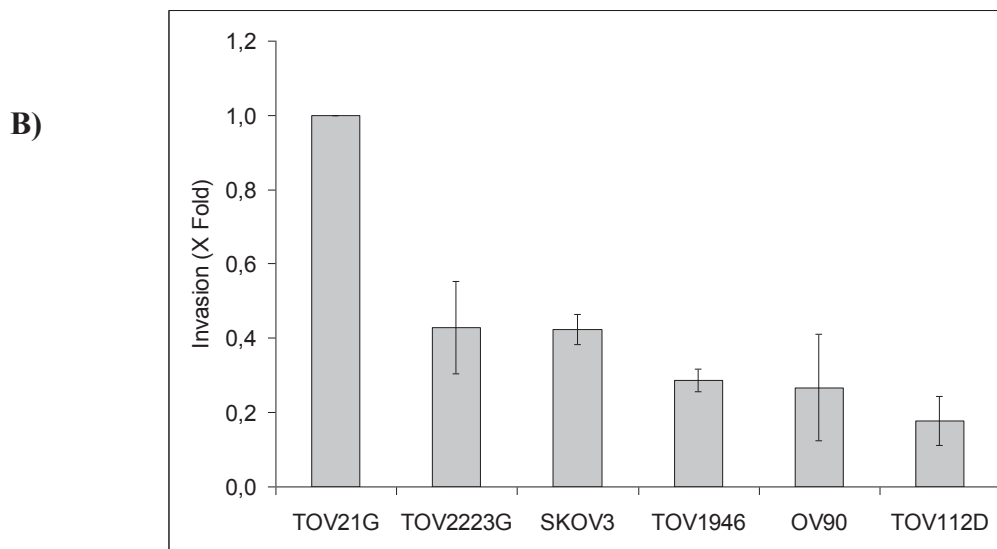
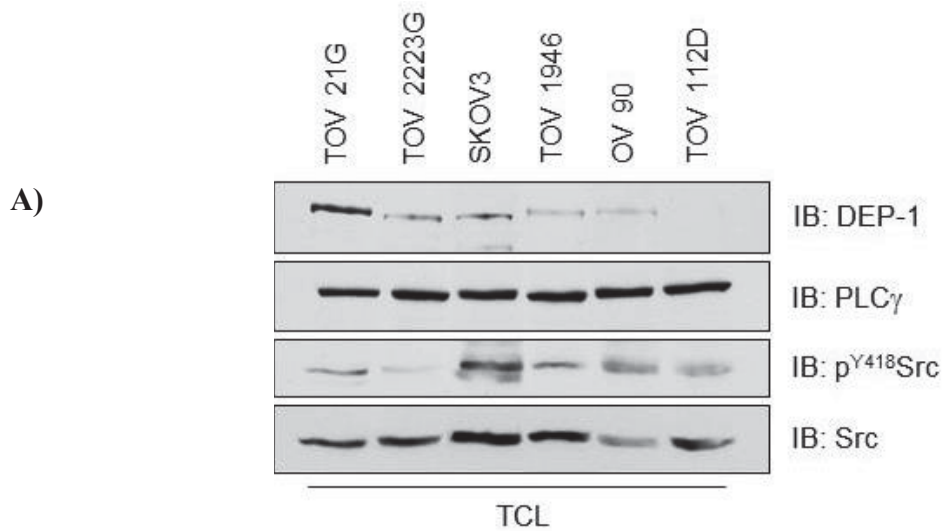


Figure13. L'expression de DEP-1 corrèle avec la capacité invasive des cellules du cancer épithélial de l'ovaire.

DEP-1 est nécessaire pour le processus d'invasion cellulaire in vitro

Nous avons ensuite voulu savoir quels étaient les effets de la déplétion en DEP-1 par transfection d'ARNi. Nous avons observé que lorsqu'on active Src dans les cellules traitées aux ARNi controle, soit augmentation de sa phosphorylation en tyrosine 418, il y a une diminution de la phosphorylation en tyrosine 418 de Src dans les cellules TOV21G déplétées en DEP-1 (Fig. 14A). Également, lorsqu'on regarde une cible de Src impliquée dans la signalisation de l'invasion cellulaire, la Cortactine, l'on voit sa phosphorylation diminuer en tyrosine 421 (site de phosphorylation par Src) (Fig. 14A). Ces observations se sont répétées dans plusieurs des lignées présentées en Figure 13. Dans la lignée SKOV3, la déplétion de l'activation de Src n'est toutefois pas claire, même si nous observons une baisse de la phosphorylation de la Cortactine (Fig. S2B). De plus, cet effet n'est pas observé dans la lignée TOV2223G (Fig. S2A). À ce jour, nous n'arrivons toujours pas à expliquer ces résultats.

La Cortactine est une protéine d'échafaudage. C'est-à-dire que sa localisation cellulaire est importante pour médier ses fonctions, telles la réorganisation du cytosquelette d'actine et la sécrétion de métalloprotéinase (MMP) (Ammer *et al.* 2008). Nous avons donc suivi la localisation cellulaire de la Cortactine par immunofluorescence. Ce que nous avons observé est que dans les cellules transfectées avec des ARNi CTL, une stimulation au FBS induit la localisation membranaire de la Cortactine aux protrusions membranaires (Fig. 14B). D'ailleurs, par quantification du nombre de cellules ayant une localisation membranaire de la Cortactine aux protrusions, par rapport au nombre de cellules totales, nous observons une augmentation de deux fois de cette localisation (Fig. 14B). Dans les cellules ayant été déplétées en DEP-1 par transfection d'ARNi, nous n'avons pas observé cette localisation

(Fig. 14B, panneau droit), en fait, nous avons observé une absence d'induction de la localisation membranaire de la Cortactine dans ces cellules. Nous avons d'ailleurs observé ces résultats dans une autre lignée, la SKOV3 (Fig. S4).

Par la suite, nous avons suivi la sécrétion de métalloprotéinases par la lignée TOV21G, dans le milieu extracellulaire suite à une stimulation au FBS. La zymographie sur gélatine (Fig. S1B) permet de suivre la présence de métalloprotéinases actives, plus précisément la MMP-2 ainsi que la MMP-9 (Vandooren *et al.* 2013). Nous avons privilégié ces deux formes de MMP puisqu'il a déjà été démontré que ces deux enzymes sont importantes pour initier la formation de métastases par les cellules du cancer épithélial de l'ovaire, que ce soit pour quitter le site primaire de la tumeur, soit pour initier la formation d'une tumeur à des sites distants de la tumeur primaire, le site principal étant la cavité intrapéritonéale (Lengyel *et al.* 2010). D'ailleurs, selon Schmalfeldt *et al.* (2001), les niveaux d'expressions de ces deux MMP sont associés avec l'avancement du cancer épithélial de l'ovaire. L'expression de MMP2 (Wang *et al.* 2013) et MMP9 (Li *et al.* 2013) par les tumeurs épithéliales ovariennes seraient également associées avec un mauvais pronostic. Nous avons donc observé une augmentation de la sécrétion de MMP9 et de MMP2 dans les cellules transfectées avec les ARNi CTL suite à une stimulation au FBS (Fig. 14C). Dans les cellules déplétées en DEP-1, la stimulation au FBS a induit la sécrétion de MMP; toutefois la quantité sécrétée est fortement diminuée en comparaison aux cellules CTL (Fig. 14C).

Tous ces résultats nous démontrent bien que cette voie de signalisation pro-invasive est perturbée en absence de DEP-1. Ce qui se traduit par une perte du potentiel invasif des cellules TOV21G dans le Matrigel d'environ 50 % (Fig. 14D). Nous avons également répété ces

expériences dans les lignées SKOV3, TOV1946 et OV90 (Fig. S3), l'effet étant plus important dans la lignée TOV1946. Toutefois, la lignée TOV2223G n'a pas répondu de la même manière à la déplétion en DEP-1, ce qui corrèle avec la signalisation (Fig14A). À ce jour, nous n'avons toujours pas réussi à comprendre la raison pour laquelle la lignée TOV2223G est réticente à l'inhibition de DEP-1.

Finalement, nous avons suivi la prolifération des cellules sur 72 h et n'avons pas observé de différences entre les cellules TOV21G transfectées avec les ARNi CTL et DEP-1 (Fig. 14E). Ce qui nous confirme que les effets observés ne sont pas due au rôle antiprolifératif de DEP-1. Cela peut également nous suggérer une mutation possible de DEP-1 dans cette lignée, l'empêchant de médier ses fonctions antiprolifératives, tout en conservant ses fonctions pro-invasives.

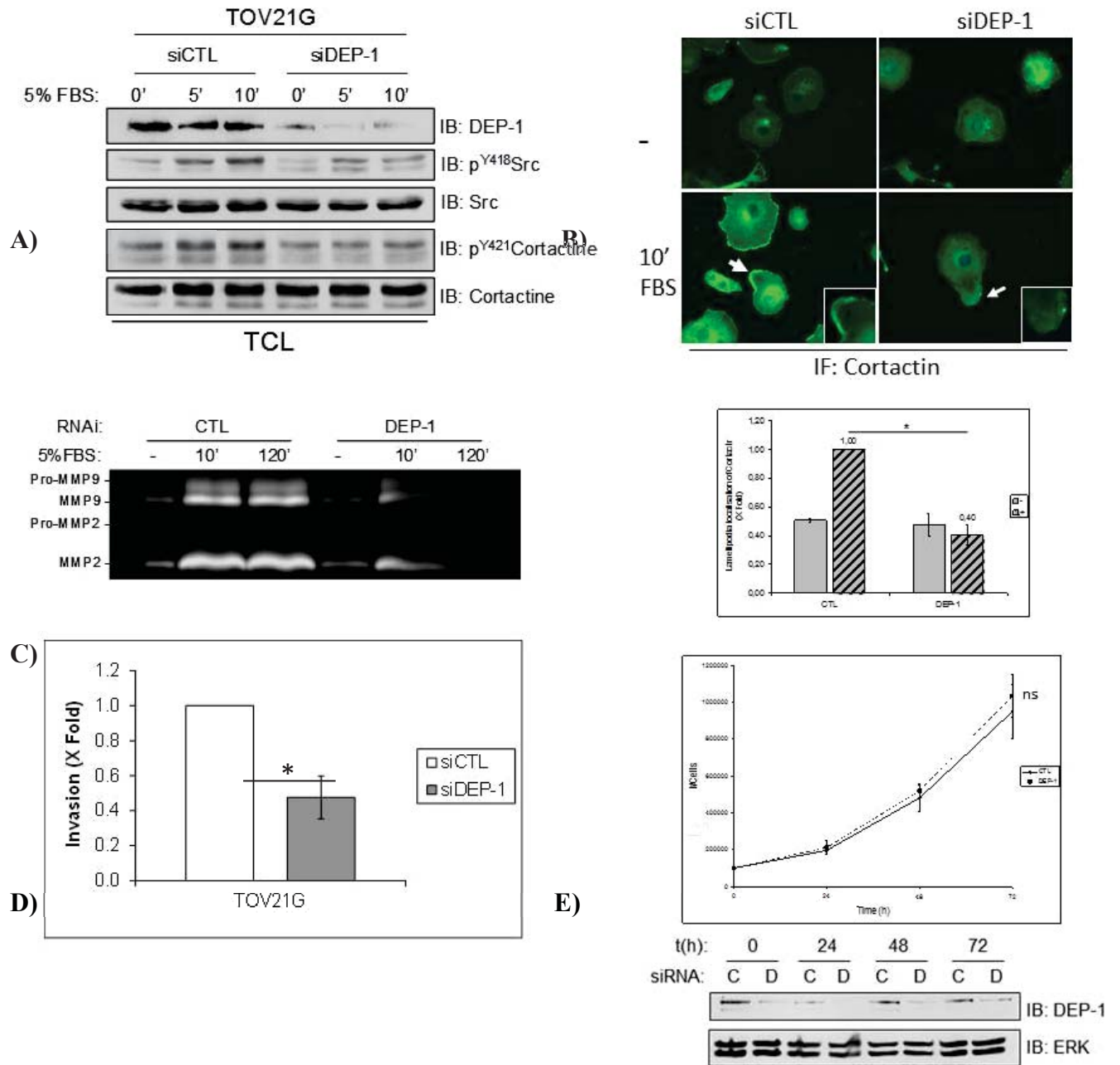


Figure14. La déplétion de DEP-1 abolit les fonctions pro-invasives dans la lignée cellulaire TOV21G.

DEP-1 est impliquée dans les voies de signalisation de P65 (NfκB) et EGFR

Nous avons ensuite été intéressés à vérifier le rôle de DEP-1 dans la signalisation de P65 et EGFR (Fig. 15A et B). Tout d'abord, il est connu que Syntenine et Syndecan interagissent ensemble ce qui active Syndecan, et que la signalisation de Syndecan mène à l'activation de P65 qui est dépendante de Src (Habib *et al.* 2008; Gangemi *et al.* 2012; Das *et al.* 2012; Zimmerman *et al.* 2005). Syndecan2 est également un ligand reconnu de DEP-1 (Whiteford *et al.* 2011), et il est connu que DEP-1 et Syntenine peuvent interagir ensemble (Iuliano *et al.* 2001). De plus, DEP-1 est impliquée dans la stabilité de l'EGFR (Tarcic *et al.* 2009), et la signalisation d'EGFR peut également mener à l'activation de P65 (Nishi 2003) et de Src (Denning *et al.* 1996). De plus, EGFR est associé avec un mauvais pronostic dans le cancer épithélial de l'ovaire (Faruk *et al.* 2014). C'est donc pour ces raisons que nous nous sommes intéressés à l'étude de ces deux protéines.

Tout d'abord, en réponse au FBS, nous avons observé une diminution des niveaux de P65 dans les cellules TOV21G transfectées avec des ARNi ciblant DEP-1, en comparaison aux cellules transfectées avec des ARNi CTL. P65 est impliquée dans la transcription de gènes régulant dans l'invasion cellulaire, tel le gène de MMP9 (Lee *et al.* 2014). La perte de signalisation de P65 dans les TOV21G déplétées en DEP-1 est donc associée à une perte du potentiel invasif de ces cellules dans le Matrigel tel que vu plus tôt (Fig. 14D).

Suite à une stimulation à l'EGF, nous avons observé dans les cellules TOV21G déplétées en DEP-1 une diminution de la non-phosphorylation de Src en tyrosine 529 (Fig. 15B), donc une augmentation de la phosphorylation sur la tyrosine inhibitrice de Src, signe d'une diminution de son activité enzymatique. Nous observons également une induction

de la phosphorylation du récepteur à l'EGF dans les cellules transfectées aux ARNi CTL, ce qui est diminué dans les cellules déplétées en DEP-1 (Fig. 15B). Nous observons également une baisse des niveaux du récepteur suite à la stimulation. Comme DEP-1 possède un rôle dans la stabilité du récepteur (Tarcic 2009), son absence semble créer une instabilité qui augmenterait probablement sa dégradation. Dans les stimulations à l'EGF, nous constatons également une diminution des niveaux de P65 dans les cellules déplétées en DEP-1 (Fig. 15B).

Cette baisse des niveaux de P65 corrélée corrèle avec une perte du potentiel invasif des cellules en réponse au FBS (Fig. 14D) et en réponse à l'EGF (Fig. 15C), ce qui est cohérent avec son rôle dans l'invasion cellulaire (Wang *et al.* 2013). Nous avons également pu observer une diminution de la sécrétion d'IL6, l'un des gènes cible de P65 (Libermann *et al.* 1990), lors d'une stimulation de 24h à l'EGF (Fig. S5), suggérant que la perte des niveaux en P65 résulte en une perte d'activité transcriptionnelle de ses gènes cibles. Étant donné le rôle connu de P65 dans la chimiorésistance (Yang *et al.* 2011; Cao *et al.* 2008; Hiss *et al.* 2012), nous avons mesuré la survie des cellules TOV21G par essai clonogénique après un traitement de 24 h avec deux drogues couramment utilisées pour le traitement du cancer épithélial de l'ovaire, soit le Paclitaxel et le Carboplatin. Nous avons remarqué qu'en réponse au traitement au Carboplatin, les cellules avaient une diminution de 50 % de l'IC50 (concentration de drogue qui diminue la survie à 50 %), et donc que DEP-1 semble contribuer à la chimiorésistance au Carboplatin de ces cellules. Nous n'avons toutefois pas observé d'effet sur la survie des cellules suite à la déplétion de DEP-1 en présence de Paclitaxel. Ceci est consistant avec ce qui est connu de la littérature, où P65 est reconnue pour son rôle bivalent dans la chimiorésistance du cancer de l'ovaire *in vitro* (Yang *et al.* 2011). Comme P65 est impliquée dans la transcription de gènes régulant autant l'apoptose que la survie, il n'est pas

surprenant de voir deux effets différents de la déplétion de DEP-1 sur la résistance aux drogues couramment utilisées pour le traitement du cancer de l'ovaire, effet pouvant être différent d'une lignée cellulaire à l'autre. Les différents mécanismes d'action des deux drogues peuvent également expliquer la différence de réponse. Le Carboplatin est un agent alkylant de l'ADN (Cure *et al.* 2000) alors que le Paclitaxel est un inhibiteur mitotique. (Horwitz *et al.* 1994)À ce jour, nous ne savons toujours pas comment la déplétion en DEP-1 entraîne des effets différents en réponse aux drogues utilisées en chimiothérapie. Une investigation plus poussée serait nécessaire afin de comprendre cette différence en survie.

Bref, ces résultats nous démontrent un rôle pour DEP-1 dans la régulation de P65 et de l'EGFR, ce qui non seulement promeut le potentiel invasif des cellules, mais semble procurer une certaine résistance au Carboplatin *in vitro*, dans la lignée TOV21G.

Figure 5

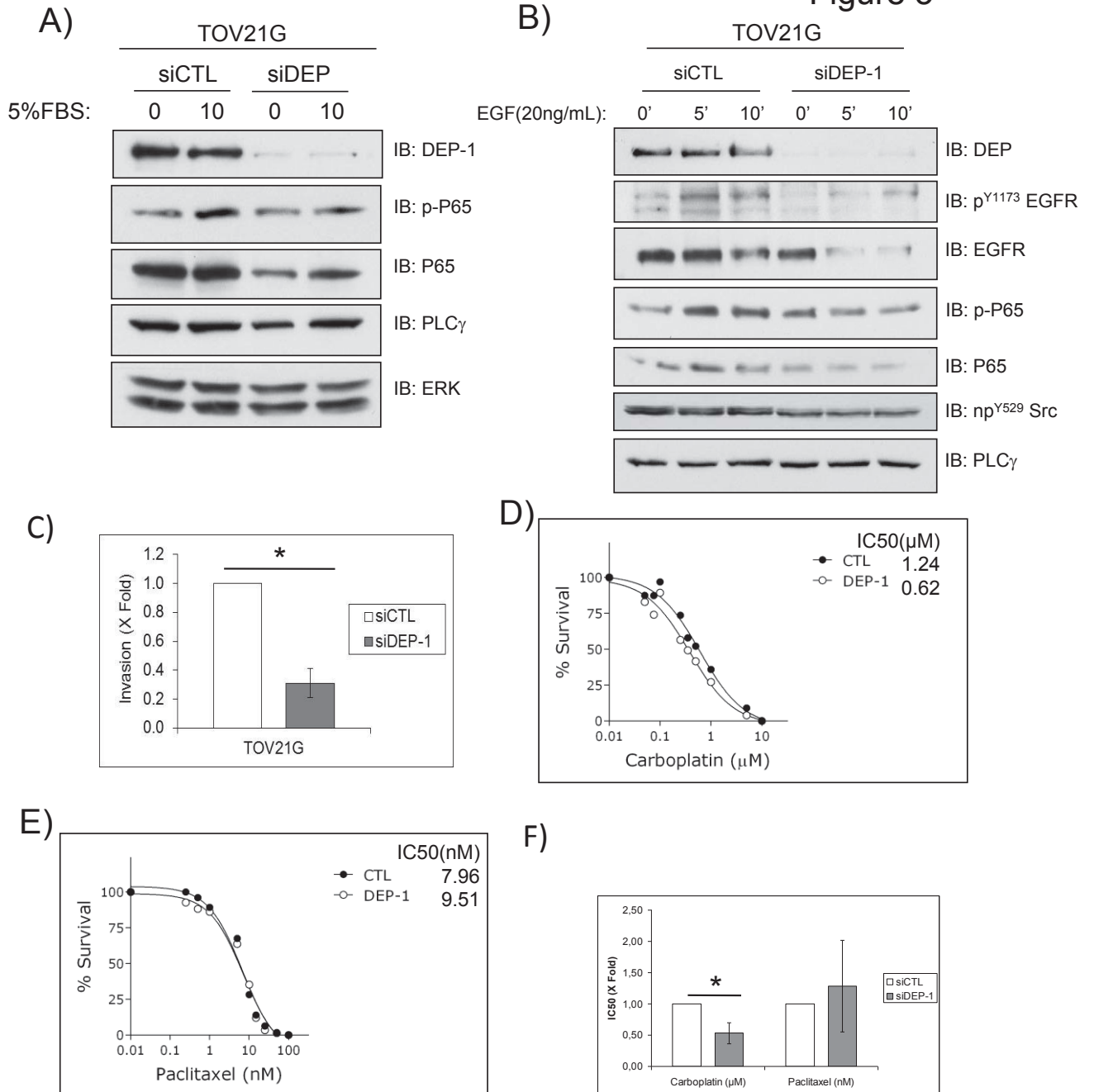


Figure 15. DEP-1 est impliquée dans la signalisation de P65 et EGFR dans les TOV21G.

DEP-1 est associée avec un CÉO plus agressif

Nous avons fait un marquage de DEP-1 sur un microétalage de tissus (Fig. S1C) qui comportait des échantillons de tumeurs du cancer épithélial de l'ovaire d'histotype séreux, de différents grades et stades (Fig. 16, Tab. 1). Deux observateurs ont évalué, en attribuant un score de 0 à 3, les niveaux d'expression en DEP-1. À l'aide des données cliniques mises à jour (Tab. 1), nous avons pu effectuer des tests statistiques à partir du logiciel SPSS. La spécificité de l'anticorps a été vérifiée par marquage de culots de cellules transfectées avec des ARNi CTL comparés aux cellules traitées aux ARNi ciblant DEP-1.

Nous avons voulu comparés les niveaux d'expression en DEP-1 avec la progression du cancer et la survie des patientes, facteurs pouvant être affecté par la capacité invasive des cellules. Nous avons également comparés les niveaux d'expression en DEP-1 selon les sous groupes de la maladie car le cancer épithélial de l'ovaire de bas grade et de haut grade sont de plus en plus considérés comme deux maladies distinctes.

Dans un premier temps, en effectuant des corrélations de Pearson en incluant toutes les patientes de la cohorte, les tumeurs bénignes, de bas grade et de haut grade, nous avons obtenu une forte corrélation ($p < 0.001$) avec le grade (Tab. 2). Nous avons également fait cette observation en éliminant les patientes ayant des tumeurs bénignes ($p = 0.002$) (Tab. 2). Le grade désigne le degré de malignité du cancer de l'ovaire. L'expression croissante de DEP-1 est donc fortement associée à des cancers de l'ovaire de type haut grade, qui est la forme la plus agressive du cancer épithélial de l'ovaire.

Avec les données catégorisées (expression faible, intermédiaire, élevée), nous n'avons pas pu faire de corrélation entre l'expression de DEP-1 et un critère associé à l'acquisition de

propriétés pro-invasives,(Tab. 2), tel que la maladie résiduelle qui consiste en la quantité de tumeurs restant dans la patiente suite à la chirurgie. Cette caractéristique est évaluée visuellement par le chirurgien lors de la chirurgie, et la quantité de maladie résiduelle est influencée par l'acquisition de propriétés pro-invasives. Par contre, nous avons observés une corrélation avec le stade de la maladie (le niveau d'étalement dans l'organisme des métastases), qui est un autre facteur permettant d'évaluer un critère pro-invasif *in situ*. En effet, chez les patientes avec un bas grade ($p=0.024$), de haut grade ($p=0.030$), haut et bas grade ensemble ($p=0.005$), ainsi que dans le groupe de patientes comportant les tumeurs bénignes ($p=0.001$), nous avons pu observer cette corrélation avec le stade (Tab. 2).

Nous avons également observés que chez les 21 patientes ayant un cancer bénins (également appelés borderline), 100% expriment DEP-1 à des niveaux faibles voire nulle (Tab. 1).

En effectuant des courbes de survie et de progression de Kaplan-Meier (Fig. 17), nous avons observés une corrélation avec la survie des patientes, c'est-à-dire que les patientes ayant une expression élevée en DEP-1 ont eu une survie plus écourtés que le reste des patientes ayant une expression intermédiaire ou élevée ($p<0.005$) (Fig. 17A – panneau gauche). Par contre aucune corrélation n'a été faite pour la progression de la maladie ($p=0.129$), c'est-à-dire pas de corrélation avec les rechutes des patientes (Fig. 17A – panneau droit). Bien qu'on observe une certaine tendance pour les patientes ayant des niveaux d'expression élevée en DEP-1 et la présence de rechute chez ces patientes, le nombre de patientes avec un niveau élevé en DEP-1 reste un échantillon trop petit pour pouvoir observer une corrélation significative.

Lorsque nous sélectionnons le groupe de patientes ayant un cancer de bas grade et de haut grade, nous observons toujours cette tendance avec la survie ($p=0.017$) et la progression ($p=0.642$). D'où l'effet de DEP-1 sur la survie n'est pas affecté par son absence d'expression chez les patientes ayant des tumeurs bénignes et un bon pronostic.

Comme de plus en plus la communauté scientifique s'entend pour dire que les cancers de l'ovaire de bas et de haut grade sont différents, il a été essentiel d'effectuer les mêmes tests de Kaplan-Meier sur les groupes de patientes présentant un cancer de bas grade seulement (Fig. 17D), et de haut grade seulement (Fig. 17C). Chez les patientes ayant un cancer de l'ovaire de haut grade, l'expression élevée en DEP-1 corrélait significativement avec la survie ($p=0.021$), mais pas avec la progression de la maladie ($p=0.374$). Le groupe d'échantillonnage de patientes de bas grade étant faible, il est difficile de conclure, par contre nous observons une certaine tendance avec la survie ($p=0.617$), malgré que ce ne soit pas significatif, et une forte corrélation avec la progression de la maladie ($p<0.005$).

Nous avons également effectué un marquage en DEP-1 sur un microétalage de tissus (Fig. S1C) qui comportait des échantillons de patientes ayant un cancer épithélial de l'ovaire à cellules claires (voir chapitre 1). Les niveaux d'expression étaient en général plus faibles dans ce sous-type de cancer (Fig. S6A). Dans ces patientes, aucune corrélation n'a pu être effectuée avec les critères de la maladie, ou la survie et la progression (Tab. S2), bien qu'une certaine tendance suggère que des niveaux élevés de DEP-1 soient associées avec une moins bonne survie ($p=190$) et progression ($p=0.117$) de ces patientes (Fig. S6B). Il est important de mentionner que le cancer de l'ovaire à cellules claires est la forme la plus agressive du cancer épithélial de l'ovaire, et toutes les tumeurs incluses dans l'étude provenaient de patientes ayant

un cancer épithélial de l'ovaire de grade élevé. Un plus grand échantillonnage de patientes seraient nécessaire afin d'observer un quelconque effet de DEP-1 sur la survie/progression.

Avec les données disponibles en ligne d'un puce à ADN analysant la quantité d'ARNm de tumeurs de patientes ayant un cancer épithélial de l'ovaire d'histotype séreux, nous avons fait une analyse de survie selon la surexpression, ou la sous-expression de l'ARNm en DEP-1, par rapport au tissus sein de la même patiente, chez 563 patientes (Fig. 17 A/B). Ce qui est sorti de cette étude, est que la surexpression en DEP-1 résulte en une diminution significative de la survie chez les patientes (Fig. 17A), alors que la sous expression en DEP-1 n'affecte pas la survie des patientes (Fig. 18B). Ceci corrèle avec l'analyse du TMA (Fig. 17) effectué dans notre étude.

Tableau 1. Caractéristiques de la cohorte de patientes du TMA des patientes ayant un CÉO d’histotype séreux.

| Critères | total | # patientes Expression DEP-1 | | |
|--------------------|-------|---------------------------------|---------------|--------|
| | | Faible | Intermédiaire | Élevée |
| Toutes patientes | 121 | 58 | 52 | 11 |
| Bénigne | 21 | 21 | 0 | 0 |
| Grade | | | | |
| Bas grade | 11 | 9 | 2 | 0 |
| Haut grade | 89 | 28 | 50 | 11 |
| Stade | | | | |
| I | 11 | 9 | 2 | 0 |
| II | 8 | 6 | 1 | 1 |
| III | 89 | 42 | 38 | 9 |
| IV | 13 | 1 | 11 | 1 |
| Maladie résiduelle | | | | |
| Non | 30 | 15 | 11 | 4 |
| <1cm | 25 | 15 | 10 | 0 |
| >1cm,<2cm | 6 | 3 | 3 | 0 |
| >2cm | 40 | 14 | 20 | 6 |
| N/D | 20 | 11 | 8 | 1 |

Tableau 2. Corrélation de Pearson selon l’échantillonnage de patientes ayant un CÉO d’histotype séreux. Groupe 1 : toutes les patientes. Groupe 2 : patientes ayant un CÉO de bas et de haut grade. Groupe 3 : patientes ayant un CÉO de bas grade. Groupe 4 : patientes ayant un CÉO de haut grade.

| Groupe de patientes --> | | Donnée catégorisée | | | |
|------------------------------------|---------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Grade | Pearson | 0.504 | 0.306 | nd | nd |
| | sigma | <0.001 | 0.002 | | |
| Maladie Résiduelle | Pearson | 0.148 | 0.091 | 0.584 | 0.036 |
| | sigma | 0.140 | 0.417 | 0.076 | 0.763 |
| Stade | Pearson | 0.291 | 0.278 | 0.671 | 0.313 |
| | sigma | 0.001 | 0.005 | 0.024 | 0.003 |
| <i>Contrôle interne</i> | | <i>Person</i> | <i>0.276</i> | <i>0.250</i> | <i>0.389</i> |
| <i>Maladie Résiduelle VS Stade</i> | | <i>sigma</i> | <i>0.005</i> | <i>0.024</i> | <i>0.266</i> |

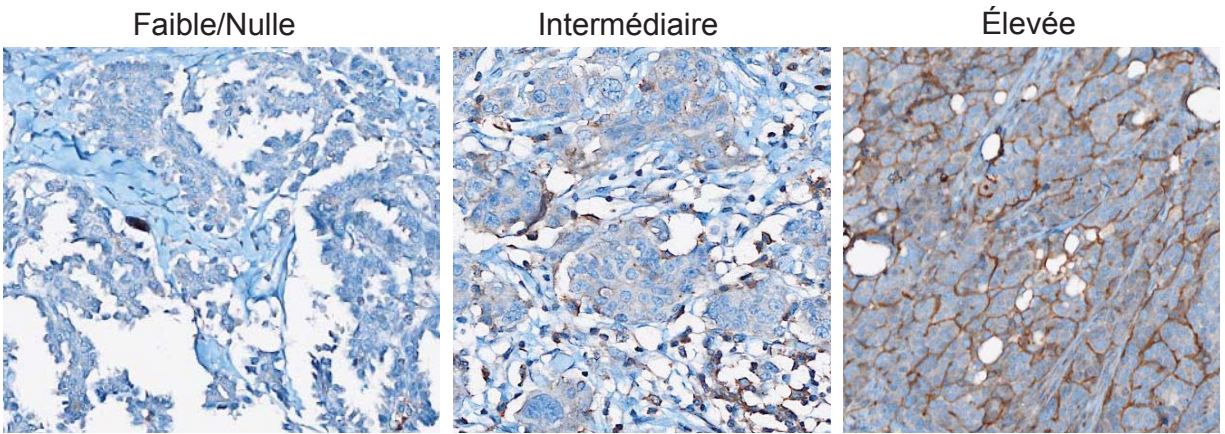


Figure 16. Exemple de marquage pour l'étude de l'expression de DEP-1 sur les tumeurs épithéliales ovariennes d'histotype séreux.

Gauche : exemple de marquage faible/nulle. Milieu : exemple de marquage intermédiaire.
Droite : exemple de marquage élevé.

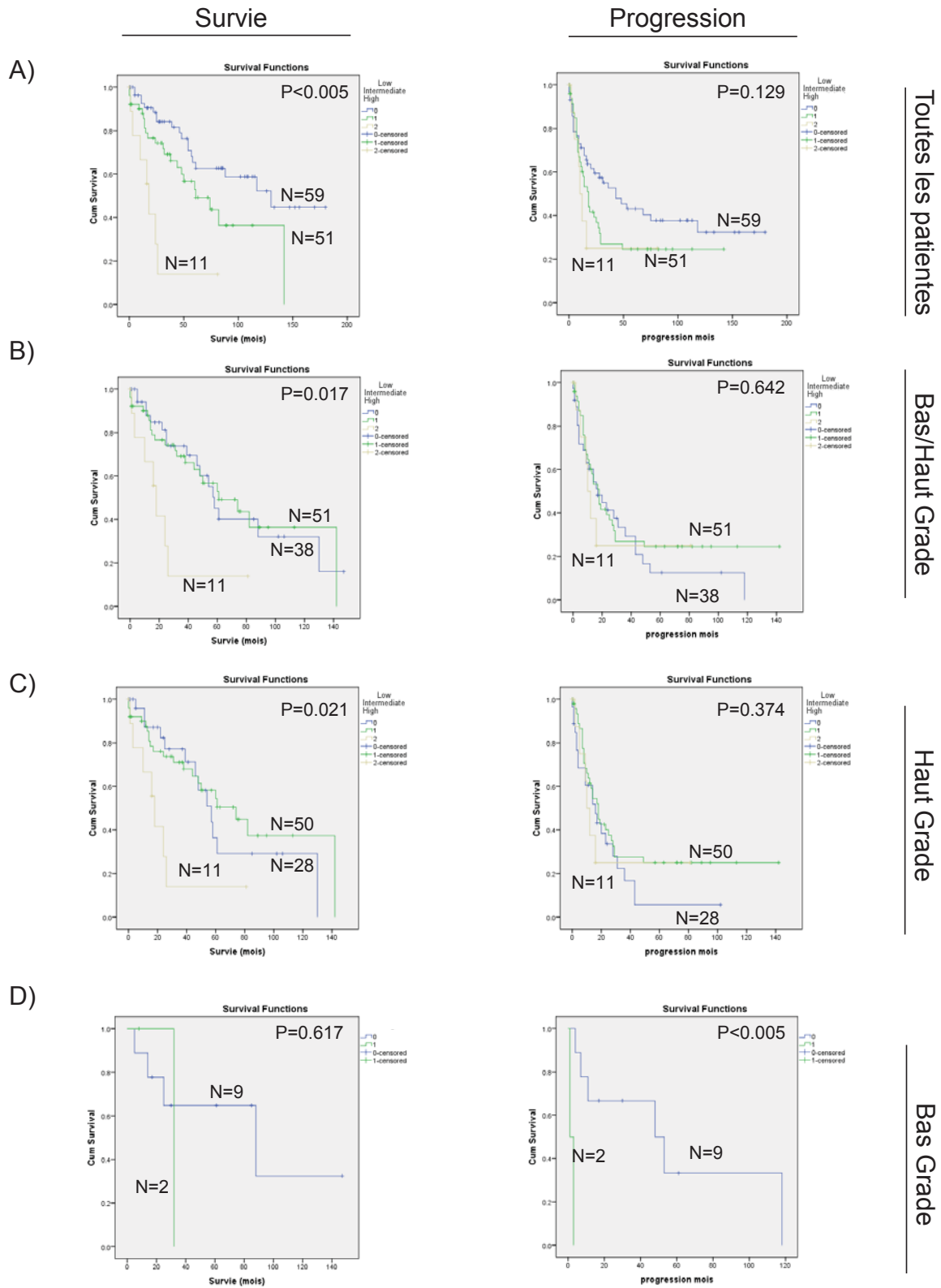


Figure 17. Immunohistochimie de DEP-1 sur les tumeurs épithéliales ovariennes d'histotype séreux.

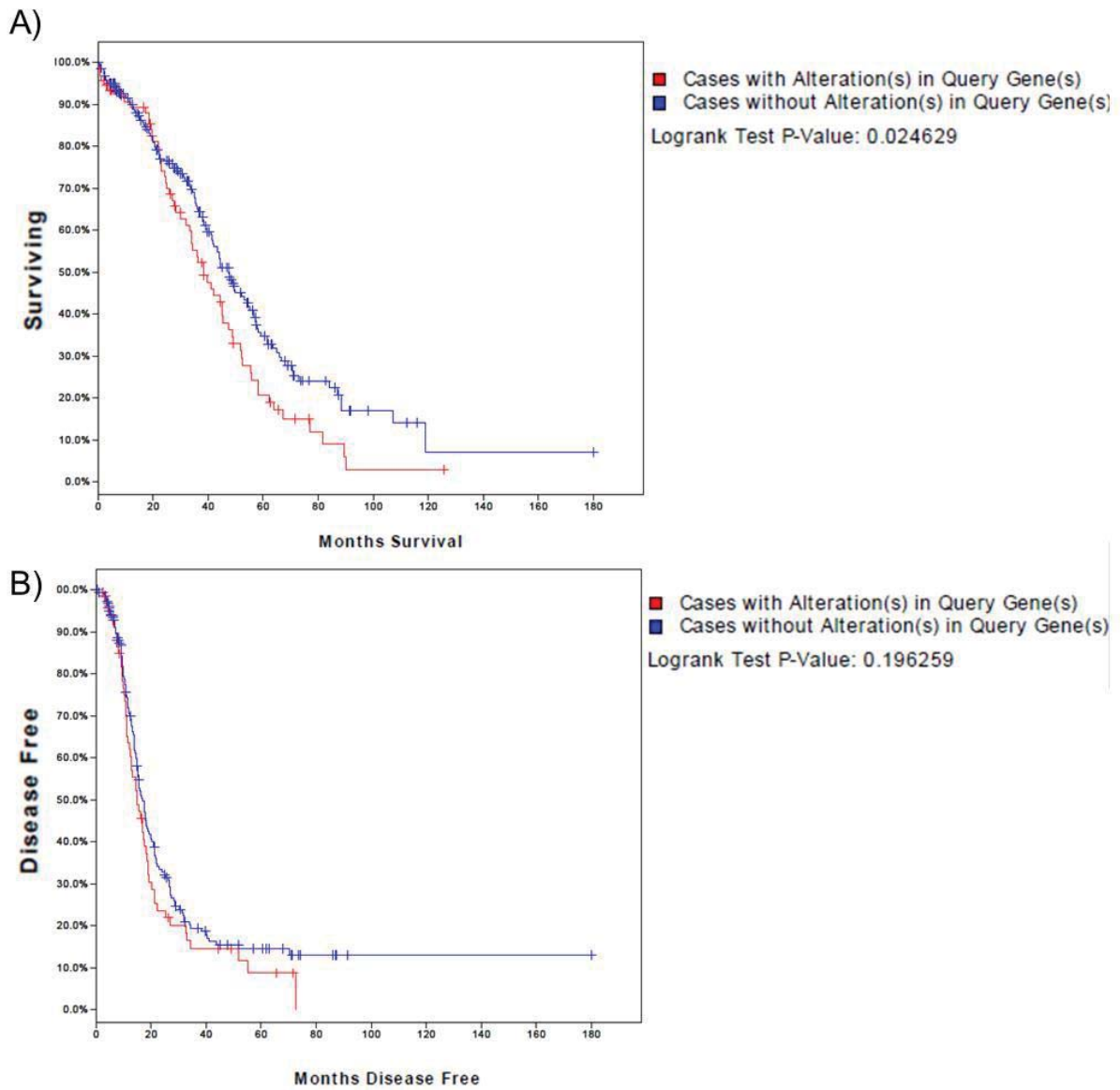


Figure 18. Corrélation de survie sur un microarray comportant des tumeurs du CÉO séreux.

Légendes des figures

Figure13. L'expression de DEP-1 corrèle avec la capacité invasive des cellules du CÉO.

A) Les cellules confluentes ont été lysées pour extraire les protéines, puis l'analyse quantitative de l'expression de DEP-1, p^{Y418}Src et Src a été fait par immunobuvardage, en utilisant des anticorps spécifiques. PLC γ sert de contrôle d'uniformité du chargement de protéines; **B)** Représentation graphique des essais d'invasion effectuée en chambre de Boyden contenant une couche de Matrigel. Le nombre de cellules ayant envahi le Matrigel selon un gradient 5 % FBS est représenté par son ratio par rapport à la lignée TOV21G; **C)** Représentation graphique de la corrélation entre l'expression de protéines de DEP-1 mesurée par densitométrie (rationalisée sur PLC γ ; axe des X), et le potentiel invasif des lignées (axe des Y). R² représente le coefficient de corrélation entre les deux facteurs.

Figure14. La déplétion de DEP-1 abolit des fonctions pro-invasives dans la lignée TOV21G.

A) Les cellules ont été sevrées 16 h, suivi d'une stimulation au FBS pour le temps indiqué, puis ont été lysées pour extraire les protéines. L'analyse quantitative de l'expression de DEP-1, p^{Y418}Src, Src, p^{Y421}Cortactine et Cortactine a été fait par immunobuvardage, en utilisant des anticorps spécifiques; **B) Haut :** Immunofluorescence de la Cortactine, effectuée sur des cellules ayant été sevrées puis stimulées avec 5 % FBS pour le temps indiqué. Les flèches blanches pointent un lamellipode. L'encadré représente un agrandissement du lamellipode. **Bas :** représentation quantitative de l'enrichissement membranaire de la Cortactine au moyen de trois expériences; *p<0.05 **C)** Zymographie sur gélatine du milieu de culture de cellules stimulées au FBS pour le temps indiqué. Les bandes blanches représentent la dégradation de la gélatine, présentant une activité métalloprotéinase. **D)** Essai d'invasion des cellules, ratio sur la lignée transfectée aux ARNi CTL. **E)** DEP-1 n'affecte pas la prolifération cellulaire de la lignée TOV21G. *NS : non-significatif; * p<0.05*

Figure 15. DEP-1 est impliquée dans la signalisation de P65 et EGFR dans les TOV21G

A) Les cellules ont été sevrées 16 h, suivi d'une stimulation au FBS pour le temps indiqué, puis ont été lysées pour extraire les protéines. L'analyse quantitative de l'expression de DEP-1, p^{S536}P65 et P65a été faite par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. **B)** Les cellules ont été sevrées 16 h, suivi d'une stimulation à l'EGF pour le temps indiqué, puis ont été lysées pour extraire les protéines. L'analyse quantitative de l'expression de protéines et de leurs niveaux de phosphorylation par immunobuvardage, en utilisant des anticorps spécifiques. **C)** Essai d'invasion des cellules, ratio sur la lignée transfectée aux ARNi CTL. **D)** Courbe de survie mesurée par essai clonogénique en réponse au Carboplatin, sur échelle logarithmique, et **E)** en réponse au Paclitaxel. **F)** Les moyennes des IC50 obtenus en **D)** et **E)** de trois expériences ont été rapportées sur les cellules transfectées aux ARNi CTL. * p<0.05

Figure 16. Exemple de marquage pour l'étude de l'expression de DEP-1 sur les tumeurs épithéliales ovariennes d'histotype séreux.

Gauche : exemple de marquage faible/nulle. Milieu : exemple de marquage intermédiaire.
Droite : exemple de marquage élevé.

Courbe de survie (panneau de gauche) et de progression (panneau de droit) de Kaplan-Meier avec toutes les patientes ayant un CÉO séreux (**A**), les patientes ayant un CÉO de bas et de haut grade (**B**), de haut grade (**C**), et de bas grade (**D**). Selon une expression en DEP-1 faible (courbe bleu), intermédiaire (courbe verte) ou faible/nulle (courbe jaune). La censure représente le moment de la dernière information d'une patiente (décès/arrêt de suivi/rechute).

A) selon la surexpression de DEP-1 (cas altérés) au niveau de l'ARNm ($\text{Log}_2 > 0.5$), 23% des échantillons de tumeurs ont des niveaux altérés qui corrélerent avec une moins bonne survie des patientes (courbe rouge), **B**) selon la diminution d'expression de DEP-1 (cas altérés) au niveau de l'ARNm ($\text{Log}_2 < -0.5$), la courbe rouge représente 27% des cas altérés. (TCGA 2011)

CHAPITRE 4
Discussion

Durant ces travaux, nous démontrons que DEP-1 est exprimée et qu'elle est nécessaire pour le processus d'invasion cellulaire dans la majorité des lignées cellulaires du cancer épithélial de l'ovaire. D'abord, nous avons démontré que DEP-1 est exprimée dans les lignées cellulaires du CÉO, et ce, à des niveaux variables (Fig 13A). Ces niveaux corrélaient avec le potentiel invasif des cellules dans le Matrigel (Fig 13B et C). Par des expériences d'ARNi, où les niveaux d'expression de DEP-1 ont été inhibés, nous avons démontré que, dans la plupart de ces lignées, DEP-1 était nécessaire pour promouvoir l'invasion des cellules (Fig 14D et Fig S3). Nous avons également démontré que cette promotion de l'invasion par DEP-1 semble corrélérer avec sa capacité à activer la kinase Src, selon un mécanisme connu de déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice de Src, ce qui résulte en une phosphorylation de la Cortactine en tyrosine 421, le substrat de Src (Fig 14A et Fig S2). La phosphorylation de Cortactine ainsi favorisée, il y a promotion de sa localisation membranaire (Fig 14B et Fig S4), ce qui aurait pour effet de promouvoir la sécrétion de métalloprotéinases (Clark 2007) (Fig 14C).

Nous avons également pu confirmer le rôle de DEP-1 dans la stabilité du récepteur à l'EGF avec des expériences d'ARNi dans la lignée cellulaire TOV21G (Fig. 15B) (Tarcic 2009), et que cette stabilisation permettait l'invasion des cellules dans le Matrigel en réponse à l'EGF, le ligand de l'EGFR (Fig. 15C).

P65 est une sous-unité du facteur de transcription NfκB qui est également impliquée dans le processus d'invasion cellulaire (Annunziata 2010). Nous avons observé que DEP-1 était associée avec des niveaux plus élevés de P65 (Fig. 15A,B). Nous avons également fait ces observations en réponse au FBS (Fig. 15A) et à l'EGF (Fig. 15B), dans la lignée TOV21G.

Plusieurs études ont rapporté un rôle de P65 dans la chimiorésistance de plusieurs modèles de cancer *in vitro*, incluant le cancer épithélial de l’ovaire (Yang 2011). Ce rôle semble dépendre du contexte cellulaire et du médicament utilisé. Dans la lignée TOV21G, nous avons observé que DEP-1 était associée avec une plus forte résistance des cellules au Carboplatin et qu’il n’avait pas d’effet sur la résistance des cellules au Paclitaxel, deux drogues utilisées pour le traitement du cancer épithélial de l’ovaire (Fig. 15D et E). Nous avons en effet observé une baisse de l’IC50 de la lignée TOV21G de 50 % avec le traitement au Carboplatin, et aucune différence avec le traitement au Paclitaxel (Fig. 15F), ce qui concorde avec le rôle bivalent de P65 dans la chimiorésistance. Par contre, nous ne pouvons conclure que le rôle de DEP-1 dans la chimiorésistance du Carboplatin dans la lignée TOV21G soit dû à un effet unique et direct de P65. Nous n’avons pas été en mesure de vérifier les niveaux d’expression en protéines des gènes cibles de P65 impliqués dans la survie et l’apoptose (tel que Bcl-XL) nous ne pouvons donc conclure si les effets de DEP-1 observés en réponse aux chimiothérapies est due à un mécanisme impliquant P65.

DEP-1 a tout d’abord été reconnue dans la littérature comme un suppresseur de tumeur potentiel, de par son rôle antiprolifératif. Or, nous avons démontré que malgré cette fonction de DEP-1, les cellules du cancer épithélial de l’ovaire l’expriment à des niveaux variables, et qu’elle est impliquée dans la promotion de l’invasion dans la plupart de ces lignées cellulaires. De plus, selon nos résultats obtenus dans la lignée TOV21G, DEP-1 ne semble pas avoir d’effet sur la prolifération cellulaire (Fig. 14F). Il se pourrait que des lignées mutées pour DEP-1 soient sélectionnées pour la progression du cancer épithélial de l’ovaire. Ainsi, une forme de DEP-1 qui n’aurait pas de fonction antiproliférative, mais qui conserverait ses fonctions pro-invasives, pourrait être présente dans ces cellules invasives du cancer épithélial

de l'ovaire. En effet, une mutation de DEP-1 a déjà été répertoriée dans le cancer du sein dans le domaine Kim de la protéine (Fig. 8), ce qui pourrait empêcher DEP-1 de recruter ERK pour médier ses fonctions antiprolifératives. Des travaux futurs seront nécessaires pour permettre le séquençage de DEP-1 dans les lignées du cancer épithélial de l'ovaire utilisées pour cette étude afin de tester cette possibilité.

Malgré que nous ayons observé des niveaux d'expression variables de DEP-1 dans les lignées cellulaires, nous ne pouvons conclure sur l'augmentation de l'expression, puisque nous n'avons pas testé des cellules primaires normales de l'épithélium ovarien. Toutefois, une étude a rapporté les niveaux d'expression en ARN de DEP-1 dans les tumeurs de différents types de cancer, par rapport au tissu sain correspondant. Ils ont observé une augmentation de l'expression de DEP-1 dans une série de tumeurs ovariennes de différents histotypes, grades et stades comparativement aux ovaires normaux (Smart *et al.* 2012). Ce résultat supporte donc ceux de notre étude faite sur un ensemble de lignées épithéliales de l'ovaire de différents histotypes, où nous montrons une association entre l'expression de DEP-1 et la promotion des capacités invasives de ces lignées, suggérant que DEP-1 pourrait avoir un rôle dans le développement de ce cancer.

Par immunohistochimie, nous avons effectué un marquage de DEP-1 sur des tumeurs épithéliales ovariennes de l'histotype séreux (Fig. 16A). Nous avons effectué plusieurs corrélations selon des groupes de patientes, puisque les différents grades de cancer de l'ovaire sont reconnus comme différentes formes du cancer épithélial de l'ovaire. Dans la catégorie qui incluait les tumeurs bénignes, de bas grade et de haut grade, ainsi que dans le groupe qui comportait les tumeurs de bas grade et de haut grade, nous avons pu faire une corrélation avec

l'expression positive de DEP-1 et les grades élevés du cancer épithélial de l'ovaire séreux (Tab. 1 et Tab. 2). DEP-1 est donc plus exprimée dans une forme plus agressive, et de plus mauvais pronostic, du cancer épithélial de l'ovaire. Nous avons également observés une corrélation avec la survie des patientes, où les patientes exprimant des niveaux élevés en DEP-1 avaient une survie de moindre durée comparativement aux patientes qui l'exprimait moins, pour les patientes ayant un cancer séreux de haut grade, de bas grade, et l'ensemble des patientes. Nous avons également confirmé ces résultats sur une étude de microarray, où les niveaux d'expression en ARN sont mesurés. Nous croyons donc que DEP-1 contribue à l'agressivité du cancer épithélial de l'ovaire, puisque son expression est associée à un plus bas taux de survie des patientes, et au cancer épithélial de haut grade. Comme la plupart de nos travaux in vitro se sont penchés sur l'étude d'une lignée dont l'histotype est à cellules claires (Tab. S1 : lignée TOV21G), nous avons aussi voulu effectuer le marquage sur un TMA (Fig. S1C) comportant des échantillons de tumeurs de cet histotype. Bien que nous ayons noté une certaine tendance de corrélation entre l'expression de DEP-1 et la survie des patientes, aucune corrélation statistiquement significative n'a pu être obtenue entre les différents critères de la maladie et l'expression en DEP-1, l'échantillon de tumeurs étant trop petit (Tab. S2). Par contre, le cancer épithélial de l'ovaire à cellules claires étant la forme la plus agressive du cancer épithélial de l'ovaire, et tous les échantillons présents sur le TMA étaient de type haut grade (Tab. S2), ce qui peut expliquer l'absence de corrélations avec les différents critères de la maladie (stade et grade).

Chez les patientes atteintes du cancer épithélial de l'ovaire de bas grade séreux, il y a eu corrélation avec la progression de la maladie, soit les patientes qui sont positives pour DEP-1 ont eu des rechutes plus rapidement que les patientes qui sont négatives pour DEP-1

(Fig. 16D). Par contre, le faible échantillonnage de patientes de bas grade ne peut confirmer ce résultat, mais indique tout de même une tendance. Un plus grand échantillonnage de patientes ayant un cancer épithélial de l'ovaire séreux de bas grade sera requis pour confirmer un potentiel rôle pronostic de DEP-1 dans le cancer épithélial de l'ovaire de bas grade.

De plus, ce qui était intéressant dans notre étude est que notre échantillonnage de patientes avec un cancer épithélial de l'ovaire séreux comportait 21 patientes avec des tumeurs bénignes. De ces 21 patientes, 100 % ont été considérées négatives pour DEP-1 (Tab. 1), ce qui consolide la corrélation entre DEP-1 et des cancers épithéliaux de l'ovaire de grade élevé.

Bref, notre étude démontre pour la première fois un rôle positif de DEP-1 dans des fonctions pro-invasives dans un modèle de cancer épithélial de l'ovaire *in vitro*, ainsi qu'une association avec l'expression de DEP-1 et les cancers épithéliaux de l'ovaire séreux de grade élevé *in situ*.

CHAPITRE 5
Perspectives

Perspectives

Nous avons présentement démontré que DEP-1 est associée avec des voies de signalisations pro-invasives *in vitro*, ainsi qu'avec le cancer épithélial de l'ovaire de haut grade *in situ*. Comme ces résultats nous suggèrent que DEP-1 est impliquée dans la progression tumorale, il resterait à le démontrer dans un modèle *in vivo*.

Pour cette étude, il faudra d'abord créer une lignée cellulaire, la TOV21G, déplétée en DEP-1 par l'usage de shARN, ce qui procurera une stabilité dans l'inhibition de DEP-1. Il faudra ensuite caractériser de nouveau la lignée déplétée en DEP-1 pour s'assurer qu'il n'y ait pas eu de sélection clonale lors de la transfection du shARN. C'est-à-dire qu'il faudra faire des essais d'invasion, et également suivre la signalisation du FBS, pour apprécier la diminution de la phosphorylation de Src en tyrosine 418, et de la Cortactine en tyrosine 421 dans les cellules déplétées en DEP-1, tel qu'il a été présenté dans ces travaux lors de transfection d'ARNi.

Lors de l'étude *in vivo*, des souris nues femelles seront injectées avec des cellules, transfectées avec des shARN contrôle et ciblant DEP-1, dans la cavité intra-péritonéale. Après quelques semaines, le sacrifice des souris permettra l'observation de l'implantation de cellules cancéreuses contrôles dans la cavité intrapéritonéale, processus qui est dépendant de la sécrétion de MMP. Selon nos résultats *in vitro*, nous nous attendons à voir une diminution de la capacité des cellules transfectées avec shDEP-1 à s'implanter.

De plus, compte tenu du rôle antiprolifératif de DEP-1 dans les cellules saines, et compte tenu du fait que nous n'avons pas observé de différence sur la prolifération cellulaire d'une lignée du cancer épithélial de l'ovaire suite à la déplétion de DEP-1, nous croyons que DEP-1 puisse être mutée dans les cellules cancéreuses. Le séquençage du gène de DEP-1 dans

les lignées du cancer épithélial de l'ovaire utilisées dans ces travaux pourra mettre en évidence le potentiel oncogénique de DEP-1.

La réalisation de ces travaux pourra nous permettrait de vérifier de manière indéniable le rôle positif de DEP-1 dans la tumorigénèse du cancer épithélial de l'ovaire. Ce qui pourra par la suite initier des études qui auront pour but d'inhiber l'activité de DEP-1. Nous croyons qu'inhiber DEP-1 en complément à la chimiothérapie chez les patientes qui en présentent l'expression au sein de leur tumeur pourrait empêcher le développement des métastases et potentiellement la résistance au carboplatin. Afin de confirmer le rôle de DEP-1 dans la chimiorésistance, il serait plutôt intéressant d'effectuer les tests sur des lignées cellulaires plus résistantes aux drogues utilisées en chimiothérapie, puisque les TOV21G étaient une lignée très sensibles à ces traitements.

CHAPITRE 6
Conclusion

DEP-1 a tout d'abord été identifiée comme un suppresseur de tumeur. Par contre, sa capacité à activer Src, qui a été démontrée dans les cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales, a fait de cette protéine un oncogène potentiel. Notre étude rapporte pour la première fois que DEP-1 est impliquée dans des voies de signalisations pro-invasives en permettant l'activation de Src dans un modèle de cancer épithélial de l'ovaire. De plus, nous avons démontré que DEP-1 semblait être impliquée dans des voies de signalisations permettant l'activation de P65 (NfκB). La diminution de la phosphorylation et des niveaux de P65 suite à une déplétion de DEP-1 par transfection d'ARNi corrèle avec une diminution de la résistance d'une lignée cellulaire au Carboplatin, mais pas au Paclitaxel. De plus, un marquage de DEP-1 sur des échantillons de tumeurs de patientes d'histotype séreux a démontré qu'il y avait une corrélation positive entre l'expression de DEP-1 avec le cancer épithélial de l'ovaire de grade élevé, la forme la plus maligne du cancer épithélial de l'ovaire. Sur la base de l'étude TMA avec une expression protéique de DEP-1 faible, intermédiaire et élevé, et de l'étude de l'expression en ARN de DEP-1 sur un microarray, on conclut qu'il y a une relation entre l'expression de DEP et la survie des patientes, ce qui suggère que DEP-1 est impliqué dans le développement de cancer épithélial de l'ovaire plus agressif.

Comme DEP-1 est impliquée dans la promotion de l'invasion des cellules du cancer épithélial de l'ovaire et que son expression est associée avec la maladie de grade élevé chez les patientes, nous croyons que lorsque DEP-1 est exprimée, qu'elle contribue au développement de fonctions agressives. DEP-1 semble être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du cancer épithélial de l'ovaire.

CHAPITRE 7
Références

1. Advisory Committee on Cancer Statistics. (2013). Canadian Cancer Statistics 2013. Toronto, ON: Canadian Cancer Society.
2. American cancer society (2013)
3. Ammer AG et al (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton*. 65(9):687-707
4. Ammer AG et al (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton*. 65(9):687-707.
5. Anglesio MS et al (2013) Type-Specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PlosOne*. 8(9):1-13.
6. Annunziata CM et al (2010). Nuclear factor kappaB transcription factors are coexpressed and convey a poor outcome in ovarian cancer. *Cancer*. 116(13):3276-84.
7. Arora D et al (2011). Protein tyrosine phosphatase DEP-1 controls receptor tyrosine kinase FLT3 signaling. *JBiol Chem*. 286(13):10918-10929.
8. Autschback F et al (1999). Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues. *Tissue Antigens*. 54(5):485-498.
9. Baker JE et al (2001). Protein Tyrosine Phosphatase CD148- Mediated Inhibition of T-Cell Receptor Signal Transduction Is Associated with Reduced LAT and Phospholipase C β 1 Phosphorylation, *Mol Cell Biol* 21:2393-2403
10. Balavenkatraman KK et al (2006). DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene*. 25(47):6319-24.
11. Banibrata S et al (2011). Regulation of Src family kinases in human cancers. *Journal of signal transduction*. 2011:1-14.
12. Bast RC Jr et al. (1998) CA125 : the past and the future. *Int J Biol Markers*. 13(4): 179-187.
13. Berek JS et al (2012). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gyneacol obstet*. 119(S2):S118-129.
14. Berset TA et al (2005). The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes Dev*. 19(11):1328-40.

15. Birbach A et al. (2002) Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem.* 277:10842-10851.
16. Biscardi JS et al (1998). Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells. *Mol Carcinogenesis.* 21:261-72.
17. Bond M et al. (2001) Inhibition of transcription factor NF-kB reduces matrix MMP-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research.* 50:556-565.
18. Borges LG et al (1996). Cloning and characterization of rat Density-Enhanced Phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ Res.* 79(3):570-580.
19. Bourkerche H et al. (2010) Src kinase activation is mandatory for MDA-9/syntenin-mediated activation of Nuclear Factor- κ B. *Oncogene.* 29(21): 3054-3066.
20. Boyer B et al (2002). Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells. *Oncogene.* 21(15):2347-56.
21. Cao L et al (2008). Tissue transglutaminase protects epithelial ovarian cancer cells from cisplatin-induced apoptosis by promoting cell survival signaling. *Carcinogenesis.* 29(10):1893-1900
22. Chabot C et al (2009). New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Mol Cell Biol.* 29(1):241-253.
23. Chen VW et al . (2003) Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer;* 97(10); pp2631-42.
24. Chin CN et al (2005). Transmembrane homodimerization of receptor-like protein tyrosine phosphatases. *FEBS letters.* 579(17):3855-385
25. Citri A et al (2007). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology.* 7(7):505-16.
26. Clark ES et al. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Research.* 67:4227-4235.
27. Cody NA et al (2007). Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene.* 26(4):618-632.
28. Cure H et al. (2000) First line chemotherapy for advanced ovarian cancer in 2000: standards and questions. *Bull Cancer.* 87(2) : 189-199.

29. Das SK et al (2012) MDA-9/syntenin: a positive gatekeeper of melanoma metastasis. *Front Biosci.* 17: 1-15.
30. De la Fuente-Garcia M et al (1998) CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes. *Blood.* 1998;91:2800-2809.
31. Denning MF et al (1996). Activation of the EGFR signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of PKC. *J of Biol Chemistry.* 271: 5325-5331.
32. Ding L et al (2010). Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature.* 464(7291):999-1005.
33. Dobrzycka B et al (2013). Serum levels of IL-6, IL-8 and CRP as prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur Cytokine Netw.* 24(3):103-113.
34. Erickson BK et al (2013). The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 209(5):409-414.
35. Faruk T et al (2014). Increases serum level of epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with poor progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 73 (3):631-637.
36. Florio T et al (2008). Somatostatin/somatostatin receptor signalling: Phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2):40-48.
37. Funakoshi-Tago M, et al. (2005) Functional role of c-Src in IL-1-induced NF-kappa B activation: c-Src is a component of the IKK complex. *J Biochem.* 137:189-197.
38. Gangemi R et al (2012). Mda-9/syntenin is expressed in uveal melanoma and correlates with metastatic progression. *Plosone.* 7(1): e29989.
39. Hanahan D et al (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 100:57-70.
40. Hiss D et al (2012). Optimizing Molecular-Targeted Therapies in Ovarian Cancer: The renewed Surge of Interest in Ovarian Cancer Biomarkers and Cell Signaling Pathways. *Journal of Oncology.* 2012:1-23.
41. Hoesel B, Schmid JA (2013) The complexity of NF-kB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 12 (86): 1-15.
42. Honda H et al (1994). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP etc. *Blood.* 84:4186-4194.

43. Horwitz SB (1994) Taxol (paclitaxel) : mechanisms of action. *Ann Oncology*. 5 Suppl6 :S3-6.
44. Huang C et al (1998). The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 273(40):25770-6.
45. Huang S et al (2000). Blockade of NF-kB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Research*. 60:5334-5339.
46. Iervolino A et al (2006), The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins, *Cancer Res* 66: 6280-6287.
47. Iuliano R et al (2001). Rat protein tyrosine phosphatase eta physically interacts with the PDZ domains of syntenin. *FEBS letters*. 500(1-2):41-44.
48. Iuliano R et al (2004). The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis. *Oncogene*. 23(52):8432-8438.
49. Kaku T et al (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*. 36(1):9-17.
50. Karst AM et al (2010). Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *J Oncol*. 2010: 1-13.
51. Kean MM et al (1996). The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res*. 56 (18):4236-4243.
52. Keane MM et al (1996). The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res*. 56(18):4236-43.
53. Kolavenko M et al (2000). Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem*. 275 (21):16219-16226.
54. Lafky JM et al (2008). Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1785(2):232-65
55. Laframboise S et al (2000). P53 mutations in epithelial ovarian cancers: possible role in predicting chemoresistance. *Cancer J*. 6(5):302-308.

56. Lampugnani MG et al (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, b-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol.* 161(4):793-804.
57. Lee MS et al. (2014). 2-Hydroxy-3,4-naphthochalcone (2H-NC) inhibits TNF α -induced tumor invasion through the downregulation of NF- κ B-mediated MMP-9 gene expression. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (1): 128-132.
58. Le Pera I et al . (2005). The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through 220 dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene.* 24(19):3187-95.
59. Lee HS, et al. (2007) Src tyrosine kinases mediate activations of NF- κ B and integrin signal during lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol.* 179:7001–7011
60. Lengyel E (2010). Ovarian Cancer Development and Metastasis. *The American Journal of Pathology.* 177(3):1053-1064.
61. Lengyel E et al (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 177(3):1053-64.
62. Lesueur F et al (2005). Allelic association of the human homologue of the mouse modifier Ptp rj with breast cancer. *Hum Mol Genet.* 14(16):2349-56.
63. Li LN et al (2013). Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(7):4107-4113.
64. Libermann TA et al (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 10(5):2327-2334.
65. Lin Y et al (2004). Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *The Journal of biological chemistry.* 279(28):29060-29065.
66. Liu AM, Wong YH. (2005) Activation of nuclear factor κ B by somatostatin type 2 receptor in pancreatic acinar AR42J cells involves G α 14 and multiple signaling components: a mechanism requiring protein kinase C, calmodulin-dependent kinase II, ERK, and c-Src. *J Biol Chem.* 280:34617–34625.

67. Mita Y et al (2010). Missense polymorphisms of PTPRJ and PTPN13 genes affect susceptibility to a 229 variety of human cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136(2):249-259.
68. Moen CJ et al (1996). Fine mapping of colon tumor susceptibility (Scc) genes in the mouse, different from the genes known to be somatically mutated in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93(3):1082-6
69. Naora H et al (2005). Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer.* 5(5):531-537.
70. Nishi H et al (2003) Analysis of the EGFR promoter: the effect of NF-kB. *Int J Mol Med.* 11(1):49-55.
71. Ostmann A *et al* (1994). Expression of DEP-1, a receptor-like proteintyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *PNAS.* 91(21):9680-9684.
72. Ouellet V et al (2008). Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 8:152.
73. Palka HL et al (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase Met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem.* 278(8):5728-35.
74. Parsons JT et al (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene.* 19(49):5606-13.
75. Petermann A et al (2011). Loss of the protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ drives meningioma cell motility. *Brain Pathol.* 21(4):405-18.
76. Petermann A et al (2011). Loss of the protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ drives meningioma cell motility. *Brain Pathol.* 21(4):405-18.
77. Ruivenkamp C et al (2003). LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12-21. *Oncogene.* 22(22):3472-4.
78. Ruivenkamp CA et al (2002). *PtpRJ* is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Scc1* and is frequently deleted in human cancers. *Nature genetics.* 31(3):295-300.

79. Ruivenkamp CA et al (2002). Ptpnj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Sec1* and is frequently deleted in human cancers. *Nat Genet.*31(3):295-300.
80. Rustin GJ et al (1996). Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA-125: a north thames ovary group study. *Annals of oncology.* 7(4): 361-364.
81. Sacco F et al (2009). Tumor suppressor density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) inhibits the RAS pathway by direct dephosphorylation of ERK1/2 kinases. *The Journal of biological chemistry.* 284(33):22048-58.
82. Sacco F et al (2009). Tumor suppressor density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) inhibits the RAS pathway by direct dephosphorylation of ERK1/2 kinases. *The Journal of biological chemistry.* 84(33):22048-58
83. Schmalfeldt B et al (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 7(8):2396-404.
84. Silverberg SG et al (2000). Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol.* 19(1):7-15.
85. Smart CE et al (2012) Expression and function of the protein tyrosine phosphatase receptor J (PTPRJ) in normal mammary epithelial cells and breast tumors. *PlosOne.* 7(7):e40742.
86. Spring K et al (2012) Tyrosine phosphorylation of DEP-1/Cd148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation. *Blood.* 120(13):2745-2756.
87. Storz P, Toker A (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J.* 2003(22): 109–120.
88. Summy JM et al (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 22(4):337-58.
89. Takahashi K et al (2012) Thrombospondin-1 acts as a ligand for CD148 tyrosine phosphatase. *PNAS.* 109(6):1985-1990.
90. Takahashi T et al (2003). A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Molecular and cellular biology.* 23(5):1817-31.

91. Tan DSP et al ((2007). Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. *J Clin Pathol.* 60(4):355-360.
92. Tarcic G, Boguslavsky SK, Wakim J, Kiuchi T, Liu A, Reinitz F, et al . An Unbiased Screen Identifies DEP-1 Tumor Suppressor as a Phosphatase Controlling EGFR Endocytosis. *Current Biology.* 19(21):1788-98.
93. TCGA. Cancer Genome Atlas Research Network (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 474(7353):609-615.
94. Tolsma SS et al (1997). Lumen formation and other angiogenic activities of cultured capillary endothelial cells are inhibited by thrombospondin-1. *Microvascular research.* 54(1):13-26.
95. Tonks NK et al (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS letters.* 546(1):140-148.
96. Tonks NK et al (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews.* 7:833-46.
97. Trapasso F et al (2000). Rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27Kip1. *Mol Cell Biol.* 20(24):9236-46.
98. Tsuboi N et al (2008). The tyrosine phosphatase CD148 interacts with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal.* 413(1):193-200.
99. Vandooren J et al. (2013). Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods.* 10 (3): 211-220.
100. Wang L et al (2013). Clinicopathologic significance of claudin-6, occludin, and matrix metalloproteinases -2 expression in ovarian carcinoma. *Diagnostic pathology.* 8(1):190
101. Wang Z et al (2013). Inhibition of proliferation and invasiveness of ovarian cancer C13* cells by a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor and the role of nuclear factor- κ B. *J Int Med Res.* 41(5):1577-1585.
102. Welsh PL and King MC (2001) BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genetics.* 10(7): 705-713.

103. Whiford JR et al (2011). Syndecan-2 is a novel ligand for the protein tyrosine phosphatase receptor CD148. *Molecular biology of the cell*. 22(19):3609-3624.
104. Whiteford JR et al (2011) Syndecan 2 is a novel ligand for the PTPR CD148. *MBC*. 22(19):3609-3624.
105. Wong D et al. (2011) Extensive characterization of NF- κ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol*. 12(7): R70.
106. Yang G et al (2011). The biphasic role of NF-kappaB in progression and chemoresistance of ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 17(8):2181-2194
107. Yang G et al (2011). The biphasic role of NF-kappaB in progression and chemoresistance of ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 17(8):2181-2194.
108. Zhang L et al (1997). Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Exp Cell Res*. 235(1):62-70.
109. Zimmermann P et al (2001). Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol Biol Cell*. 12(2):339-350.
110. Zimmermann P et al (2005) Syndecan recycling is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Dev Cell*. 9(3): 377-388.

ANNEXES

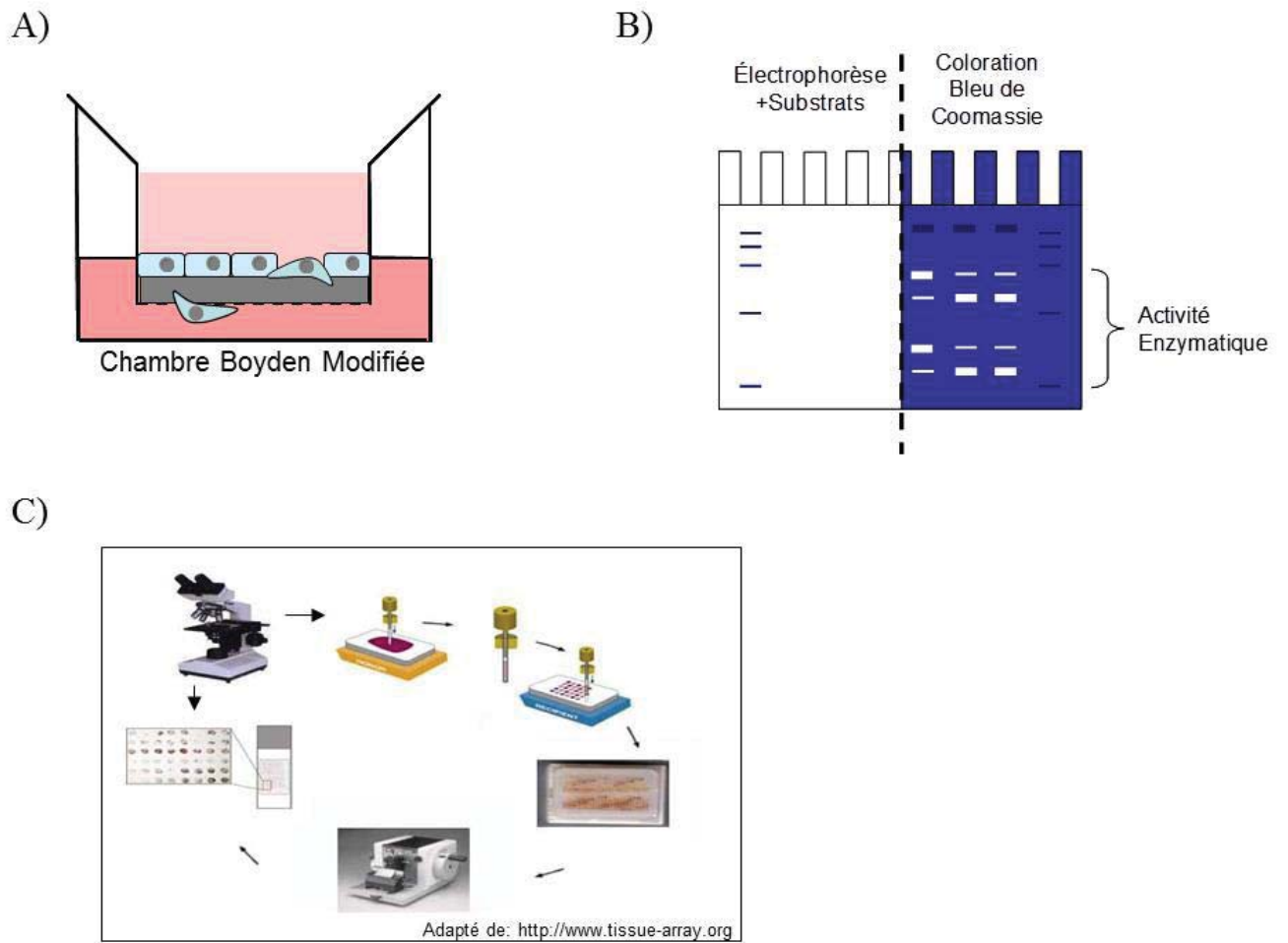


Figure S1. Schématisation des différentes techniques utilisées lors de ces travaux. A) schématisation d'un essai d'invasion dans une chambre de Boyden modifiée; B) schématisation de la zymographie sur gélatine; C) schématisation de la construction d'un TMA (tumor microarray).

Tableau S1. Descriptions des lignées cellulaires du CÉO. (ATCC, Ouellet 2008, Cody 2007, Anglesio 2013)

| | Histotype | Dérivé | Grade | stade | In vivo | | Invasion | TP53 | Laboratoire d'origine |
|----------|-------------------|---------------|-------|-------|---------|-----|----------|------|--|
| | | | | | S-C | I-P | | | |
| TOV21G | cellules claires | tumeur solide | Haut | III | oui | oui | | WT | Dr. Anne-Marie Mes-Masson |
| TOV2223G | séreux-papillaire | tumeur solide | | IIIC | non | non | ++ | Mut | Dr. Anne-Marie Mes-Masson |
| SKOV3 | cellules claires | ascite | | III | oui | oui | | Mut | Memorial Sloan Kettering Cancer Center |
| TOV1946 | séreux-papillaire | tumeur solide | | IIIC | non | oui | +++ | Mut | Dr. Anne-Marie Mes-Masson |
| OV90 | endométriode | ascite | | IIIC | oui | oui | | Mut | Dr. Anne-Marie Mes-Masson |
| TOV112D | séreux-papillaire | tumeur solide | | IIIC | oui | oui | + | Mut | Dr. Anne-Marie Mes-Masson |

Tableau S2. Corrélation de Pearson selon les données cliniques du TMA des patientes ayant un CÉO d'histotype à cellules claires.

| Critères | n | Expression DEP-1 | | R | p |
|--------------------|----|------------------|----------|---------|-------|
| | | Négative | Positive | Pearson | |
| Toutes patientes | 35 | 28 | 7 | | |
| Grade | | | | NA | NA |
| Bas | 0 | 0 | 0 | | |
| Haut | 35 | 28 | 7 | | |
| Stade | | | | 0.015 | 0.931 |
| I | 18 | 14 | 4 | | |
| II | 6 | 6 | 0 | | |
| III | 12 | 7 | 3 | | |
| IV | 1 | 1 | 0 | | |
| Maladie Résiduelle | | | | 0.080 | 0.746 |
| NA | 16 | 15 | 1 | | |
| Non | 11 | 9 | 2 | | |
| <1cm | 5 | 1 | 4 | | |
| >2cm | 3 | 3 | 0 | | |

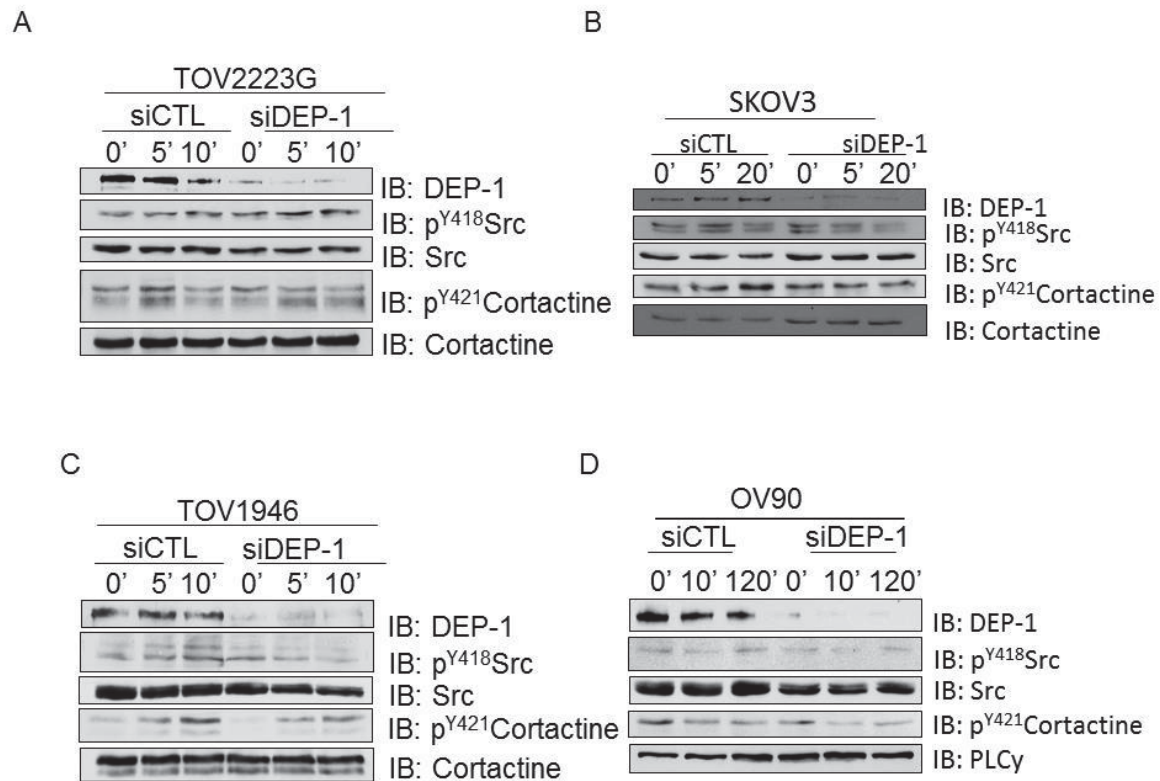


Figure S2. DEP-1 est nécessaire pour les voies de signalisation invasives dans la plupart des lignées du CÉO. Les cellules ont été sevrées 16 h, suivi d'une stimulation avec 5 % FBS pour le temps indiqué, puis ont été lysées pour extraire les protéines. L'analyse quantitative de l'expression de DEP-1, p^{Y418}Src, Src p^{Y421}Cortactine et Cortactine, ou PLCγ a été faite par immunobuvardage, en utilisant des anticorps spécifiques. Les lysats proviennent des lignées A) TOV2223G, B) SKOV3, C) TOV1946, D) OV90.

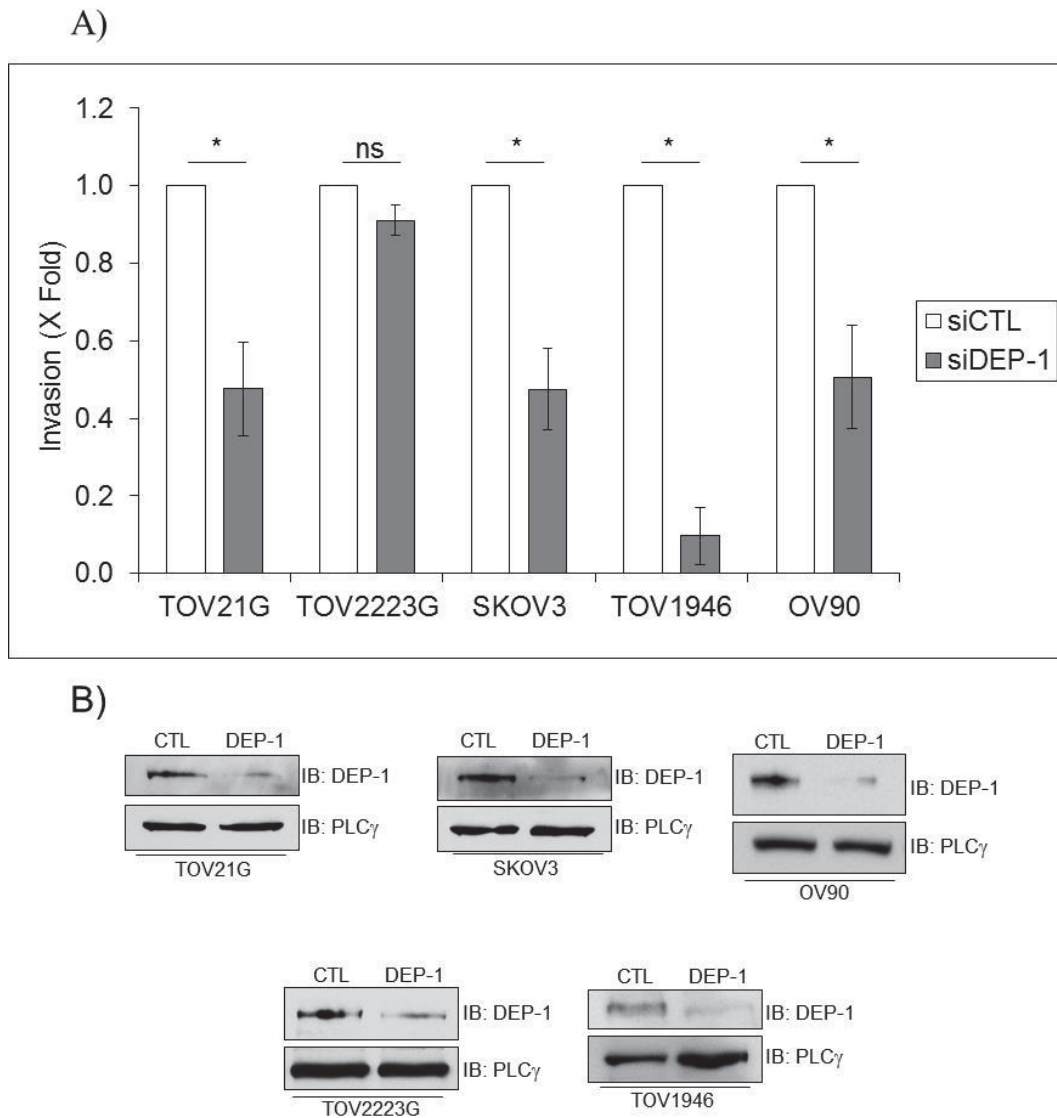
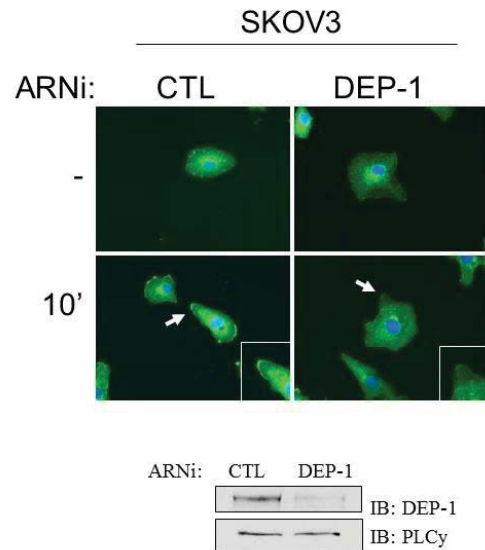


Figure S3. DEP-1 est nécessaire pour l'invasion cellulaire dans la plupart des lignées du CÉO. A) Essai d'invasion des cellules transfectées avec des ARNi. Le ratio d'invasion(?) est calculé relativement au niveau d'invasion de la même lignée transfectée avec des ARNi CTL; B) Immunobuvardage de DEP-1 et de PLC γ . * $p < 0.05$ selon *t* test.

A)



B)

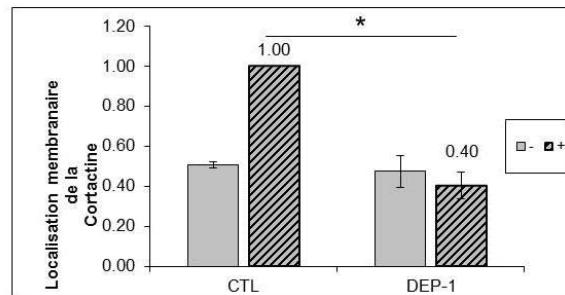
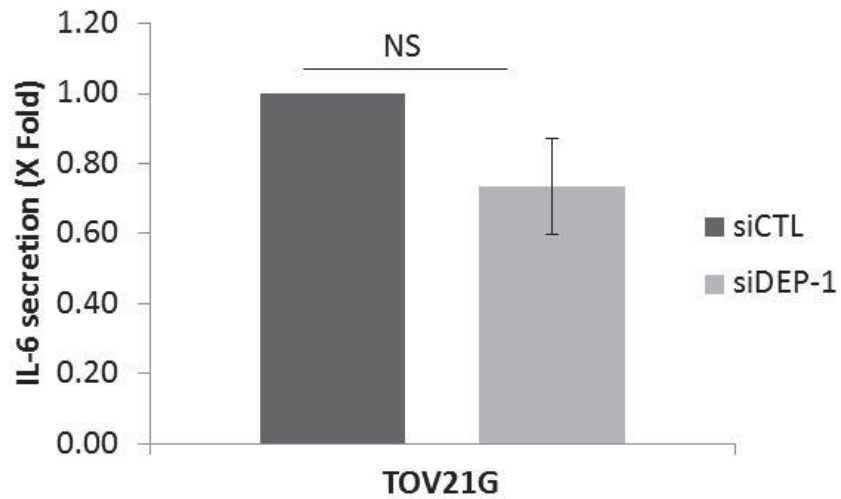


Figure S4. La déplétion en DEP-1 par ARNi perturbe la localisation membranaire de la Cortactine dans la lignée SKOV3. A) Haut : Immunofluorescence de la Cortactine, effectuée sur des cellules ayant été sevrées puis stimulées avec 5 % FBS pour le temps indiqué. Les flèches blanches pointent un lamellipode. L'encadré représente un agrandissement du lamellipode. **Bas :** analyse de l'inhibition de DEP-1 par immunobuvardage. **B)** Représentation quantitative de l'enrichissement membranaire de la Cortactine (moyenne de trois expériences); * $p < 0.05$

A)



B)

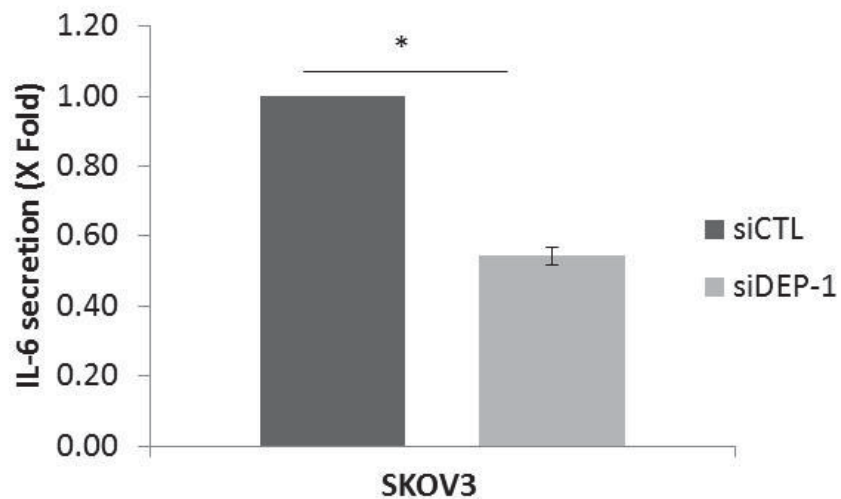


Figure S5. La déplétion en DEP-1 par ARNi diminue la sécrétion d'IL6 en réponse à l'EGF. Les cellules ont été sevrées 16h, puis stimulées 24h avec de l'EGF à une concentration de 20ng/mL. Le milieu extracellulaire a été recueilli pour mesurer la concentration en IL6 sécrété par la lignée TOV21G (A), et la lignée SKOV3 (B), par ELISA. *NS* : *non significatif*.

* : $p < 0.05$

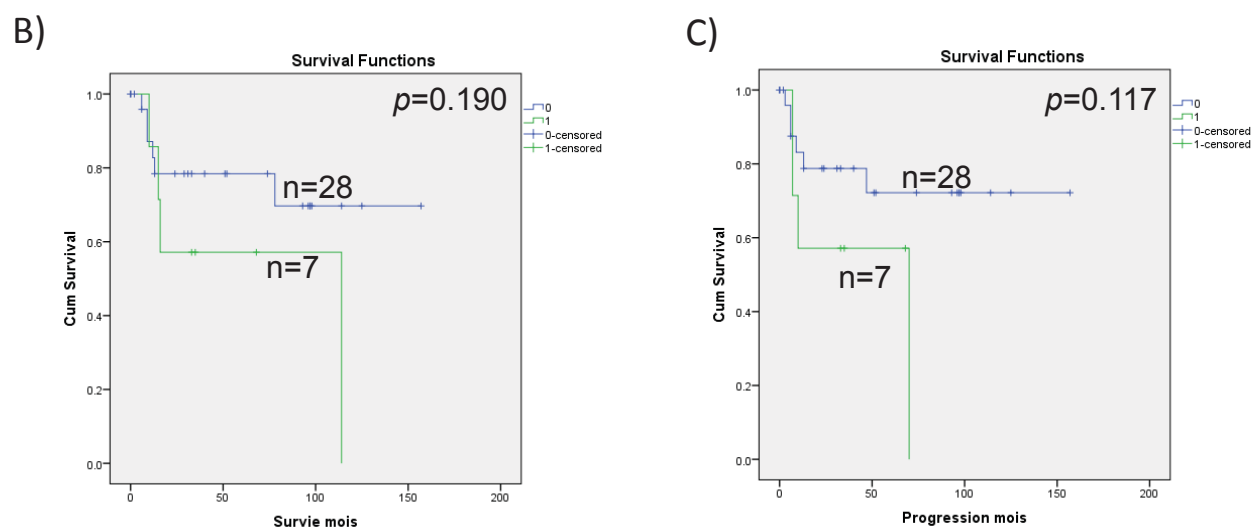
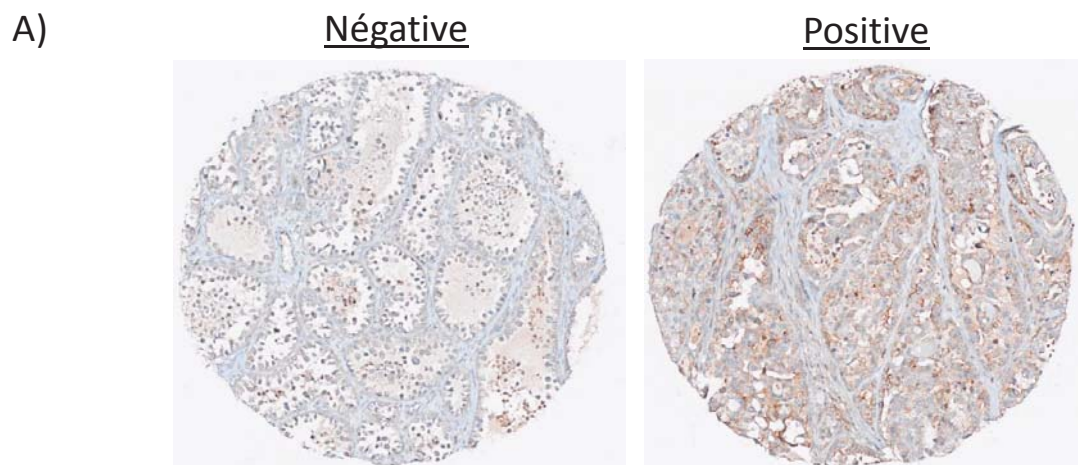


Figure S6. Immunohistochimie de DEP-1 sur les tumeurs épithéliales ovariennes d’histotype à cellules claires. A) exemples de marquage positif et négatif. Courbes de survie (B) et de progression (C) de Kaplan-Meier.