

Université de Montréal

**Caractérisation de la SERPINA1,
une antiprotéase différentiellement exprimée
dans le cancer épithélial de l'ovaire**

par

Karine Normandin

Programme de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Décembre, 2008

© Karine Normandin, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation de la SERPINA1,
une antiprotéase différentiellement exprimée
dans le cancer épithélial de l'ovaire**

présenté par :

Karine Normandin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Réjean Lapointe
Président-rapporteur

Dre Anne-Marie Mes-Masson
Directrice de recherche

Dre Diane Provencher
Co-directrice de recherche

Dr Jean-François Côté
Membre du jury

RÉSUMÉ

Le cancer épithélial de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus létal. La survie à 5 ans est de 30-40% chez les patientes atteintes d’une tumeur invasive (TOV), comparativement à 95% chez les patientes diagnostiquées pour une tumeur à faible potentiel de malignité ou borderline (LMP). Au laboratoire, l’analyse de l’expression des gènes de la micropuce à ADN U133 d’Affymetrix a révélé que la SERPINA1 est un gène dont l’expression varie entre les tumeurs LMP et TOV. La validation par Q-PCR nous a confirmé que cette antiprotéase est majoritairement surexprimée dans les tumeurs LMP, par rapport aux tumeurs bénignes (BOV) et aux tumeurs TOV. Nous avons donc surexprimé la SERPINA1 dans les lignées cellulaires invasives TOV 112D et TOV 1946 du cancer de l’ovaire et dérivé des clones stables. Les résultats obtenus nous indiquent que la surexpression de la SERPINA1 a un effet sur la capacité d’invasion et de migration cellulaire et non au niveau de la croissance cellulaire et la formation de structures tridimensionnelles. Les résultats issus de l’étude *in vivo* dans les souris SCID nous permettront de déterminer si la surexpression de la SERPINA1 a un effet sur la tumorigénèse ovarienne. Ainsi, la SERPINA1 demeure à notre avis un candidat d’intérêt pour tenter de mieux comprendre les différences biologiques entre les tumeurs LMP et TOV, ainsi que le rôle des protéases et de leurs inhibiteurs dans la progression tumorale du cancer de l’ovaire.

Mots-clés

cancer épithélial de l’ovaire

expression différentielle

tumeur à faible potentiel de malignité (borderline)

tumeur invasive

SERPINA1

inhibiteur de protéase

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer with a five-year survival rate of 30-40% in patients diagnosed with high-grade invasive disease (TOV). This is in stark contrast to the 95% five-year survival in patients diagnosed with low malignant potential (LMP) disease. It is therefore important to understand the biological differences between LMP and TOV. We have previously identified differential expression of SERPINA1 between serous LMP and TOV tumors through gene expression analysis using Affymetrix U133 DNA microarrays. Expression of this protease inhibitor in the majority of LMP tumors was confirmed and validated by Q-PCR. To study the effects of its overexpression on the invasive potential of ovarian cancer cell lines, SERPINA1 was cloned in the pcDNA3.1+ plasmid and stable clones were derived from two invasive ovarian cancer cell lines, TOV 112D and TOV 1946. Comparisons between clones and controls have shown no SERPINA1-dependent difference in cellular growth or spheroid formation. However, effects on cellular migration and invasion are observed in cells overexpressing SERPINA1. Results from an *in vivo* xenograft study in SCID mice will allow us to determine if SERPINA1 overexpression affects ovarian tumorigenesis. SERPINA1 remains an interesting candidate gene whose further characterization may lead to insights into its role, and the role of proteases and their inhibitors, in ovarian cancer disease progression.

Keywords

epithelial ovarian cancer

differential expression

low malignant potential (borderline) tumor

invasive tumor

SERPINA1

protease inhibitor

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
<u>I L'ovaire normal.....</u>	<u>2</u>
1.1 Embryologie de l'ovaire.....	2
1.2 Anatomie de l'ovaire.....	3
1.3 Histologie de l'ovaire.....	4
1.4 Les fonctions de l'ovaire.....	6
<u>II Le cancer de l'ovaire.....</u>	<u>8</u>
1.5 L'épidémiologie du cancer de l'ovaire.....	9
1.6 L'étiologie et les facteurs de risques du cancer de l'ovaire.....	10
1.6.1 L'âge.....	10
1.6.2 L'alimentation.....	10
1.6.3 Les habitudes de vie.....	10
1.6.4 Les facteurs environnementaux et l'hypothèse de l'inflammation.....	11
1.6.5 L'hypothèse de l'ovulation.....	11
1.6.6 L'hypothèse des gonadotrophines.....	12
1.6.7 Les facteurs génétiques.....	12
1.7 Les types de tumeurs de l'ovaire.....	13
1.7.1 Tumeurs d'origine stromale ou des cordons sexuels.....	13
1.7.2 Tumeurs d'origine germinale.....	14
1.7.3 Tumeurs d'origine épithéliale.....	14
1.8 Classifications des tumeurs de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'obstétrique (FIGO)	15
1.8.1 Les classes tumorales.....	15

1.8.1.1	Les tumeurs bénignes (BOV).....	15
1.8.1.2	Les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP).....	16
1.8.1.3	Les tumeurs invasives (TOV).....	17
1.8.2	Les types histopathologiques.....	18
1.8.2.1	Séreux.....	18
1.8.2.2	Mucineux.....	19
1.8.2.3	Endométrioïdes.....	20
1.8.2.4	Cellules claires.....	20
1.8.2.5	Les autres histopathologies.....	21
1.8.3	Les grades (G0-G3).....	21
1.8.4	Les stades (I-IV).....	22
1.9	L'origine du cancer épithélial de l'ovaire.....	25
1.9.1	L'hypothèse de l'origine épithéliale.....	25
1.9.2	L'hypothèse d'un continuum entre les tumeurs BOV, LMP et TOV.....	26
1.9.3	L'hypothèse de l'origine des trompes de Fallope.....	27
1.10	Au niveau clinique.....	27
1.10.1	Le dépistage.....	27
1.10.2	Les symptômes.....	28
1.10.3	Les signes.....	28
1.10.4	Le diagnostic.....	29
1.10.5	Les traitements : la chirurgie et la chimiothérapie.....	30
1.10.6	Le suivi des patientes et la progression de la maladie.....	32
1.10.7	Les facteurs pronostiques.....	33
1.11	Les modèles d'étude.....	33
	<u>III La superfamille des serpins</u>	37
1.12	La structure des serpins.....	38
1.13	Le mécanisme d'inhibition des protéases.....	38
1.14	La SERPINA1.....	39
1.14.1	La structure de la SERPINA1.....	40
1.14.2	Les cellules sécrétrices.....	40
1.14.3	Les cibles de la SERPINA1.....	41

1.14.3.1	La trypsine.....	41
1.14.3.2	La neutrophile élastase.....	42
1.14.4	Les problèmes associés à une déficience en SERPINA1.....	42
1.14.4.1	L'emphysème chronique.....	43
1.14.4.2	La cirrhose du foie.....	44
IV	<u>Les objectifs de mon projet de maîtrise</u>	44
Chapitre 2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
2.1	Échantillons et lignées cellulaires.....	46
2.2	Techniques de biologie moléculaire.....	47
2.2.1	Extraction d'ARN.....	47
2.2.2	PCR quantitatif en temps réel (Q-PCR).....	48
2.2.3	Clonage de la SERPINA1.....	49
2.2.3.1	Insertion de la SERPINA1 dans le pcDNA3.1+.....	50
2.2.3.2	Sélection des bactéries ayant incorporé le pcDNA3.1-SERPINA1.....	50
2.2.4	Transfections.....	51
2.2.5	Génération et sélection de clones stables.....	52
2.3	Techniques de validation des clones générés.....	53
2.3.1	Extraction de protéines.....	53
2.3.2	Buvarbage de type Western.....	53
2.3.3	ELISA.....	54
2.4	Essais fonctionnels <i>in vitro</i>	55
2.4.1	Courbes de croissance.....	55
2.4.2	Essais d'invasion avec Matrigel.....	55
2.4.3	Essais de migration : Recouvrement suite à une blessure.....	56
2.4.4	Méthode de quantification des stries.....	57
2.4.5	Formation des sphéroïdes.....	58
2.5	Essais fonctionnels <i>in vivo</i>	58
2.5.1	Immunohistochimie.....	58
2.5.2	Immunocytochimie.....	60
2.5.3	Formation de tumeurs dans les souris SCID.....	60

Chapitre 3 RÉSULTATS	62
3.1 Expression de la SERPINA1 dans les échantillons de patientes	63
3.2 Expression et sécrétion des différents clones surexprimant la SERPINA1.....	66
3.3 Effets <i>in vitro</i> de la surexpression de la SERPINA1 dans les lignées invasives du cancer de l’ovaire.....	69
3.3.1 Niveaux de croissance des différents clones surexprimant la SERPINA1.....	69
3.3.2 Capacité des différents clones à envahir une matrice synthétique de Matrigel....	69
3.3.3 Capacité de migration des différents clones surexprimant la SERPINA1.....	72
3.3.4 Capacité des différents clones à former des structures tridimensionnelles.....	75
3.4 Essais fonctionnels <i>in vivo</i> sur les tissus ovariens et les souris SCID.....	78
3.4.1 Test de spécificité de l’anticorps.....	78
3.4.2 Expression de la SERPINA1 sur le microétagage de tissus ovariens.....	78
3.4.3 Relation entre l’expression de la SERPINA1 et quelques paramètres cliniques.....	80
3.4.4 Capacité des différents clones à former des tumeurs dans les souris SCID.....	83
 Chapitre 4 DISCUSSION	 85
4.1 Comparaison entre la quantité d’ARNm du gène SERPINA1 obtenue avec le modèle des tissus et celui des cultures primaires.....	86
4.2 Taux de SERPINA1 dans le plasma sanguin des patientes.....	87
4.3 Sécrétion différentielle de la SERPINA1 dans nos différents clones.....	88
4.4 Croissance cellulaire de nos clones surexprimant la SERPINA1.....	89
4.5 Capacité d’invasion de nos différents clones.....	90
4.6 Capacité de migration de nos clones surexprimant la SERPINA1.....	93
4.7 Habilité de nos différents clones à former des structures tridimensionnelles.....	93
4.8 Relation entre l’expression de la SERPINA1 au niveau des échantillons présents sur le microétagage de tissus, et les différents paramètres cliniques de la maladie.....	94
4.9 Capacité de nos différents clones à former des tumeurs dans les souris SCID.....	98
 CONCLUSION	 99
PERSPECTIVES.....	100
 Chapitre 5 BIBLIOGRAPHIE	 xviii
 Chapitre 6 ANNEXE	 xxiv

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I	Stadification du cancer épithélial de l’ovaire.....	24
-----------	---	----

Chapitre 2

Tableau II	Liste des différents échantillons provenant de patientes saines ou présentant une tumeur BOV, LMP ou TOV, utilisés pour réaliser les expériences d’ELISA et de PCR en temps réel.....	46
------------	---	----

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1	Anatomie du système reproducteur de la femme.....	4
Figure 2	Coupe histologique d'un ovaire normal humain.....	5
Figure 3	Stades ovulaires et folliculaires.....	6
Figure 4	Cycle ovarien selon le système hypothalamo-hypophysaire.....	7
Figure 5	Survie relative à 5 ans (%) des cancers les plus fréquents, les deux sexes combinés.....	9
Figure 6	Origines des trois principaux types de tumeurs ovariennes.....	13
Figure 7	Coupes histologiques des trois classes tumorales.....	15
Figure 8	Coupes histologiques des quatre principaux types histopathologiques du cancer épithélial de l'ovaire.....	18
Figure 9	Coupes histologiques de tumeurs séreuses de grade 0 à 3.....	21
Figure 10	Patron de dissémination du cancer épithélial de l'ovaire.....	23
Figure 11	Résultats préliminaires de la micropuce à ADN U133.....	36
Figure 12	Structure native d'un des membres de la famille des serpins, la SERPINA1.....	38
Figure 13	Mécanisme d'inhibition des serpins.....	39
Figure 14	Représentation schématique de la SERPINA1.....	40

Chapitre 2

Figure 15	Clonage de la SERPINA1.....	49
Figure 16	Description des étapes pour l'essai d'invasion avec Matrigel.....	56
Figure 17	Strie effectuée sur une monocouche de cellules à confluence.....	57
Figure 18	Méthode de quantification utilisant le logiciel Image-Pro Plus.....	57
Figure 19	Méthode des gouttelettes inversées utilisée pour la formation des sphéroïdes.....	58

Figure 20	Création d'un microétalage de tissus.....	59
-----------	---	----

Chapitre 3

Figure 21	Mesure de la quantité d'ARNm du gène SERPINA1 dans les échantillons de tissus et de cultures primaires du cancer épithélial de l'ovaire.....	64
Figure 22	Taux de SERPINA1 dans le plasma.....	65
Figure 23	Caractérisation de l'expression et de la sécrétion de la SERPINA1 dans les clones stables générés.....	67
Figure 24	Taux de croissance des différents clones surexprimant la SERPINA1.....	68
Figure 25	Mesure de la capacité des différents clones à envahir une matrice synthétique de Matrigel.....	70
Figure 26	Capacité de migration des différents clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 112D.....	73
Figure 27	Capacité de migration des différents clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 1946.....	74
Figure 28	Formation de structures tridimensionnelles par les clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 112D.....	76
Figure 29	Formation de structures tridimensionnelles par les clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 1946.....	77
Figure 30	Expression <i>in situ</i> de la SERPINA1 dans les tissus ovariens.....	79
Figure 31	Relation entre l'expression de la SERPINA1 et les différents paramètres cliniques de la maladie.....	82
Figure 32	Capacité des clones dérivés de la lignée TOV 112D à former des tumeurs dans les souris SCID.....	84

Chapitre 6

Figure 33	Capacité des différents clones à envahir une matrice de Matrigel compacte et poreuse	xxv
-----------	--	-----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AAT	alpha 1-antitrypsine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	oncogène viral v-akt du thymome murin (v-akt murine thymoma viral oncogene)
AMH	hormone anti-müllérienne (anti-mullerian hormone)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BOV	tumeur ovarienne bénigne (benign ovarian tumor)
BRAF	homologue B1 de l'oncogène viral v-raf du sarcome murin (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
BRCA1	gène du cancer du sein 1 (breast cancer 1 gene)
BRCA2	gène du cancer du sein 2 (breast cancer 2 gene)
CA125	antigène de cancer 125 (cancer antigen 125)
CIPA	comité institutionnel sur la protection des animaux
CT	tomodensitométrie (computed tomography)
DAB	diaminobenzidine
DFS	survie sans maladie (disease-free survival)
DH5 α	souche DH5 α d' <i>Escherichia coli</i>
EBC-1	cellules du carcinome squameux du poumon humain (human lung squamous cell carcinoma)
ECL	détection améliorée de la chimiluminescence (enhanced chemiluminescence)
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique (ethylene diaminetetraacetate)
ELISA	dosage d'immunosorption liée à enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMT	transition épithéliale-mésenchymateuse (epithelial-mesenchymal transition)
ERK	kinase régulée par les signaux extracellulaires (extracellular signal-regulated kinase)
ERK1	kinase régulée par les signaux extracellulaires 1 (extracellular signal-regulated kinase 1)
FBS	sérum de veau foetal (fetal bovine serum)

FIGO	fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FSH	hormone folliculo-stimulante (follicule-stimulating hormone)
G	grade tumoral
HER2	homologue 2 de l'oncogène viral v-erb-b2 de la leucémie érythroblastique (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)
HNPCC	cancer colorectal héréditaire sans polypose (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
HRP	peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)
HUVEC	cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (human umbilical vein endothelial cells)
KRAS	homologue de l'oncogène viral v-ki-ras2 du sarcome de rat kirsten (v-ki-ras2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
LB	milieu de culture bactérien (luria broth)
LH	hormone lutéinisante (luteinizing hormone)
LHRH	gonadolibérine (luteinizing hormone-releasing hormone)
LMP	tumeur à faible potentiel de malignité (low malignant potential tumor; borderline tumor)
MAPK	protéine kinase activée par des agents mitogènes (mitogen-activated protein kinase)
MLH1	homologue MutL 1 (MutL homolog 1)
MMP	métalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinase)
MPSC	carcinome micropapillaire séreux (micropapillary serous carcinoma)
MSH2	homologue MutS 2 (MutS homolog 2)
OCT	température optimale de coupe (optimal cutting temperature)
OSE	épithélium de surface ovarien (ovarian surface epithelium)
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PCR	réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PET	tomographie à émission de positons (positron emission tomography)
PET	polyéthylène téréphtalate (polyethylene terephthalate)
PI	inhibiteur de protéases (protease inhibitor)
PMS1	gène augmenté lors de la ségrégation postméiotique 1 (postmeiotic segregation increased 1)
PMS2	gène augmenté lors de la ségrégation postméiotique 2 (postmeiotic segregation increased 2)
PVDF	polyfluorure de vinylidène (polyvinylidene fluoride)

Q-PCR	réaction en chaîne par polymérase quantitative (quantitative polymerase chain reaction)
RCL	boucle catalytique (reactive center loop)
RIN	résultat de l'intégrité de l'ARN (RNA integrity number)
ROC	caractéristiques d'efficacité (Receiver Operating Characteristic)
RT-PCR	réaction en chaîne par polymérase-transcription inverse (reverse transcription polymerase chain reaction)
SAM	méthode d'analyse des micropuces (significant analysis of microarrays)
SCID	immunodéficiences sévères (severe combined immunodeficiency)
SERPINA1	inhibiteur de sérines protéases, classe A, membre 1 (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1)
SPSS	logiciel d'analyse statistique pour les sciences sociales (statistical package for the social sciences)
SRY	gène de détermination du sexe de la région Y (sex determining region of the chromosome Y)
TAE	tris-acétate-EDTA
TMB	tétraméthylbenzidine
TOV	tumeur ovarienne invasive (invasive ovarian tumor)
WT	type sauvage (wild-type)

*-À mes parents, pour leur important support,
pour leurs innombrables encouragements, et
pour leur amour.*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je dois remercier profondément ma directrice de recherche Dre Anne-Marie Mes Masson, ainsi que ma co-directrice Dre Diane Provencher. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise enrichissant, mais aussi pour votre accueil, votre support et votre confiance. Toutes les deux, vous êtes de beaux modèles à suivre dans le domaine de la recherche.

Merci également à tous les membres du groupe prostate, actuels ou anciens, soit Dr Benjamin Péant, Dr Laurent Lessard, Dr Jean-Simon Diallo, Dr Hervé Koumakpayi, Philippe Gannon, Blandine Betton, Ingrid Labouba, Nathalie Delvoye, Chantale Auger, Aurore Pierrard. Bien sûr, je ne peux pas oublier de remercier mes collègues du groupe ovaire présents ou partis, soit Dre Véronique Ouellet, Dre Cécile Le Page, Magda Zietarska, Véronique Barrès, Julie Desgagnés, Julie Lafontaine, Jason Madore, Dre Isabelle Létourneau, Dre Valérie Forest, Dr Patrick Bondza, Manon de Ladurantaye, Marie-Line Puiffe, Lise Portelance, Liliane Meunier, Jennifer Kendall-Dupont, Nicolas Luc, Josh Levin, Yuan Chang, Matthew Starek, et Ali Filali. Merci pour vos précieux conseils, pour votre collaboration et votre entraide qui ont fait grandement avancer mon projet de maîtrise. Ce fut un plaisir immense de travailler avec chacun d'entre vous.

Un gros merci à Manon de Ladurantaye pour son aide précieuse lors des études *in vivo* avec les souris, de même qu'au personnel de l'animalerie, principalement Kim Leclerc Desaulniers. Merci aussi à Jason Madore pour son don de quelques photos de coupes histologiques. Merci à Cécile Le Page pour son aide très appréciée avec les analyses statistiques du microétalage de tissus. Je remercie également Louise Champoux, pour sa générosité et pour toute l'attention qu'elle porte au bien-être des membres du laboratoire.

Merci à vous les filles, Julie Desgagnés et Véronique Barrès, deux autres étudiantes à la maîtrise, avec qui j'ai eu tant de plaisir et de beaux moments, que ce soit durant les cours, les divers congrès ou au laboratoire. Vos conseils, votre support, votre aide, votre bonne humeur et votre amitié, sans quoi ce projet de maîtrise n'aurait jamais été aussi agréable.

Un merci tout spécial à Benjamin Péant qui m'a supervisé durant tout ce beau projet. Merci pour ta patience, pour tes conseils, ton aide, tes encouragements, ton soutien. Merci de m'avoir appris les bonnes méthodes de travail en recherche, les bonnes questions et actions

à poser pour solutionner un problème. Merci aussi pour toute l'expérience que j'ai acquise avec toi durant ce projet de maîtrise et qui me sera utile tout au long de mes futurs projets. Ton sens de l'humour français m'a souvent fait oublier tous ces moments de difficultés, en plus d'égayer toutes mes journées. Merci pour tout, je n'aurais pas pu avoir un meilleur mentor que toi.

Merci à tous les membres de l'Institut du cancer de Montréal, du Centre de recherche du CHUM, des départements de gynécologie, de pathologie et de chirurgie du CHUM ainsi que des Programmes de biologie moléculaire pour cette expérience très enrichissante et stimulante.

Je suis également très reconnaissante envers mes directrices de recherche pour leur soutien financier, ainsi qu'auprès des autres organismes subventionnaires qui ont rendu possible la tenue de mon projet de maîtrise, soit les Programmes de biologie moléculaire, l'Institut du cancer de Montréal et Canderel.

Finalement, j'aimerais remercier les membres de ma famille et mes amis qui n'ont jamais cessé de croire en moi. Merci à ma mère, à mon père, à mes deux frères et à ma sœur qui ont toujours été à mes côtés pour m'encourager et me supporter, que ce soit dans les moments joyeux mais également dans les périodes plus difficiles de mon projet de maîtrise.

- Chapitre 1 REVUE DE LITTÉRATURE

I L'ovaire normal

L'ovaire est souvent décrit comme étant une glande génitale femelle qui produit les ovules et les hormones sexuelles. Il est aussi possible de dire que chez la femme, il s'agit d'un organe ayant un rôle clé dans la reproduction et par le fait même dans la perpétuation de l'espèce humaine. Mais, bien qu'il soit si important, il est aussi connu que des changements génétiques et épigénétiques peuvent survenir aux cellules ovariennes et donner naissance à des tumeurs. Avant de s'attarder à la complexité des tumeurs ovariennes, plus précisément au cancer épithélial de l'ovaire qui est le sujet de mon projet de maîtrise, il est avant tout important de connaître les fonctions d'un ovaire normal, en plus d'apprendre des notions sur son anatomie et sur sa conception. C'est ce qui sera traité dans la première partie de ce mémoire.

1.1 Embryologie de l'ovaire

Les gonades ou glandes sexuelles (testicules ou ovaires) se forment dans la crête génitale chez le mâle et la femelle. Ce renflement prend forme durant la cinquième semaine lors de la prolifération de l'épithélium cœlomique (qui tapisse l'intérieur de la cavité embryonnaire) et de l'épaississement du mésenchyme sous-jacent. Pour permettre aux gonades définitives et sexuellement différenciées de se développer, les cellules germinales primordiales doivent migrer et aller coloniser les deux crêtes génitales. Ces cellules sont l'origine commune des spermatozoïdes et des ovules, elles proviennent de l'endoderme qui borde le sac vitellin et elles sont diploïdes [1]. À la sixième semaine, les cellules germinales primordiales sont entourées par les cellules de l'épithélium cœlomique qui ont proliférées dans le mésenchyme. Les cordons sexuels se forment et restent joints à la surface de l'épithélium cœlomique. Le canal de Müller apparaît en même temps que les crêtes génitales, mais après le canal de Wolff. Le canal de Müller est un épaississement externe de l'épithélium cœlomique. À cette étape, il est encore impossible de faire la différence entre le système gonadique mâle et femelle.

La différenciation sexuelle se fait grâce au chromosome Y, plus précisément au gène SRY (sex determining region of the chromosome Y) qui a été isolé en 1990. Ainsi, en l'absence d'un chromosome Y et par le fait même du gène SRY, un phénotype féminin se développe

et les cordons sexuels de la zone médullaire se désagrègent. De plus, l'absence de production de l'hormone anti-müllérienne (AMH) chez les femmes rend possible la différenciation des canaux de Müller en trompes de Fallope, utérus et en la partie supérieure du vagin. Les canaux de Wolff quant à eux régressent et disparaissent en raison du manque de testostérone [2]. L'épithélium cœlomique continue pour sa part de proliférer et pénètre dans le mésenchyme pour ainsi entourer les cellules germinales en multiplication. Les cordons sexuels corticaux se forment et ceux-ci restent en contact avec la surface. Au cours du quatrième mois, les cordons corticaux se désagrègent à leur tour en amas cellulaires isolés et les cellules épithéliales vont entourer les cellules germinales primordiales [1], [3], [4]. Ces dernières vont ainsi se différencier en ovogonies (cellules diploïdes). À noter également que chacune des ovogonies est ensuite entouré d'une couche de cellules folliculaires provenant des cordons sexuels pour constituer un follicule primordial. Il y a ensuite une première division méiotique, les ovogonies devenant donc des ovocytes de premier ordre, mais la méiose restera bloquée au stade de la prophase jusqu'à la puberté. À la puberté, 6 à 12 ovocytes de premier ordre (ou primaires) pourront achever, à chaque cycle ovarien, leur première division méiotique, et quelques rares ovocytes (souvent un seul) pourront atteindre la deuxième division méiotique et l'ovulation [5]. Le cycle ovarien sera décrit plus en détails à la section 1.4.

1.2 Anatomie de l'ovaire

L'ovaire est un organe pair, ayant une structure ovoïde et légèrement aplatie chez la femme adulte, lui donnant l'allure d'une amande. Il mesure environ 5 cm de longueur, 3 cm de largeur et 1 cm d'épaisseur et pèse entre 2 et 4 grammes [6]. Sa teinte blanchâtre le distingue facilement des structures anatomiques avoisinantes. À l'âge adulte, sa surface est irrégulière, marquée par des sillons, des cicatrices d'ovulations et par des saillies correspondant aux follicules, alors qu'elle est plutôt lisse à la puberté. À la ménopause, la surface des ovaires est plutôt fibreuse et les ovaires sont atrophiés. Cela fait en sorte qu'ils sont souvent non palpables et non reconnaissables, ce qui rend difficile le dépistage d'un cancer ovarien.

Les ovaires sont situés dans la cavité péritonéale, plus spécifiquement dans le petit bassin de part et d'autre de l'utérus, en contact avec le pavillon des trompes de Fallope (Figure 1).

Les ovaires sont mobiles, chacun étant maintenu par trois ligaments et par le mésovarium. Le ligament propre de l'ovaire (ou utéro-ovarien) fixe l'ovaire à l'utérus, alors que le ligament suspenseur de l'ovaire fixe l'ovaire à la paroi du bassin. Tandis que le ligament tubo-ovarien fixe l'ovaire à la trompe utérine, le mésovarium permet l'attachement de l'ovaire au péritoine, l'ovaire n'étant pas recouvert de péritoine.

L'ovaire est irrigué principalement par l'artère ovarienne (naissant de l'aorte) et utérine. Pour atteindre les ovaires, les vaisseaux ovariens passent dans les ligaments suspenseurs et dans le mésovarium. Le drainage veineux des ovaires s'effectue à droite par la veine cave et par la veine rénale à gauche [1].

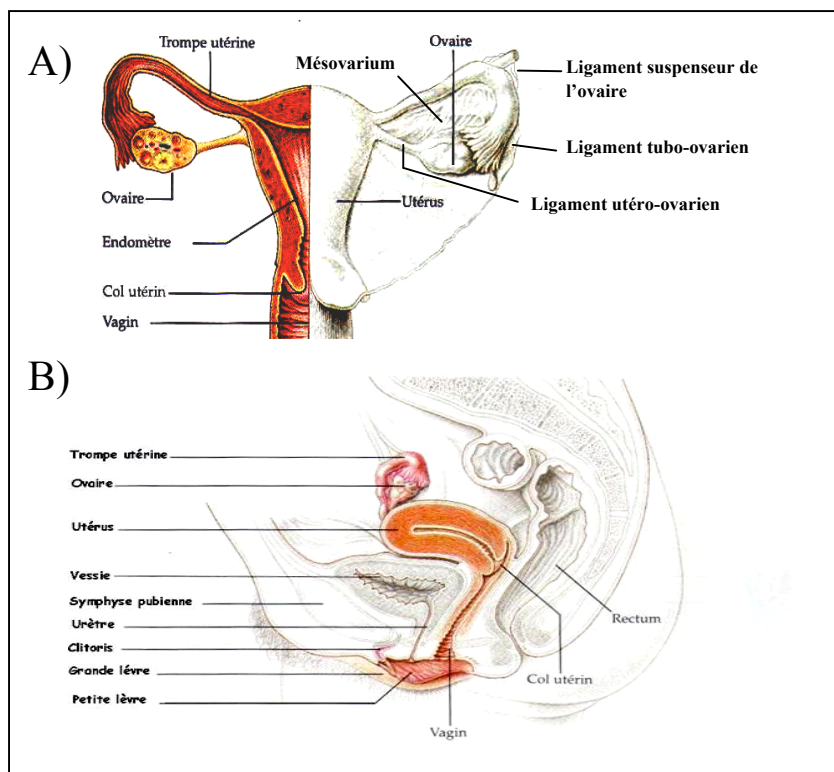


Figure 1 Anatomie du système reproducteur de la femme (adaptée de [5])

A) Vue frontale

B) Vue sagittale

1.3 Histologie de l'ovaire

Une coupe histologique d'un ovaire normal permet de bien délimiter ses trois zones : l'épithélium, la zone périphérique ou corticale et la zone centrale ou médullaire (Figure 2). En premier lieu, la surface de l'ovaire est recouverte par l'épithélium de surface ovarien

(OSE), autrefois appelée épithélium germinatif, qui lui assure une importante protection. L’OSE dérive de l’épithélium cœlomique et est formé d’une seule couche de cellules cuboïdes. Il est caractérisé par les kératines 7, 8, 18 et 19, qui sont typiques aux épithéliums simples. Par ses microvillosités, l’OSE a pour fonctions de transporter des molécules de et vers la cavité péritonéale, en plus de prendre part de façon cyclique à la rupture ovulatoire. En effet, l’OSE contient des lysosomes dans ses inclusions et peut produire des enzymes protéolytiques qui peuvent contribuer à la rupture des follicules. De plus, l’OSE a la capacité de proliférer pour réparer la surface ovarienne à la suite de l’ovulation [7]. L’OSE est ensuite séparé du stroma ovarien par une membrane basale à laquelle il n’est que très faiblement attaché, ce qui le diffère des autres épithéliums.

Sous cette membrane basale se trouve une couche de tissu conjonctif dense de collagène, appelée la tunique albuginée, qui est responsable de la couleur blanchâtre de l’ovaire. La tunique albuginée crée en quelque sorte une barrière partielle à la diffusion d’agents bioactifs entre l’OSE et le stroma ovarien. C’est sous cette tunique albuginée de la zone corticale que se trouve le stroma, qui dérive du mésenchyme. Il contient de multiples organites ou follicules ovariens à tous les stades d’évolution [7]. Chaque follicule étant composé, au centre, par des cellules germinales ou ovocytes, suivi de cellules de la granulosa et puis par des cellules de la thèque (Figure 3) [6].

Enfin, la zone médullaire de l’ovaire, est plutôt spongieuse et très vascularisée. Elle est composée de tissus conjonctifs lâches, de fibres élastiques et musculaires lisses et regroupent les vaisseaux sanguins ainsi que les nerfs.

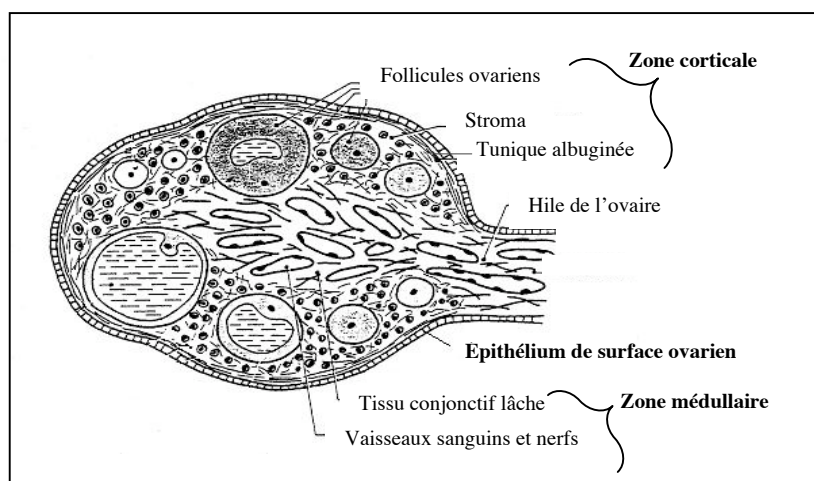


Figure 2 Coupe histologique d’un ovaire normal humain
(adaptée de [<http://www.chups.jussieu.fr/polys/cancero/POLY.Chp.12.html>])

1.4 Les fonctions de l'ovaire

Chez la femme, l'ovaire a une double fonction. La première est une fonction reproductrice. Elle permet de produire les cellules reproductrices femelles : les ovocytes. La seconde, se caractérise par la synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes, soit les œstrogènes (l'œstradiol) et la progestérone. Ainsi, les ovaires sont donc des glandes mixtes, endocrines et exocrines (comme le pancréas ou les testicules).

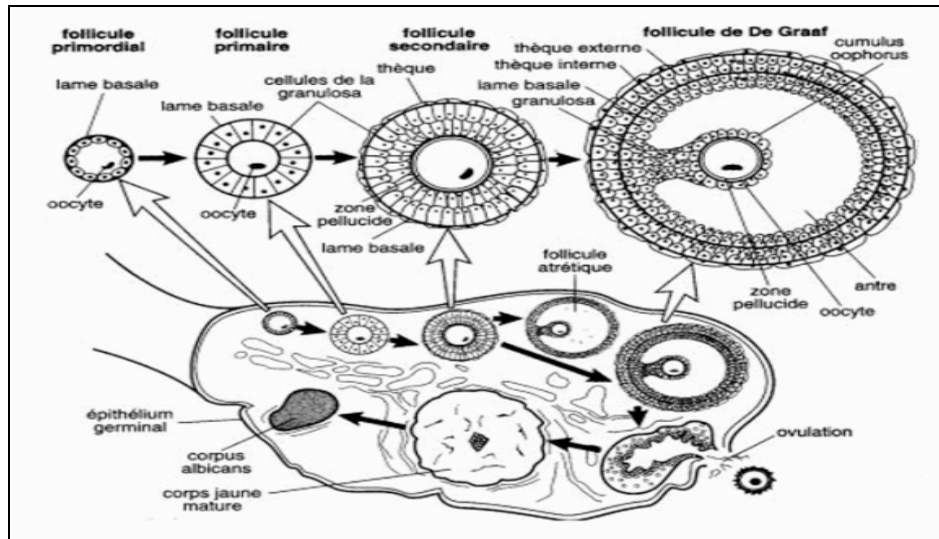


Figure 3 Stades ovulaires et folliculaires

(tirée de [<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/f0312baf-5678-44d0-acfc-9539cf49538d/ch01.html>])

L'ovogénèse ou la formation des ovocytes se déroule dans la zone corticale de l'ovaire et débute lors de la vie embryonnaire. Lors du développement embryonnaire, l'ovaire en formation contient environ 7 millions de cellules germinales (ovogonies). À la naissance, ce nombre passe à 2 millions de follicules primordiaux, puis à environ 400 000 à la puberté. Parmi eux, environ 400 seulement deviendront des ovocytes de deuxième ordre qui pourront se développer entre la puberté et la ménopause pour produire un ovule fécondable [1]. À la naissance, les follicules primordiaux comprennent un ovocyte (ovule) entouré d'une couche de cellules épithéliales aplaties (pré-granulosa), en plus d'être délimités par du stroma ovarien et une lame basale (Figure 3). Le développement des couches supplémentaires de cellules cuboïdes de la granulosa est caractéristique du follicule primaire. Par la suite, des cellules fusiformes de l'interstitium ovarien s'accumulent en plusieurs couches autour de la granulosa pour ainsi former les cellules de la thèque et

donner naissance au follicule secondaire. Le follicule tertiaire, aussi appelé follicule De Graaf, comprend la thèque interne, qui sécrète les hormones stéroïdes sexuelles, en plus de la thèque externe qui forme plutôt une capsule très vascularisée. Ce follicule mature est formé autour d'une cavité (l'antra) qui est remplie de liquide folliculaire [1, 8].

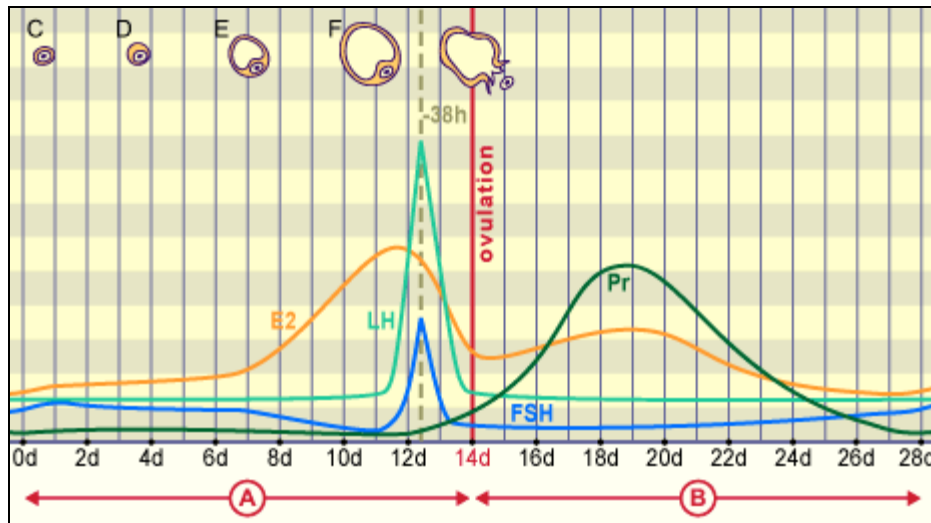


Figure 4 Cycle ovarien selon le système hypothalamo-hypophysaire
(tirée de [<http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/oogenese04.html>])

A : phase folliculaire, B : phase progestative, C : follicule primaire, D : follicule secondaire, E : follicule tertiaire, F : follicule de Graaf, E2 : œstradiol, Pr : progestérone, LH : hormone lutéinisante, FSH : hormone folliculo-stimulante.

La deuxième fonction de l'ovaire, soit la production des hormones sexuelles, est étroitement liée à la première. En effet, les hormones assurent la régulation des cycles menstruels et ovariens afin de synchroniser la croissance du follicule et l'ovulation, en plus de préparer l'endomètre en vue de l'implantation possible d'un embryon. Tout cela se fait selon le système hypothalamo-hypophysaire. Cinq hormones y participent : il y a la gonadolibérine (LHRH) produite par l'hypothalamus, les deux gonadotrophines sécrétées par l'adénohypophyse [l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH)], ainsi que les œstrogènes et la progestérone.

Pendant la phase folliculaire, l'adénohypophyse sécrète de très faibles quantités de FSH et de LH en réponse à la stimulation exercée par la LHRH. Plus le follicule grossit, plus la quantité d'œstrogène (œstradiol) augmente. Un phénomène de rétroactivation positive a lieu, puisque la quantité de gonadotrophines qui restait basse en présence d'une faible

concentration d'œstrogène, stimule maintenant la sécrétion de FSH et de LH en présence d'une forte concentration d'œstrogène, ce qui provoque la maturation finale du follicule (Figure 4). Environ une à deux journées après l'augmentation accrue de LH, l'ovulation se produit (libération de l'ovule). Après l'ovulation, la LH stimule la transformation du tissu folliculaire encore présent dans l'ovaire en corps jaune, les cellules de la thèque accumulant alors des lipides dans leur cytoplasme. Le corps jaune sécrète beaucoup de progestérone et d'œstrogènes. Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur l'adénohypophyse et l'hypothalamus, ce qui inhibe la sécrétion de FSH et de LH. La grande quantité de progestérone sécrétée a pour but de préparer l'endomètre à l'implantation de l'embryon. Mais, s'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune commence à dégénérer. Ainsi, les concentrations d'œstrogènes et de progestérone chute fortement ce qui a pour effet de libérer l'adénohypophyse et l'hypothalamus, qui peuvent à nouveau sécréter des quantités suffisantes de FSH pour stimuler la croissance de nouveaux follicules dans l'ovaire et amorcer par le fait même un nouveau cycle ovarien. La FSH cause la croissance rapide de 6 à 12 follicules chaque mois, et environ une semaine avant l'ovulation, la croissance d'un des follicules domine. Les 5 à 11 autres follicules restants commencent ensuite à involuer et à devenir atrésiques (l'atrésie étant un processus de mort cellulaire naturelle, l'apoptose). C'est ce qui se produit dans la majorité du temps, afin qu'un seul ovule soit expulsé de l'ovaire chaque mois, et ainsi qu'un seul fœtus puisse se développer à la fois [5, 8].

III Le cancer de l'ovaire

Le cancer peut être décrit comme étant une maladie caractérisée par une prolifération anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules anormales ont pu acquérir différentes caractéristiques telles que la capacité à produire leurs propres facteurs de croissance (autosuffisance), l'insensibilité aux signaux d'anti-croissance, l'évasion au processus d'apoptose, l'angiogénèse soutenue, un potentiel réplicatif illimité, l'invasion du tissu environnant et la formation de métastases [9]. Connaissant maintenant la structure d'un ovaire de même que son processus de développement, il ne fait aucun doute que le cancer de l'ovaire est une maladie complexe qui mérite d'être approfondie.

1.5 L'épidémiologie du cancer de l'ovaire

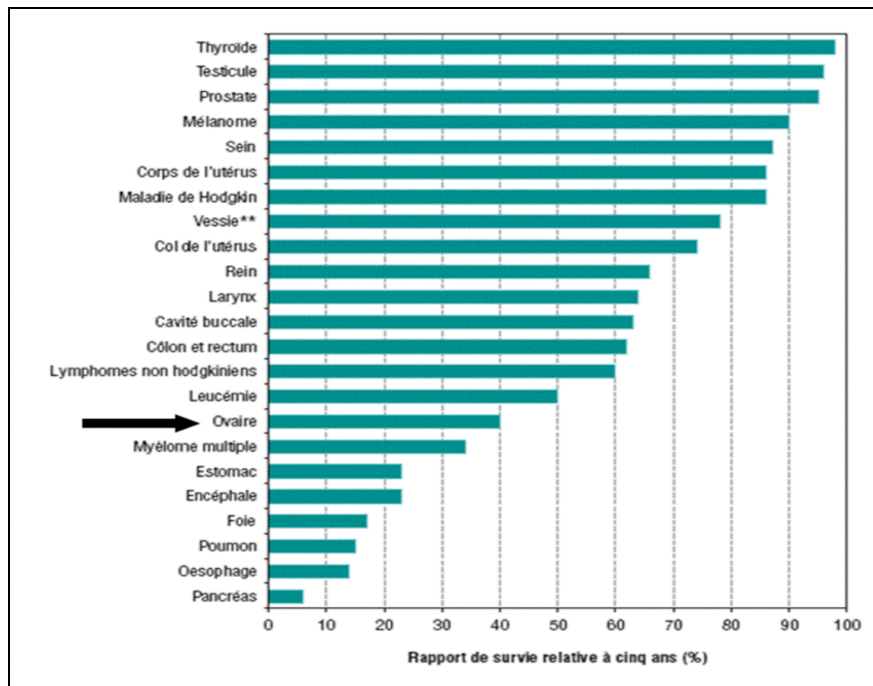


Figure 5 Survie relative à 5 ans (%) des cancers les plus fréquents, les deux sexes combinés (tirée de [10])

Au Canada, en 2008, le cancer de l'ovaire est le 7^e cancer en importance chez la femme et le 5^e plus meurtrier. Cela en fait le cancer gynécologique le plus léthal. En effet, 2500 nouveaux cas sont estimés pour 2008 au Canada, alors que 1700 décès sont prévus. Juste au Québec, 640 femmes seront diagnostiquées pour un cancer de l'ovaire cette année et 370 en décèderont. À l'opposé, beaucoup plus de femmes canadiennes seront nouvellement atteintes d'un cancer du sein en 2008, soit 22 400, mais 5300 en mourront. De plus, la survie à 5 ans des patientes atteintes d'un cancer du sein est de 87%, alors qu'elle chute drastiquement à 40% chez les femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire (Figure 5) [10]. En d'autres mots, cela signifie qu'au cours de sa vie, 1 femme sur 72 sera atteinte du cancer de l'ovaire, et 1 femme sur 87 sera emportée par cette maladie. Mondialement, 11 femmes sur 100 000 seront atteintes d'un cancer de l'ovaire, les plus hauts taux étant relevés en Europe du Nord et de l'Est, ainsi qu'en Amérique du Nord, alors que l'Asie et l'Afrique possèdent les taux les plus bas [11].

1.6 L'étiologie et les facteurs de risques du cancer de l'ovaire

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin de mieux comprendre les processus physiologiques qui augmentent le risque de développer un cancer de l'ovaire. Sachant que 90% des cas de cancer de l'ovaire ne présentent pas une composante génétique connue, voici une description de quelques unes de ces hypothèses et des nombreux facteurs de risque connus jusqu'à maintenant dans le domaine.

1.6.1 L'âge

Le cancer de l'ovaire atteint préférentiellement les femmes âgées de 50 ans et plus, à l'exception des cas de cancers héréditaires qui surviennent chez les femmes plus jeunes. En fait, le taux d'incidence ne cesse d'augmenter à chaque tranche de vie de 10 ans pour atteindre un sommet chez les femmes âgées de 75 à 79 ans [11].

1.6.2 L'alimentation

Les aliments associés à un risque plus élevé de développer un cancer de l'ovaire comprennent les gras saturés, l'amidon et les viandes rouges. Les aliments protecteurs sont plutôt les huiles d'olive et végétales, les poissons, les pois, les haricots, les lentilles, les aliments faits de grains entiers et le lait faible en gras. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré des résultats contradictoires sur l'effet protecteur ou non de la consommation de fruits et de légumes sur le développement d'un cancer ovarien [11, 12].

1.6.3 Les habitudes de vie

L'association entre la cigarette et le cancer de l'ovaire reste incertaine, puisque des études ont suggéré une association positive, négative ou même nulle. Cependant, dans des études montrant une association positive, il semble que les femmes fumeuses développent préférentiellement des tumeurs mucineuses [7, 12]. L'obésité demeure également un facteur de risque très controversé. En effet, elle est souvent associée à une cessation de l'ovulation chez les femmes en pré-ménopause et à une augmentation des niveaux d'œstrogènes après la ménopause (l'œstrogène étant connu pour être capable de stimuler les cellules de l'OSE)

[7, 12]. La plupart des études montrent toutefois que plus une femme a un indice de masse corporelle élevé, plus elle a de risque de développer un cancer de l'ovaire, surtout si elle est dans sa pré-ménopause [13].

1.6.4 Les facteurs environnementaux et l'hypothèse de l'inflammation

Des études cliniques et épidémiologiques ont montré que l'utilisation de talc (cosmétique en poudre) dans les régions génitales augmente les chances de développer un cancer de l'ovaire [12]. Les polluants industriels, l'amiante et les agents infectieux sont également des facteurs de risques [7]. Les taux d'incidence du cancer de l'ovaire varient aussi en fonction de l'emplacement géographique et de l'origine ethnique. Les taux les plus élevés étant retrouvés chez les femmes Caucasiennes vivants dans les pays industrialisés de l'Amérique du Nord et de l'Europe [11]. Il a également été suggéré récemment que l'inflammation pourrait être un facteur contribuant au développement des cancers ovariens puisque la ligature des trompes et l'hystérectomie (ablation de l'utérus) agissent comme facteurs protecteurs en prévenant le passage des initiateurs environnementaux de l'inflammation [7]. L'inflammation produit des oxydants toxiques qui peuvent causer des dommages à l'ADN, ce qui peut augmenter les risques de mutations.

1.6.5 L'hypothèse de l'ovulation

La théorie de l'ovulation incessante émise en 1971 par Fathalla suppose que le processus de rupture et de réparation (cicatrisation) à la surface de l'ovaire suite à l'ovulation pourrait être à l'origine de la carcinogénèse. En support à cette hypothèse, une ménarche (première menstruation) précoce, une ménopause tardive, l'absence de grossesse, l'infertilité, de même que les traitements pour l'infertilité et pour contrer les effets désagréables de la ménopause augmentent les risques de développer un cancer de l'ovaire. À l'opposé, les grossesses, l'allaitement et la prise de contraceptifs oraux, lesquels suppriment l'ovulation, sont associés avec une diminution des risques de développer un cancer ovarien [11, 12, 14, 15]. En effet, la prise de contraceptifs oraux diminue les risques de développer un cancer de l'ovaire de 7% pour chaque année d'utilisation. À l'opposé, l'hormonothérapie de remplacement chez les femmes en ménopause est associée à une légère augmentation du risque de développer un cancer de l'ovaire. De plus, chaque mois de grossesse diminue le

risque de 2.6%, alors que chaque mois d'allaitement le diminue de 2.4%. Les femmes infertiles n'ayant jamais eu d'enfant ont 40% plus de chance de développer un cancer de l'ovaire comparativement aux femmes fertiles n'ayant jamais eu de grossesse [15]. Des études ont également montré qu'une femme ayant une mutation BRCA1 ou BRCA2 diminue son risque de développer un cancer de l'ovaire de 12-16% pour chaque enfant mis au monde [16].

1.6.6 L'hypothèse des gonadotrophines

Cette hypothèse stipule que l'exposition à une trop grande quantité de gonadotrophines (FSH et LH) augmenterait la production d'œstrogènes, ce qui mènerait à la prolifération de l'OSE et possiblement à des transformations malignes. En fait, c'est durant la ménopause et chez les femmes plus âgées que les niveaux de gonadotrophines sont les plus élevés, ce qui concorde avec le développement des cancers ovariens. La grossesse et la prise de contraceptifs oraux au contraire diminuent les taux de gonadotrophines circulantes. En appuie à cette théorie, il y a entre autre les traitements de gonadotrophines prescrits aux femmes infertiles qui augmentent le risque de développer un cancer de l'ovaire. Cependant, certaines femmes ayant des niveaux très bas de gonadotrophines circulantes développent des cancers de l'ovaire. De plus, les niveaux de FSH sont assez élevés chez les femmes qui allaitent, ce qui vient quelque peu contredire cette théorie [15].

1.6.7 Les facteurs génétiques

L'incidence des cancers de l'ovaire attribuable aux facteurs génétiques est de 5-10% et est divisée en 3 classes. Il y a premièrement les cancers héréditaires spécifiques de l'ovaire qui représentent 10-15% des cas. Une femme ayant un membre de sa parenté immédiate (mère, sœur, fille) atteint d'un cancer de l'ovaire a 4-7% plus de chance de développer aussi un cancer. Ce risque augmente à 7-15% si deux membres ou plus de sa parenté immédiate sont atteints. Des mutations au niveau du gène BRCA1 seraient en cause [11]. Deuxièmement, il y a les cancers sein-ovaire. Le gène BRCA1 serait muté dans 80% des cas, les mutations étant moins fréquentes pour le gène BRCA2. Ces deux gènes jouent un rôle dans le signalement des dommages à l'ADN, l'activation de la réparation de l'ADN, l'induction de l'apoptose et le suivi des points de contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, les femmes atteintes

de mutations BRCA1/2 ont 35-85% de chance de développer un cancer du sein (50% avant l'âge de 50 ans et 82% à partir de 70 ans) et 15-60% de chance de développer un cancer de l'ovaire [11]. Troisièmement, il y a les défauts dans les gènes de réparation des appariements (ou mismatch repair, tels que hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2) du syndrome de Lynch ou du cancer du colon héréditaire non polyposique (HNPCC) qui sont responsables d'environ 10% des cancers de l'ovaire héréditaires. Ces derniers causent de l'instabilité génétique, ce qui rend les cellules sujettes à l'acquisition de mutations. Ainsi, les patientes atteintes de ces syndromes ont 40-60% de chance de développer un cancer du colon et de l'endomètre, en plus d'avoir 12% de chance de développer un cancer de l'ovaire [11, 16, 17].

1.7 Les types de tumeurs de l'ovaire

Les tumeurs de l'ovaire peuvent dériver de trois types cellulaires différents. Elles peuvent être d'origine stromale ou des cordons sexuels, germinale ou bien épithéliale (Figure 6).

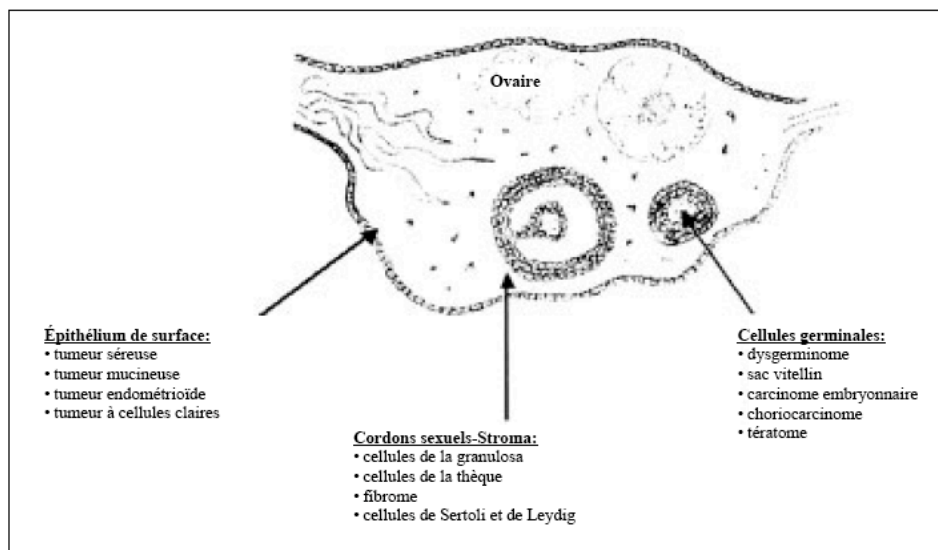


Figure 6 Origines des trois principaux types de tumeurs ovariennes (tirée de [6])

1.7.1 Tumeurs d'origine stromale ou des cordons sexuels

Les tumeurs dites stromales ou des cordons sexuels comptent pour environ 10% de toutes les tumeurs de l'ovaire et pour 3-7% des tumeurs malignes de l'ovaire [6]. Ces tumeurs

sont généralement indolores et possèdent un bon pronostic à long terme. Elles dérivent des cellules de la granulosa, de la thèque, et de d'autres cellules stromales (fibrome), en plus des cellules de Sertoli et de Leydig qui sont normalement retrouvées au niveau des testicules chez l'homme adulte (Figure 6). Les tumeurs d'origine stromale ou des cordons sexuels peuvent être associées à une production hormonale menant au développement de phénotypes masculins ou féminins chez les patientes atteintes. De ce groupe, les tumeurs des cellules de la granulosa sont les plus potentiellement malignes et représentent 70% des tumeurs malignes stromales ou des cordons sexuels [18].

1.7.2 Tumeurs d'origine germinale

Les tumeurs de l'ovaire qui dérivent plutôt des cellules germinales comptent pour environ 25% de toutes les tumeurs de l'ovaire et pour 3-7% des tumeurs malignes. Ces tumeurs sont généralement peu fréquentes et bénignes chez la femme adulte, alors qu'elles représentent plus de la moitié des tumeurs ovariennes malignes se développant chez les fillettes et les adolescentes. Le tératome (qui dérive de plus d'une couche primitive embryonnaire : ecto, meso ou endoderme) est généralement bénin, mais il peut arriver qu'une couche de cellules se différencie pour devenir malignes. Les autres tumeurs d'origine germinale sont malignes et comprennent le dysgerminome (qui est composé de cellules germinales primordiales), la tumeur du sac vitellin (ou du sinus endodermique), le carcinome embryonnaire (tumeur germinale la moins bien différenciée) et le choriocarcinome (formé par des éléments cellulaires du placenta) [6].

1.7.3 Tumeurs d'origine épithéliale

Les tumeurs épithéliales dérivent de l'OSE. Elles représentent environ 65% de toutes les tumeurs de l'ovaire et près de 90% des tumeurs malignes [6]. Puisque mon projet de maîtrise a porté sur ce type de tumeurs ovariennes, les sections suivantes le décriront plus en détails.

1.8 Classifications des tumeurs de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'obstétrique (FIGO)

Le cancer de l'ovaire est une maladie complexe pour laquelle la FIGO a établi quatre critères pour bien la définir, soit la classe tumorale, le type histopathologique, le grade et le stade.

1.8.1 Les classes tumorales

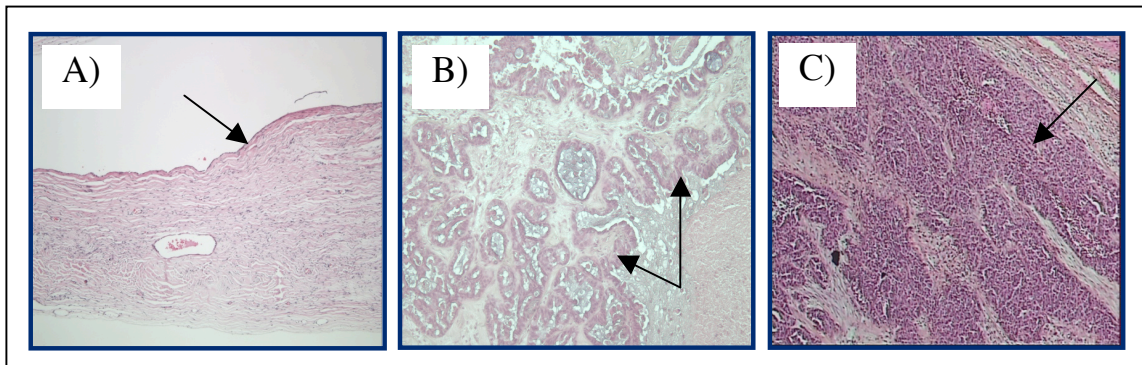


Figure 7 Coupes histologiques des trois classes tumorales

- A) Tumeur bénigne**
- B) Tumeur à faible potentiel de malignité**
- C) Tumeur invasive**

1.8.1.1 Les tumeurs bénignes (BOV)

Histologiquement, les tumeurs bénignes montrent une prolifération de l'OSE sans stratification et ne présentent pas de cellules atypiques (anormales) (Figure 7A). Ces tumeurs sont plutôt inoffensives et sont généralement retrouvées sous la forme de masses kystiques (cavité néoformée possédant un revêtement propre), comme par exemple les fibromes et les cystadénomes. Bien qu'il peut y avoir torsion au niveau de l'ovaire, les principaux risques associés aux tumeurs bénignes concernent l'ablation de la masse. Par exemple, dans le cas d'une rupture, le contenu du kyste peut s'avérer très irritant pour le péritoine et même entraîner éventuellement une dissémination tumorale dans la cavité péritonéale si le kyste ne s'avérait pas juste bénin [19, 20].

1.8.1.2 Les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP)

En 1971, la FIGO a proposé de créer une catégorie distincte de tumeurs appelées borderlines ou à faible potentiel de malignité (Figure 7B). Ce nom vient du fait qu'elles ne sont ni bénignes, ni malignes, mais entre les deux puisqu'elles présentent certaines caractéristiques de malignité, mais pas toutes. En effet, elles sont bilatérales dans 26-50% des cas, ce qui est plus élevé que les tumeurs bénignes, mais moins que les invasives. De plus, les tumeurs LMP se caractérisent par une prolifération épithéliale avec stratification (3-4 couches). Les atypies cellulaires sont limitées, l'index mitotique est faible et il y a absence d'envahissement du tissu conjonctif adjacent ou d'invasion stromale contrairement aux tumeurs invasives. Les tumeurs borderlines sont souvent limitées aux ovaires, diagnostiquées majoritairement chez des femmes plus jeunes (<60 ans, l'âge moyen pour les patientes ayant une tumeur LMP séreuse étant de 38 ans) et ont un pronostic bien meilleur que les tumeurs invasives. En ce qui concerne les tumeurs LMP séreuses, elles ont une survie à 5 ans excellente, soit de 90-95% lorsque la tumeur est de stade I et chute à 55-70% en présence d'un stade III de la maladie. Cependant, 7-15% des tumeurs LMP peuvent récidiver et sont souvent associées avec de l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosome), un index mitotique élevé et/ou la présence de microinvasion [21].

Le terme microinvasion est utilisé pour désigner un foyer invasif plus petit que 10 mm² et ayant moins de 3 mm dans sa dimension la plus longue. Ces foyers sont généralement composés de cellules épithéliales seules ou d'un petit groupe de cellules au niveau du stroma [22]. Des foyers de microinvasion sont retrouvés dans environ 10-13% des cas de tumeurs LMP séreuses, mais ne semblent pas directement affecter le pronostic des patientes [23].

Un autre aspect unique aux tumeurs borderlines est que les lésions à distance (extra-ovariennes) ne sont pas appelées métastases, mais plutôt implants péritonéaux. Les implants péritonéaux associés aux tumeurs LMP séreuses ont été classés comme étant invasifs (dans 22% des cas) ou non-invasifs (dans 78% des cas), les non-invasifs pouvant être de type épithélial ou desmoplastique (fibreux). Les implants non-invasifs n'entravent pratiquement pas la survie à long terme des patientes. À l'opposé, 50% des patientes présentant des implants invasifs récidivent et leur taux de survie à 10 ans est de 33% [22, 24]. Les implants péritonéaux sont retrouvés chez environ 20-46% des patientes présentant

une tumeur LMP séreuse. De plus, ils sont fortement associés à des tumeurs à croissance exophytique (extériorisée) puisque deux-tiers de ces patientes présentent des implants et parmi elles, 94% ont une tumeur à croissance exophytique [23]. Il est à noter que les études se contredisent quant à savoir si ces implants dérivent des tumeurs borderlines (un peu comme les métastases) ou s'ils se développent de façon totalement indépendante.

Enfin, en 1996, un groupe a décrit un nouveau sous-ensemble représentant 5-12% des tumeurs LMP séreuses typiques, soit les carcinomes micropapillaires séreux (MPSC). Les patientes atteintes de MPSC sont généralement plus jeunes que celles atteintes de LMP typiques. Les deux ovaires sont souvent atteints et la survie à long terme de ces patientes est moins bonne, entre autre puisque les MPSC sont fréquemment reliés à des stades avancés de la maladie. Les LMP typiques, s'organisent en papilles selon un patron hiérarchique, c'est-à-dire qu'elles sont minces à la base et qu'elles se terminent par un bourgeonnement épithélial. Les papilles des MPSC émergent plutôt de façon non-hiérarchique (même largeur sur toute la longueur) et elles sont 5 fois plus longues que larges. Ainsi, lorsque la tumeur présente ce patron sur au moins 5 mm, elle est désignée comme MPSC [22]. Il semble aussi que ce sous-ensemble soit plus souvent associé aux implants péritonéaux invasifs, ce qui pourrait expliquer leur moins bon pronostic que les LMP typiques, mais les avis demeurent partagés.

1.8.1.3 Les tumeurs invasives (TOV)

Les tumeurs invasives présentent une prolifération épithéliale avec stratification, en plus d'avoir beaucoup d'atypies cellulaires et un index mitotique élevé (Figure 7C). Mais la caractéristique propre aux tumeurs invasives est la présence d'invasion stromale destructive. Ces tumeurs sont aussi souvent composées de larges zones nécrotiques, hémorragiques, inflammatoires et solides. Elles touchent essentiellement les femmes en péri-ménopause et après la ménopause. Elles sont généralement bilatérales et détectées à un stade avancé (III-IV) de la maladie. Une femme atteinte d'une tumeur invasive séreuse de stade III à un taux de survie à 5 ans de seulement 15-30% [6, 22]. Il est à noter que les stades de la maladie seront présentés en détails à la section 1.8.4.

1.8.2 Les types histopathologiques

Comme mentionné précédemment, environ 90% des cancers de l'ovaire dérivent de l'épithélium cœlomique qui recouvre la surface des ovaires. Puisque cette surface est multipotente, elle peut se différencier en plusieurs types d'épithéliums différents [11]. C'est pourquoi les tumeurs épithéliales de l'ovaire peuvent être classifiées en fonction du type cellulaire qui les compose (Figure 8).

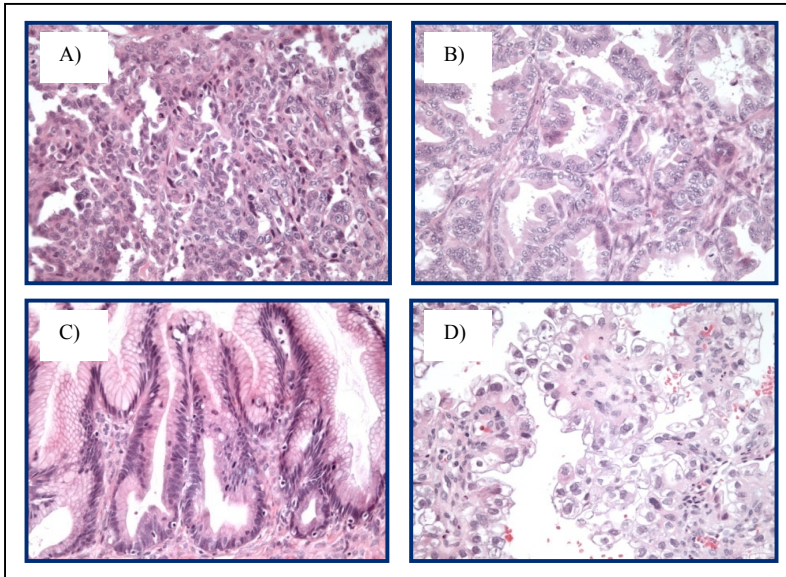


Figure 8 Coupes histologiques des quatre principaux types histopathologiques du cancer épithélial de l'ovaire

- A) Séreux**
- B) Mucineux**
- C) Endométriöide**
- D) Cellules claires**

1.8.2.1 Séreux

Ce type histopathologique est le plus fréquent et est retrouvé dans environ 55% des tumeurs épithéliales. Les tumeurs séreuses sont appelées ainsi puisqu'elles sont formées de cellules ayant l'architecture de la paroi interne des trompes de Fallope (Figure 8A). Dans environ 65% des cas, elles sont bénignes et donc sous forme de kystes. Elles surviennent fréquemment chez les femmes dans la quarantaine et la cinquantaine, plus de 20% de ces tumeurs sont bilatérales, c'est-à-dire survenant sur les deux ovaires simultanément et la chirurgie est un traitement curatif. Les tumeurs séreuses peuvent également être

borderlines, soit dans environ 10% des cas. Ces dernières sont souvent diagnostiquées chez la femme dans la cinquantaine et plus du tiers de ces tumeurs sont bilatérales. Ces tumeurs sont généralement retirées par chirurgie et la survie à 5 ans des patientes est bonne, soit 70-95%. Enfin, dans 25% des cas, les tumeurs séreuses sont malignes. Ce groupe représente plus de la moitié de toutes les tumeurs malignes de l'ovaire confondues. Elles surviennent fréquemment chez les femmes âgées dans la soixantaine et environ 66% de ces tumeurs sont bilatérales. Elles sont traitées par chirurgie et chimiothérapie, mais la majorité de ces tumeurs sont déjà à un stade avancé lors du diagnostic. Ainsi, la survie à 5 ans des patientes avec un stade I de la maladie est de 76%, pour diminuer à 56% en présence d'un stade II, à 25% avec un stade III et même chuter drastiquement à 9% avec un stade IV de la maladie [6].

1.8.2.2 Mucineux

Les tumeurs dites mucineuses sont plutôt composées de cellules ressemblant à celles de l'épithélium endocervical et intestinal. Ces cellules sont caractérisées par une abondante quantité de mucus (mucine) intracytoplasmique (Figure 8B). Les tumeurs mucineuses comptent pour approximativement 10% des cancers de l'ovaire [25]. Elles peuvent être sous forme bénignes (80%), à faible potentiel de malignité (10%) ou malignes (10%). Les tumeurs bénignes surviennent généralement chez les femmes âgées entre la trentaine et la cinquantaine et sont rarement bilatérales. De leur côté, les tumeurs borderlines surviennent chez les femmes plus âgées. Les tumeurs du type endocervical sont bilatérales dans 40% des cas, alors que celles de type intestinal le sont dans moins de 10% des cas. Une caractéristique des tumeurs mucineuses malignes est qu'elles ne répondent pas à la chimiothérapie. De plus, la survie à 5 ans des femmes atteintes de tumeurs mucineuses malignes ressemble beaucoup à celles des tumeurs séreuses malignes, mais ne sont retrouvées bilatéralement que dans 6 à 20% des cas [6].

1.8.2.3 Endométrioides

Les tumeurs épithéliales dites endométrioides sont formées de cellules ayant l'aspect de celles qui recouvrent la paroi de l'utérus, plus précisément de l'endomètre (Figure 8C). Elles représentent environ 10% des tumeurs de l'ovaire. Les tumeurs bénignes de ce type histopathologique sont plutôt rares et surtout unilatérales. Ces tumeurs peuvent aussi être retrouvées sous forme borderline dans 20% des cas et sont aussi souvent unilatérales. Le traitement pour ces tumeurs bénignes et borderline est la chirurgie et le pronostic est très bon, même si elles sont diagnostiquées chez les femmes dans la soixantaine. À l'opposé et dans près de 80% des cas, les tumeurs endométrioides peuvent être malignes et environ 13-28% d'entre elles sont bilatérales. Il est à noter que les tumeurs endométrioides malignes sont considérées comme ayant un meilleur pronostic que les tumeurs malignes séreuses et mucineuses [6, 26].

1.8.2.4 Cellules claires

Les tumeurs à cellules claires sont caractérisées par des cellules polygonales ayant un cytoplasme riche en glycogène et contenant des quantités variées de lipides (Figure 8D) [27]. Elles représentent environ 5% des tumeurs ovariennes. Les tumeurs bénignes et borderlines à cellules claires sont assez rares, la majorité des tumeurs de ce type histopathologique étant malignes. Ces tumeurs ont une caractéristique raciale, puisqu'elles sont très fréquentes chez les femmes orientales. À noter également que deux-tiers des patientes atteintes de tumeurs malignes à cellules claires n'ont jamais eu d'enfant et que 50-70% sont également atteintes d'endométriose (maladie gynécologique dans laquelle du tissu de l'endomètre est retrouvé en dehors de l'utérus, soit sur les ovaires, les trompes de Fallope et quelques fois sur d'autres organes comme la vessie, l'intestin et le vagin) [6]. Les taux de survie à 5 ans des patientes ayant une tumeur à cellules claires sont beaucoup moins bons que les autres types histopathologiques, dû entre autre au fait que c'est le type le plus résistant à la chimiothérapie [28].

1.8.2.5 Les autres histopathologies

Les tumeurs indifférenciées sont formées de cellules présentant des caractéristiques de cellules malignes. En effet, elles comportent beaucoup d'atypies cellulaires, des mitoses atypiques et ne présentent aucune différenciation ou qu'au niveau de régions mineures [28]. Elles représentent environ 15% des tumeurs épithéliales de l'ovaire. La moitié d'entre elles sont bilatérales et plus des trois-quarts présentent une extension dans la région pelvienne lors du diagnostic [6]. Elles grossissent rapidement et ont le pire pronostic de toutes les tumeurs épithéliales de l'ovaire [28].

Lorsque la tumeur est composée de plus d'un type histopathologique et que chacun de ces types constituent au moins 10% de la tumeur lors de l'examen microscopique, les tumeurs sont dites mixtes. Elles représentent environ 3% des tumeurs ovariennes [28].

Enfin, dans environ 2% des cancers de l'ovaire, les tumeurs à cellules transitionnelles ou de Brenner sont retrouvées. Ces dernières sont formées de cellules ayant l'aspect des cellules qui recouvrent la paroi interne de la vessie urinaire. Lorsqu'elles sont bénignes, elles sont majoritairement unilatérales, alors qu'elles sont bilatérales dans 10% des cas de tumeurs malignes [6].

1.8.3 Les grades (G0-G3)

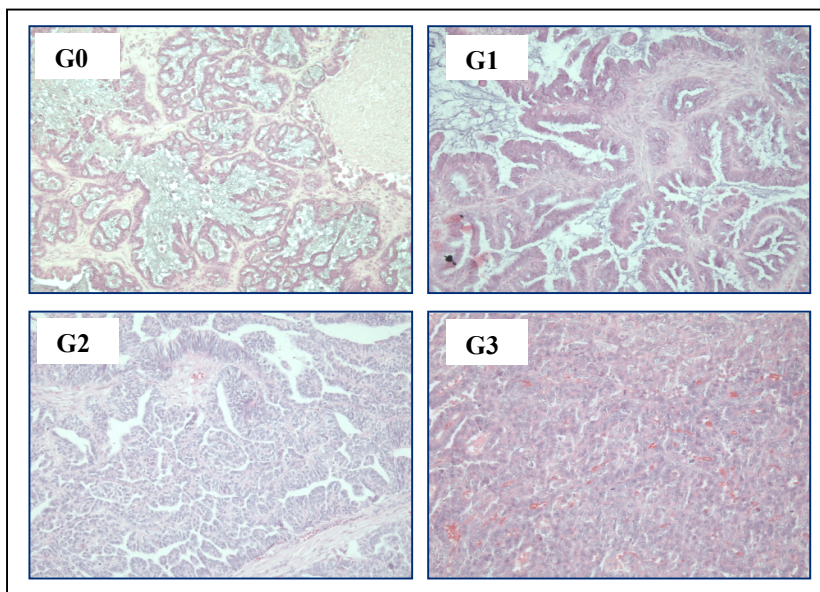


Figure 9 Coupes histologiques de tumeurs séreuses de grade 0 à 3

Les tumeurs épithéliales de l'ovaire doivent aussi être classées en fonction du grade (G), c'est-à-dire selon le degré de différenciation des cellules tumorales. Plusieurs systèmes de gradation des tumeurs ont été utilisés par les pathologistes, mais ces derniers occasionnaient beaucoup de problèmes au niveau de la reproductibilité et de la constance. Actuellement, un système universel de gradation a été mis en vigueur par la FIGO et cette méthode combine 3 facteurs indépendants. Il y a l'activité mitotique qui varie de 1 à 3, le polymorphisme nucléaire qui varie également de 1 à 3 et enfin l'architecture histologique (où 1= morphologie glandulaire prédominante, 2= papillaire, 3= solide). Ensuite, les scores sont additionnés, un résultat compris entre 3 et 5 correspond à un G1 (tumeur bien différenciée), un score de 6 ou 7 est équivalent à un G2 (tumeur modérément différenciée) et enfin, un résultat final de 8 ou 9 est égal à un G3 (tumeur pauvrement différenciée). Le grade G0, aussi appelé GB correspond aux tumeurs borderlines (Figure 9) [11, 29].

1.8.4 Les stades (I-IV)

Le cancer de l'ovaire peut emprunter plusieurs axes pour s'étendre. Lorsque la capsule de l'ovaire se rompt, les cellules tumorales peuvent se disperser dans la cavité péritonéale. Elles vont être amenées à suivre la circulation normale des fluides péritonéaux, pour ensuite s'implanter et grossir comme un nodule de surface. Ce mécanisme explique les tumeurs qui sont communément retrouvées dans la gouttière paracolique, le cul-de-sac de Douglas (repli du péritoine), sur la surface du petit et gros intestin, du grand épiploon, du foie, de l'intestin, ou sous le diaphragme (Figure 10). La voie lymphatique peut également être utilisée par les cellules tumorales. Ainsi les ganglions lymphatiques rétro-péritonéaux, pelviens et ceux de l'aîne (inguinaux) sont souvent touchés et peuvent servir de tremplin pour une invasion subséquente de d'autres régions de l'organisme. Enfin, la voie hématogène peut aussi être empruntée, mais cette voie de dissémination survient généralement dans les stades avancés de la maladie. Elle est la cause des métastases à distances (prolifération des cellules tumorales dans un foyer secondaire) au foie, aux poumons, à la plèvre et au cerveau [30].

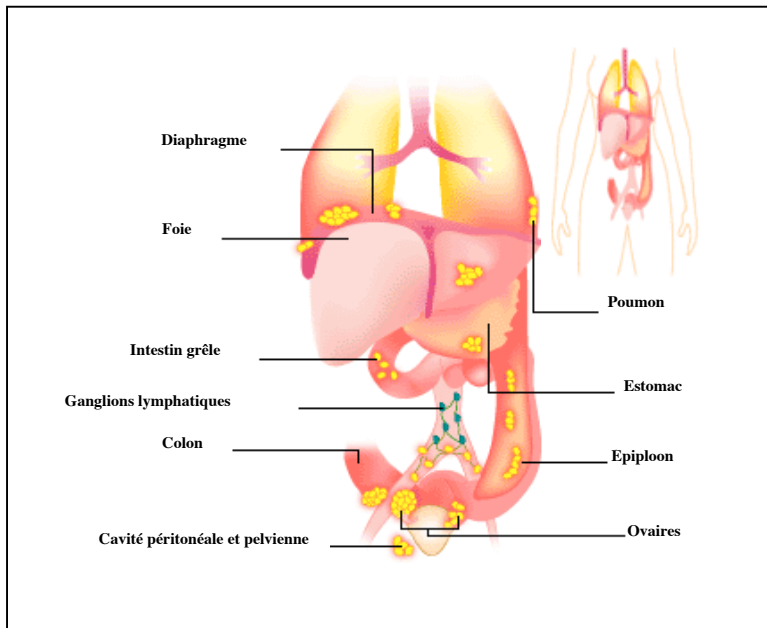


Figure 10 Patron de dissémination du cancer épithélial de l’ovaire (adaptée de [http://www.cancerfacts.com/GeneralContent/Ovarian/Gen_Diagnosis.asp?CB=9])

La stadification du cancer de l’ovaire est basée sur l’étendue de la maladie et a été développée par la FIGO (Tableau 1). Au stade I, la tumeur est limitée aux ovaires, tandis qu’au stade II, il y a en plus extension de la maladie à la cavité pelvienne. Un stade III est caractérisé par la présence de métastases péritonéales et aux ganglions lymphatiques, alors qu’un stade IV indique qu’il y a présence de métastases à distance.

Cette stadification requiert une vaste évaluation chirurgicale faite par un gynécologue oncologue d’expérience. Afin qu’elle soit le plus appropriée possible, la FIGO demande de procéder à une inspection et une palpation de toutes les surfaces péritonéales, à des lavages péritonéaux, à une hystérectomie totale (ablation de l’utérus), à une salpingo-ovariectomie bilatérale (ablation des ovaires et des trompes de Fallope), à une omentectomie (ablation du grand épiploon), à la prise de biopsies péritonéales de toutes les lésions ou métastases suspectées et à la prise de biopsies péritonéales aléatoires en absence de lésion macroscopique. De plus, en présence de métastases péritonéales plus petites que 2 cm, un prélèvement des ganglions lymphatiques régionaux est de mise. Enfin, la prise d’une radiographie et des tests de fonctionnement du foie sont recommandés pour évaluer s’il y a présence ou non d’épanchement pleural et/ou de métastases hépatiques [11].

Stade	Descriptions et caractéristiques
I	La tumeur est confinée aux ovaires
IA	La tumeur est limitée à un seul ovaire, la capsule est intacte, absence de tumeur à la surface de l'ovaire, absence de cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
IB	La tumeur est limitée aux deux ovaires, les capsules sont intactes, absence de tumeur à la surface des ovaires, aucune cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
IC	La tumeur est limitée à un ovaire ou aux deux ovaires en plus de présenter une des caractéristiques suivantes: capsule rompue, présence de tumeur à la surface de l'ovaire, présence de cellules malignes dans l'ascite ou le lavement péritonéal
II	La tumeur est sur un ou les deux ovaires, en plus d'avoir des extensions tumorales dans la cavité pelvienne
IIA	Extensions et/ou implants à l'utérus et/ou aux trompes de Fallope, absence de cellule maligne dans l'ascite et le lavement péritonéal
IIB	Extensions et/ou implants sur d'autres tissus pelviens, absence de cellule maligne dans l'ascite et le lavement péritonéal
IIC	Extensions et/ou implants présents sur des tissus pelviens, en plus de la présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
III	La tumeur est présente sur un ou les deux ovaires avec métastases péritonéales microscopiques confirmées à l'extérieur de la région pelvienne et/ou métastases aux ganglions proximaux
IIIA	Métastases péritonéales microscopiques à l'extérieur de la région pelvienne
IIIB	Métastases péritonéales macroscopiques à l'extérieur de la région pelvienne mesurant 2 cm ou moins
IIIC	Métastases péritonéales à l'extérieur de la région pelvienne mesurant plus de 2 cm et/ou présence de métastases sur les ganglions lymphatiques proximaux
IV	Métastases à distance, soit à l'extérieur de la cavité péritonéale (foie, poumons)

Tableau I Stadification du cancer épithélial de l'ovaire (adapté de [14])

1.9 L'origine du cancer épithélial de l'ovaire

Plusieurs hypothèses ont été décrites dans la littérature à propos des événements déclencheurs causant le cancer de l'ovaire. L'épithélium de surface des ovaires de même que ses invaginations et ses kystes d'inclusion, les tumeurs bénignes, l'endométriose ainsi que les trompes de Fallope ont été pointés du doigt comme étant à la source même du développement du cancer épithélial de l'ovaire.

1.9.1 L'hypothèse de l'origine épithéliale

Il est généralement accepté que l'OSE serait à l'origine des cancers de l'ovaire puisqu'en fait, 90% des tumeurs ovariennes malignes dérivent de l'épithélium. Au cours de la progression néoplasique, cette simple couche épithéliale subie des changements de différenciation qui résultent en la perte des caractéristiques stromales et en l'acquisition de caractéristiques de l'épithélium des canaux de Müller. Rappelons que les canaux de Müller sont à l'origine des trompes de Fallope, de l'endomètre et du col de l'utérus et sont ainsi directement impliqués dans la classification des différents types histopathologiques qui ont été décrits à la section 1.8.2 [11, 31, 32].

Il a aussi été suggéré que l'habilité de l'OSE à sécréter des enzymes protéolytiques, des facteurs de croissance, des cytokines et à remodeler le cortex ovarien après l'ovulation pourrait contribuer à la formation des structures papillaires qui sont caractéristiques des tumeurs ovariennes. Durant ce processus normal de réparation, les cellules de l'OSE subiraient une transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT). Plusieurs évidences mettent donc en cause l'ovulation, puisque chaque fois qu'un ovule est expulsé, l'épithélium de surface de l'ovaire doit être réparé et remodelé, ce qui peut avec le temps mener à des aberrations génétiques et donc au développement d'un cancer. Par ailleurs, il arrive plus souvent que des lésions malignes soient décelées dans les invaginations de l'OSE et dans les kystes d'inclusion qu'au niveau de l'OSE se trouvant face à la cavité pelvienne. Ces endroits expriment des marqueurs épithéliaux tels que le CA125, la E-cadhérine et constitueraient un microenvironnement particulier pour le développement néoplasique [11, 31, 32].

1.9.2 L'hypothèse d'un continuum entre les tumeurs BOV, LMP et TOV

Un sujet très controversé dans le domaine du cancer de l'ovaire est de savoir si les tumeurs bénignes, borderlines et invasives sont en fait des étapes de progression du cancer de l'ovaire suivant un continuum, ou si elles sont tout simplement des entités qui surviennent de façons distinctes.

Des analyses moléculaires et protéiques de tumeurs suggèrent deux pathogénèses différentes, principalement pour les tumeurs séreuses. Il y aurait les tumeurs malignes de haut-grade (G2-3) qui se développeraient selon des mécanismes encore inconnus et les tumeurs de bas-grades (G1) qui se développeraient suite à des lésions bénignes qui progressent ensuite en tumeurs LMP. Des analyses de gènes individuels ont montré que des mutations KRAS et BRAF (des membres de la voie de signalisation de ERK/MAP Kinase) sont rarement (0-12%) détectées dans les carcinomes invasifs séreux de haut-grade, alors qu'elles sont présentes dans 30-50% des tumeurs LMP séreuses, dans les carcinomes séreux de bas-grade et souvent dans les tumeurs bénignes séreuses [33, 34]. De plus, le gène p53 est muté dans 50-80% des carcinomes invasifs de haut-grade, mais rarement dans les LMP. De même pour HER2 et AKT qui sont surexprimés dans respectivement 20-67% et 12-30% des carcinomes de haut-grade, mais que très rarement dans les carcinomes de bas-grade et les tumeurs LMP. Les tumeurs borderlines possèdent également une incidence moins fréquente de mutations BRCA1 et BRCA2. Tout ceci suggère donc une origine moléculaire différente [17].

Il a été montré dans la littérature que l'endométriose serait un signe précurseur des cancers ovariens et en particulier des tumeurs endométrioïdes et à cellules claires. En effet, 28% des tumeurs endométrioïdes et 49% des tumeurs à cellules claires sont associées avec l'endométriose ovarienne, comparativement aux tumeurs séreuses (3%) et mucineuses (4%) [32].

Quant aux tumeurs mucineuses, elles semblent plutôt se développer en suivant un continuum, c'est-à-dire à partir d'une tumeur bénigne, pour devenir ensuite une tumeur LMP et enfin une tumeur TOV. Plusieurs analyses ont aussi montré pour ce type de cancer, que les mutations de KRAS sont similaires (30-80%) chez les BOV, les LMP et les TOV [33, 35].

1.9.3 L'hypothèse de l'origine des trompes de Fallope

Considérant les risques élevés pour les femmes porteuses de mutations BRCA1/2 de développer un cancer de l'ovaire, l'utilisation récente de la salpingo-ovariectomie bilatérale (ablation des deux ovaires et des deux trompes de Fallope) prophylactique ou de prévention est souvent recommandée pour diminuer leur risque. Les ovaires et les trompes utérines retirés lors des chirurgies prophylactiques sont très bien examinés pour déceler toute anomalie. Ils ont été et le sont encore, des échantillons uniques permettant d'observer les événements précoces de la carcinogénèse, ce qui est un avantage rare puisque les cancers sporadiques (non-génétiques) sont souvent diagnostiqués à des stades avancés de la maladie. À la fin des années 1990, des études ont montré la présence de petites lésions précancéreuses au niveau des trompes de Fallope retirées par chirurgie prophylactique chez les femmes porteuses de mutations BRCA. Par ailleurs, la région distale des trompes utérines (le pavillon), soit la région qui est à proximité des ovaires, semble être le site d'initiation. Finalement, beaucoup de travail reste à faire pour confirmer cette hypothèse, mais les premiers résultats nous laissent croire que le cancer de l'ovaire pourrait dériver des trompes utérines surtout en présence de mutations BRCA [33, 36, 37].

1.10 Au niveau clinique

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus létal, environ 60% des femmes en meurent dans les 5 années suivant leur diagnostic. Cela est dû entre autre au fait que 70% des femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire sont diagnostiquées à un stade avancé de la maladie (III-IV) [14].

1.10.1 Le dépistage

Connaissant le côté sombre du cancer de l'ovaire, il ne faut pas se cacher que le facteur clé pour le traitement de la maladie est la détection du cancer à un stade précoce. Ainsi un programme de dépistage adopté à l'ensemble de la population féminine serait nécessaire. Cependant, pour l'instant, aucun marqueur et aucune combinaison de marqueurs n'est assez sensible et spécifique pour diagnostiquer le cancer de l'ovaire à grande échelle. Ainsi,

l'unique outil de dépistage actuel est l'examen gynécologique chez les femmes consultant leur médecin de façon périodique, bien que les tumeurs peuvent aussi passer inaperçues.

1.10.2 Les symptômes

À des stades précoces, le cancer de l'ovaire ne produit généralement pas de signes et symptômes spécifiques qui vont alerter le clinicien. Les symptômes sont plutôt vagues et se traduisent souvent par de la douleur ou de la pression abdominale, de l'inconfort, des menstruations irrégulières, des troubles digestifs, un besoin plus fréquent d'uriner, des flatulences, une fatigue constante, de la douleur dans le bas du dos, etc. Puis, plus la maladie progresse, plus les patientes présentent des symptômes associés à l'ascite, à l'épiploon ou aux intestins, comme des gonflements, des distensions abdominales, de la constipation, des nausées, de l'anorexie ou de la satiété précoce [11, 14].

1.10.3 Les signes

Le signe le plus éloquent d'un carcinome (tumeur maligne) ovarien est la présence d'une masse pelvienne lors de l'examen physique. Une masse pelvienne solide, irrégulière, fixe, nodulaire et bilatérale est généralement signe de tumeur ovarienne maligne. Dans les cas avancés, l'ascite et la taille de la tumeur vont causer des gonflement et tensions abdominales. Les distensions peuvent également être causées par l'obstruction des intestins et/ou par une infiltration maligne de l'épiploon (qui correspond à deux feuillets de péritoine accolés reliant deux viscères entre eux). Dû aux métastases, les ganglions inguinaux, axillaires et supra-claviculaires peuvent augmenter de taille. L'épanchement pleural qui accompagne souvent la présence d'ascite, l'émaciation (amaigrissement très prononcé) et des œdèmes au niveau des membres inférieurs sont aussi des signes à considérer par le clinicien [11].

1.10.4 Le diagnostic

Le médecin doit tout d'abord interroger la patiente sur son état de santé ainsi que sur ses antécédents médicaux personnels et familiaux. Il s'en suit un examen physique complet, incluant un examen mammaire, gynécologique et rectal. Le médecin peut même prélever des frottis vaginaux. Avant la chirurgie, une radiographie au niveau des poumons devrait être réalisée pour déterminer la présence ou non de métastases pulmonaires et pleurales, alors qu'une tomodensitométrie (CT scan) de l'abdomen et de la région pelvienne permet d'obtenir l'image de la tumeur et d'en vérifier son étendue. Le médecin peut également effectuer une échographie transvaginale, qui consiste à l'insertion d'une petite sonde dans le vagin pour vérifier par des ondes sonores la présence de zones sombres ou denses (signe de cancer) au niveau du vagin, de l'utérus, des trompes de Fallope ou des ovaires [14]. Si le médecin suspecte un cancer des ovaires, il peut aller prélever des échantillons de tissus (biopsies) ou de fluides, soit par laparoscopie ou par laparotomie. La laparoscopie est une opération qui permet l'examen de l'abdomen et la prise de biopsies. Sous anesthésie générale, un tube étroit muni d'une lumière et d'une caméra est introduit par une petite incision au niveau du nombril et une insufflation de CO₂ peut également être effectuée pour permettre une meilleure visibilité. La laparotomie se déroule aussi sous anesthésie générale, mais consiste plutôt en une incision dans l'abdomen et est plus invasive que la laparoscopie. De plus, un lavement baryté (exploration radiologique du colon et du rectum) ou une coloscopie (examen visuel de l'intérieur du rectum et du côlon) est possible dans le but de déceler des métastases, mais aussi afin d'éliminer la possibilité d'un cancer primaire au niveau des intestins [14]. Des tests d'analyses sanguines peuvent aussi être réalisés. À partir des échantillons sanguins, il est possible de vérifier la quantité et l'apparence des différentes cellules sanguines, en plus d'évaluer le fonctionnement des différents organes. Il est également important de vérifier s'il y a présence de marqueurs tumoraux (antigènes ou protéines sécrétés par la tumeur), tel que le CA125.

Le CA125 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire de type mucine. Cet antigène ou marqueur de différenciation épithélial dérive de l'épithélium cœlomique, mais n'est habituellement pas exprimé à la surface des ovaires. Son expression signifie que l'OSE a réacquis les compétences de l'épithélium cœlomique pour se différencier dans des conditions pathologiques [7]. Le CA125 est l'unique marqueur actuellement utilisé en clinique. Des études ont montré qu'un taux élevé de CA125 est plus fréquent chez les

femmes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire (82%) que chez les autres femmes (1%) [38]. Malgré cela, son application est plutôt limitée au suivi du traitement et à la rechute de la maladie en raison de son manque de sensibilité et de spécificité. En effet, 25% des femmes ayant un cancer de l'ovaire ne présentent pas un taux de CA125 élevé, leur taux de CA125 étant plus bas que la limite établie à 35 U/mL. Par ailleurs, 6% des patientes atteintes de tumeurs bénignes ont un CA125 sanguin élevé, alors que 29% des patientes sans cancer de l'ovaire ou sans pathologies gynécologiques présentent un taux de CA125 élevé, ce qui n'est pas négligeable. De plus, durant les menstruations, le premier trimestre chez les femmes enceintes et après l'accouchement, le niveau de CA125 est plus élevé que la normale. Il est également connu que plusieurs autres conditions pathologiques peuvent augmenter le taux de CA125 telles que l'endométriose, le léiomyome utérin (tumeur bénigne) et certaines maladies du foie et des poumons [11, 39].

1.10.5 Les traitements : la chirurgie et la chimiothérapie

Chez les jeunes femmes porteuses de tumeurs bénignes qui désirent conserver leur fertilité, l'ablation du kyste avec la préservation des ovaires est possible par laparoscopie si celui-ci est inférieur à 8-10 cm, la laparotomie étant plutôt choisie dans le cas contraire. Chez les patientes plus âgées, l'ablation d'un ou des ovaires atteints peut être pratiquée [19].

Les femmes atteintes d'une tumeur borderline sont généralement plus jeunes que celles atteintes de tumeurs invasives, l'âge moyen étant de 38 ans. La préservation de la fertilité est donc souvent importante pour elles. Puisque ces tumeurs offrent un pronostic très favorable aux patientes, le traitement est devenu plus conservateur. Une salpingo-ovariectomie unilatérale (ablation d'un des 2 ovaires et d'une des 2 trompes de Fallope) peut ainsi être réalisée si un seul des deux ovaires semble atteint. Il est cependant très important que l'ovaire controlatéral soit bien inspecté et qu'une stadification chirurgicale soit bien exercée pour déceler toutes anomalies possibles. Dans le cas où les deux ovaires sont atteints, une ovariectomie partielle peut être considérée si la femme désire conserver sa fertilité. Sinon, une hystérectomie totale (ablation de l'utérus) et une salpingo-ovariectomie bilatérale sont recommandées. Si la chirurgie a été optimale et si la tumeur LMP est de stade précoce (I-II), la chimiothérapie n'est pas nécessaire et une approche de surveillance

est plutôt exercée. Elle est par contre recommandée dans les stades avancés ou en présence d'implants invasifs.

Une salpingo-ovariectomie bilatérale prophylactique (ou de prévention) peut être réalisée chez les patientes ayant complété leur désir de fertilité qui présentent des mutations BRCA1/2 et une histoire familiale de cancer du sein, de l'ovaire, du colon ou de l'endomètre [11].

La conduite chirurgicale standard en présence d'un cancer de l'ovaire de stade I-II est l'hystérectomie totale, une salpingo-ovariectomie bilatérale, une omentectomie (ablation du grand épiploon), une lymphadénectomie (ablation des ganglions lymphatiques) et la prise de biopsies péritonéales multiples par laparotomie. Selon la FIGO, toutes les patientes atteintes d'une tumeur de stade II devraient recevoir un traitement adjuvant de chimiothérapie [11, 14].

Dans les cas de cancers ovariens avancés (stade III-IV), le traitement chirurgical initial est la cytoréduction optimale, auquel s'ajoute la stadification chirurgicale complète par laparotomie, une lymphadénectomie, la prise de biopsies et un traitement de chimiothérapie [14]. La cytoréduction chirurgicale est considérée comme optimale si la maladie résiduelle mesurable après la chirurgie est plus petite que 1-2 cm [30]. Un traitement de chimiothérapie adjuvant standard pour le cancer de l'ovaire correspond à une combinaison d'agents de la catégorie des taxanes, tel que le paclitaxel ou le docetaxel, en plus d'agents de la catégorie des platines comme le carboplatine ou le cisplatine. Les taxanes ont un effet stabilisateur sur les microtubules cellulaires. Cela empêche leur réorganisation et inhibe ainsi le déroulement de la mitose (division cellulaire), ce qui conduit à la mort cellulaire. Les platines sont plutôt des agents alkylants de l'ADN. Ils empêchent les brins d'ADN de se séparer, ce qui prévient la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire. Les patientes qui ne sont pas éligibles à une première chirurgie de cytoréduction devraient également recevoir ce traitement de chimiothérapie pour tenter de faire diminuer le volume tumoral avant de pouvoir essayer d'effectuer une chirurgie [14]. Finalement, dans les cas de cancers avancés, un traitement de chimiothérapie par voie intra-péritonéale plutôt que veineuse peut être choisi. Plusieurs études ont montré un avantage d'utiliser cette voie d'administration, puisqu'en fait la tumeur est exposée directement à des plus fortes concentrations d'agents chimiothérapeutiques qu'une thérapie systémique. Cependant, cette

voie d'administration reste controversée car elle cause plus de complications et est associée à une plus grande toxicité, ce qui affecte nettement la qualité de vie des patientes [40-42].

1.10.6 Le suivi des patientes et la progression de la maladie

En général, durant la première année suivant les traitements, les patientes devraient être vues par leur médecin tous les trois mois. Puis, tous les quatre à six mois les années suivantes et ensuite une fois par an après la cinquième année. À chaque rencontre, l'histoire clinique de la patiente devrait être révisée et un examen physique complet (palpation mammaire, pelvienne et rectale) devrait être minutieusement effectué. De plus, une analyse sanguine du marqueur CA125 devrait être faite à intervalles réguliers, puisqu'une augmentation du niveau sanguin est souvent signe d'une récurrence de la maladie ou d'un traitement inefficace. Des tests par imagerie peuvent également être pratiqués si une masse est suspectée. Une échographie transvaginale ou pelvienne, un CT scan (tomodensitométrie), un PET scan (tomographie par émissions de positrons) ou même l'imagerie par résonance magnétique peuvent être requis [11, 14].

Malheureusement, la majorité des patientes traitées pour un cancer épithélial de l'ovaire avancé vont rechuter. En effet, seulement 10-15% des patientes diagnostiquées à des stades avancés de la maladie vont compléter leur traitement et y répondre entièrement [43]. Le cancer de l'ovaire est connu pour réapparaître au niveau de la cavité péritonéale sous forme de carcinomes (métastases) diffusés et au niveau de l'apex vaginal sous forme de petites masses pelviennes [11]. Un cancer ovarien récurrent signifie que la tumeur est réapparue à la suite d'une réponse initiale complète à la chimiothérapie de première ligne. Une maladie résistante est diagnostiquée lorsque la tumeur réapparaît avant 6 mois, alors qu'elle est plutôt considérée comme sensible lorsque la tumeur réapparaît après 6 mois. Une maladie persistante est caractérisée par une tumeur qui répond partiellement à une thérapie initiale alors qu'il y a élévation du CA125 sanguin. Une maladie réfractaire ou progressive signifie que la tumeur progresse durant la phase initiale de la thérapie [30]. Lorsque la maladie persiste ou progresse, un traitement de chimiothérapie de deuxième ligne qui consiste toujours en la combinaison d'agents taxanes et platines peut être offert. Il est aussi possible pour les patientes dites réfractaires de s'inscrire dans des essais cliniques, ou de tenter l'essai d'agents de chimiothérapie différents tels que le topotécan, la gemcitabine,

l'étoposide ou la doxorubicine liposomale [14, 43]. Les traitements de deuxième ligne ne sont pas curatifs, ils ont pour principal but de tenter un meilleur contrôle de la maladie, afin d'améliorer la qualité de vie des patientes.

1.10.7 Les facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques permettent de prédire l'évolution de la maladie et donc assurent une meilleure prise en charge des patientes. Les patientes atteintes de tumeurs LMP ont un excellent pronostic avec une survie à 5 ans de 95%. Un stade précoce de la maladie, une histopathologie séreuse et un jeune âge lors du diagnostic sont associés avec un meilleur pronostic [14].

En plus du stade, le grade est aussi un facteur de pronostic important. En fait, la survie à 5 ans des patientes est de 90% en présence d'une tumeur de grade 1, de 85% pour un grade 2, et de 45% pour un grade 3. Le nombre de chromosome d'une cellule est également un facteur pronostique, puisqu'une patiente atteinte d'une tumeur aneuploïde (ayant un nombre anormal de chromosome) a une survie à 5 ans plus faible qu'une patiente atteinte d'une tumeur diploïde (ayant un nombre normal de chromosome). La maladie résiduelle après la cytoréduction chirurgicale est aussi un facteur de pronostic très important, puisqu'elle est inversement proportionnelle à la survie des patientes [11].

Dans les cas plus avancés, plusieurs facteurs influencent le pronostic des patientes. Les plus favorables étant un jeune âge, un bon état physique, une histopathologie autre que mucineuse et à cellules claires, un stade précoce, une tumeur bien différenciée, l'absence d'ascite, et une maladie résiduelle faible à la suite de la cytoréduction chirurgicale [11].

1.11 Les modèles d'étude

Afin d'étudier cette maladie complexe, plusieurs modèles sont disponibles. Tout d'abord, il y a le tissu ovarien sain ou tumoral qui provient de la patiente subissant une chirurgie. C'est le modèle le plus près du cancer de l'ovaire. Il demeure cependant impossible d'y introduire du matériel génétique et les applications associées au tissu original sont plutôt restreintes à l'extraction de matériels biologiques tels que l'ARN, l'ADN et/ou les

protéines. Par contre, la mise en paraffine ou en O.C.T. (optimal cutting temperature) permet, entre autre, d'effectuer des coupes histologiques ou des microétalages de tissus. Avec ce matériel, il est par exemple possible de réaliser des colorations pour identifier certaines structures, ou d'opter pour une technique d'immunohistochimie afin de localiser différentes protéines ou d'évaluer leur expression.

Un nouveau modèle a donc été développé afin de permettre la multiplication des cellules tumorales : les cultures primaires. Elles sont établies suite au grattage du tissu tumoral ou par la digestion de celui-ci en utilisant des collagénases [44, 45]. Bien que composées de cellules épithéliales tumorales, les cultures primaires ne sont pas immortelles et peuvent être utilisées que pour une courte période de temps (quelques passages), limitant ainsi un bon nombre d'expérimentation.

Lorsqu'une culture primaire persiste toujours après une cinquantaine de passages, cela signifie qu'elle est immortalisée et ce modèle est alors appelé lignée cellulaire. Ces lignées peuvent être dérivées de tumeurs solides ou des cellules tumorales présentes dans l'ascite. Plusieurs lignées cellulaires de différentes histopathologies et provenant de patientes n'ayant pas subi de chimiothérapie avant la chirurgie ont été établies et caractérisées au laboratoire [46, 47]. Ces lignées cellulaires sont très représentatives de la tumeur d'origine, excepté le fait que le microenvironnement original de la tumeur n'est plus présent [48]. Les avantages sont cependant nombreux, puisque compte tenu de leur immortalisation, les lignées cellulaires peuvent être utilisées sur de longues périodes et peuvent même subir des manipulations génétiques, contrairement aux deux modèles précédents.

Toujours dans le but de reproduire le plus possible l'environnement original des tumeurs, un modèle de culture cellulaire en trois dimensions a été développé au laboratoire. En fait, lorsqu'elles sont mises en culture sous forme de gouttelettes inversées, les cellules sont généralement capables de former des sphéroïdes qui permettent des interactions cellules-cellules plus complexes [49].

Finalement, le modèle des xénogreffes est également employé. L'injection de lignées cellulaires du cancer de l'ovaire chez les souris immunodéficientes permet généralement la formation de tumeurs dans un microenvironnement qui se rapproche de celui rencontré chez l'humain, bien que le système immunitaire est absent chez ces souris, ce qui rend possible les xénogreffes [46, 47].

Malgré tous ces modèles, il est évident que beaucoup de travail reste à faire afin de découvrir de nouveaux marqueurs de dépistage, de diagnostic et de pronostic sensibles et spécifiques pour ainsi mieux traiter les femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Comme il a été mentionné précédemment, les tumeurs TOV ont un pronostic beaucoup moins bon que les tumeurs LMP. Il est donc important de mieux comprendre ce qui peut les différencier au point de vue moléculaire. Dans notre laboratoire, des études de micropuces à ADN ont été réalisées en vue d'identifier des gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs LMP et TOV. Suite à une analyse statistique de type SAM (Significant Analysis of Microarrays, [50]) sur la micropuce à ADN U133 (Affymetrix, Inc.), 206 gènes sont ressortis comme étant différentiellement exprimés entre les tumeurs séreuses LMP (ARN de 5 échantillons de tissus) et les tumeurs séreuses TOV (ARN de 10 échantillons de tissus). La disponibilité des anticorps commerciaux et le rôle biologique de chacun de ses gènes ont été considérés dans le choix du candidat. Ainsi, mon projet de maîtrise a entièrement été consacré à la caractérisation d'un gène qui ressortait comme étant surexprimé dans les tumeurs à faible potentiel de malignité comparativement aux tumeurs invasives (Figure 11). Il s'agit d'un des membres de la superfamille des serpins, soit la SERPINA1.

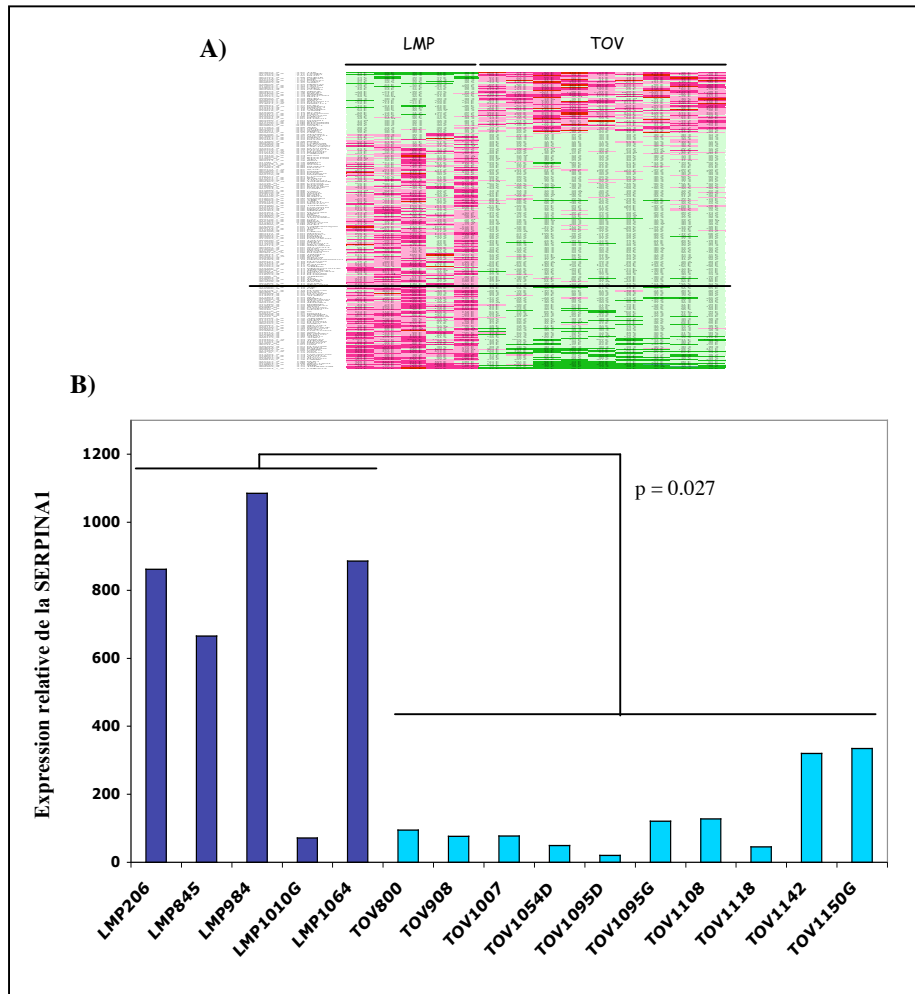


Figure 11 Résultats préliminaires de la micropuce à ADN U133

A) Expression des 206 gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs LMP et TOV. Chaque rangée correspond à un gène différent et chaque colonne à un échantillon. Les gènes surexprimés sont représentés en rose, alors que ceux sous-exprimés sont plutôt en vert.

B) Expression de la SERPINA1 sur la micropuce

III La superfamille des serpins

Environ 500 protéines de la famille des serpins ont été identifiées jusqu'à maintenant [51]. Les serpins sont largement distribués parmi les eucaryotes et chez quelques virus qui les infectent. Même si elles ne se retrouvent pas chez les champignons et les chlorophytes (algues vertes), elles sont rencontrées chez les plantes supérieures (vasculaires) et chez les procaryotes. Les serpins peuvent être extracellulaires, intracellulaires (surtout la classe B) ou les deux à la fois. Les serpins intracellulaires sont généralement trouvés au niveau du cytoplasme, mais peuvent aussi être présentes dans le compartiment nucléaire [52].

Chez l'humain, 34 serpins ont été répertoriés et elles sont regroupées en 9 classes, de A à I. Serpins signifie inhibiteurs de sérines protéases (serine protease inhibitors). Cette appellation fut donnée à l'origine à cette famille de protéine, car la majorité des serpins alors identifiées inhibaient les sérines protéases. Au cours des dernières années, quelques exceptions ont été découvertes. Chez l'humain, des membres de cette superfamille inhibent aussi des cystéines protéases et environ 7 membres ne possèdent aucune activité inhibitrice connue (tels que A6, A7, A8, F1, H1 et H2) [53]. La classe A est composée de 10 membres (A1 à A10), la classe B de 14 membres et les autres classes regroupent 1 à 2 membres.

Elles sont impliquées entre autre dans les processus de coagulation sanguine, dans la fibrinolyse (destruction physiologique du caillot de fibrine), l'activation du complément, l'apoptose, l'angiogénèse, le développement, la suppression des tumeurs et l'inflammation [51, 52].

1.12 La structure des serpins

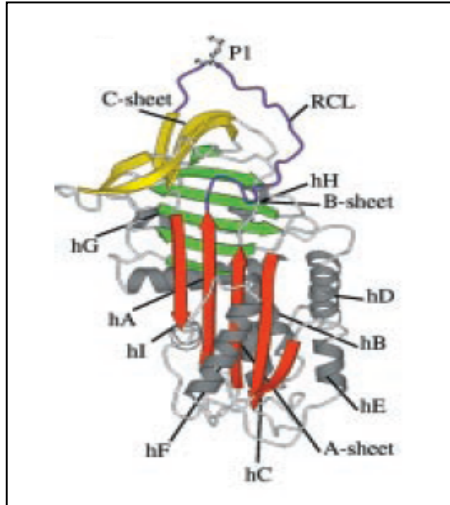


Figure 12 Structure native d'un des membres de la famille des serpins, la SERPINA1 (tirée de [53], le feuillet- β A est coloré en rouge, le B en vert, le C en jaune et le RCL en mauve.)

Ces protéines sont composées d'environ 350-500 acides aminés. La structure protéique des serpins est caractérisée par 3 feuillets- β (A-C) et par environ 7-9 hélices- α (hA-hI) (Figure 12). Une autre caractéristique des protéines de la famille des serpins est la présence d'un RCL (reactive center loop). Il s'agit d'une boucle catalytique contenant environ 17-20 acides aminés, attachée entre le feuillet- β C et A, située dans la région C-terminale de la protéine et qui est responsable de l'interaction avec les protéases [51, 53].

1.13 Le mécanisme d'inhibition des protéases

Les membres de la famille des serpins sont aussi appelés les inhibiteurs suicidaires de substrat. En effet, ils inhibent les protéases de façon irréversible, définitive. Deux produits de réaction peuvent être générés par cette inhibition, soit un complexe covalent (1 :1) serpin-protéase, soit une serpin clivée inactive (Figure 13) [51]. Tout d'abord, la protéase va reconnaître le RCL de la serpin, et plus particulièrement 2 résidus soit P1 et P1' qui constituent le site de clivage du RCL ou le substrat de la protéase. En fait ce sont ces deux résidus qui confèrent la spécificité des protéases pour chacune des serpins. Ensuite, il y a formation d'un complexe non-covalent de type Michaelis (reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat) entre la protéase et la serpin. Lorsque le processus d'inhibition est efficace, le

RCL est clivé et ce dernier s'insère au niveau du feuillet- β A, alors que la protéase est transférée au pôle opposé de la molécule. Il se forme ainsi un lien covalent (complexe stable) entre la protéase et la serpin. Ceci est irréversible et la protéase est assez déformée. Au contraire, lorsque l'insertion du RCL dans le feuillet- β A est compromise, la serpin est clivée, ce qui provoque le relâchement de la protéase qui est toujours active [51-54].

Le processus d'inhibition utilisé par les serpins est donc peu commun, puisque les autres classes d'inhibiteurs de protéases utilisent plutôt des associations non-covalentes et donc réversibles, sans changement de conformation de type clé et serrure [52].

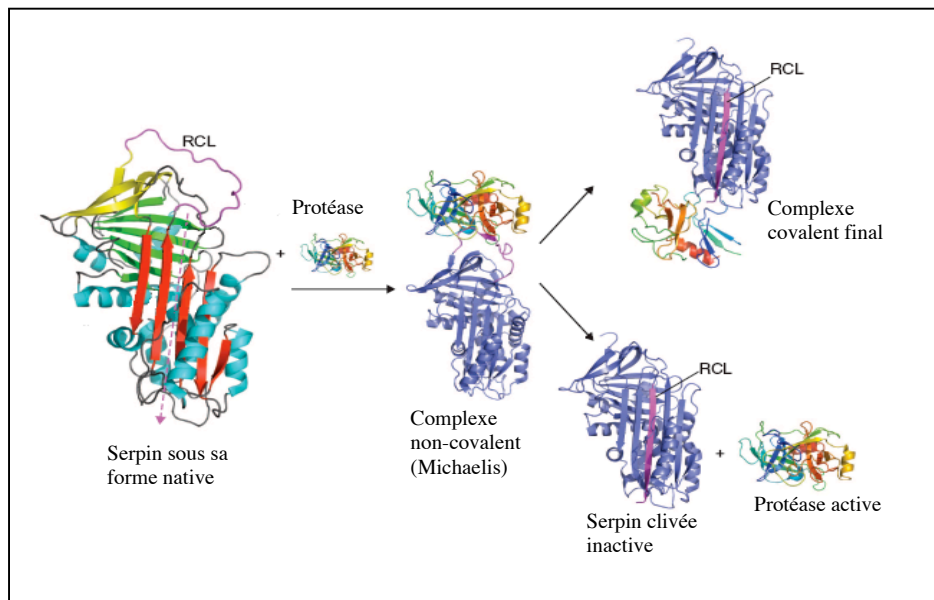


Figure 13 Mécanisme d'inhibition des serpins (adaptée de [54])

Le feuillet- β A est coloré en rouge, le B en vert et le C en jaune. Les hélices- α sont en turquoise et le RCL est représenté en mauve.

1.14 La SERPINA1

La première serpin à avoir été découverte est la SERPINA1. Cette dernière est aussi appelée α 1-antitrypsin, AAT, α 1AT, α 1-proteinase inhibitor, α 1PI, anti-elastase, protease inhibitor 1, PI1. Le gène (PI) de la SERPINA1 est situé sur le bras long du chromosome 14 (14q32.1).

1.14.1 La structure de la SERPINA1

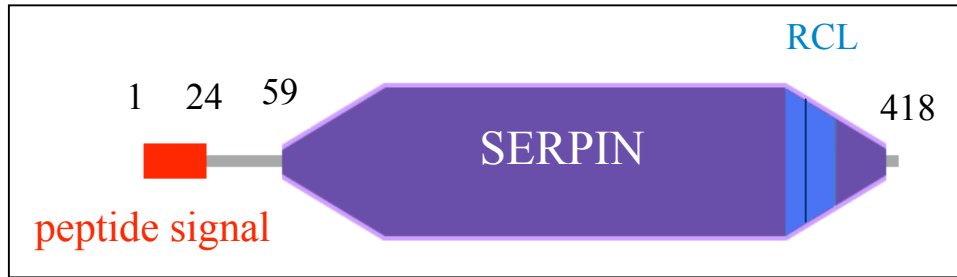


Figure 14 Représentation schématique de la SERPINA1

(adaptée de [http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl])

La SERPINA1 est une glycoprotéine extracellulaire d'environ 52 kDa ayant une demi-vie de 3 à 5 jours dans le plasma sanguin [55, 56]. Elle est constituée de 418 acides aminés (Figure 14). Sa structure détaillée est présentée à la Figure 12. Elle comprend 2 principaux domaines : un peptide signal (acides aminés 1-24) en N-terminal puisque c'est une protéine sécrétée, et un motif serpin commun à toute la superfamille. C'est en C-terminal de ce dernier domaine que se retrouve le RCL (position 368-392, le site catalytique correspond aux acides aminés 382-383) qui est responsable du processus d'inhibition des protéases.

1.14.2 Les cellules sécrétrices

La SERPINA1 est synthétisée principalement dans le foie par les hépatocytes (> 95% de la production). Cependant, d'autres types cellulaires peuvent également la produire en plus faible quantité, comme par exemple les monocytes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires. Dans des conditions normales, les monocytes seraient responsables de la production d'environ 1% de la quantité totale de SERPINA1, alors que les cellules alvéolaires d'environ 1.4% de la SERPINA1 produite par le foie [57].

Les serpins constituent environ 2% des protéines totales du plasma humain et 70% des serpins sont représentées par la SERPINA1 [51]. La concentration de SERPINA1 dans le plasma sanguin chez une personne saine est de 1-2 g/L et puisqu'il s'agit d'une protéine de phase aiguë, ce niveau peut augmenter durant des phénomènes inflammatoires ou de nécrose [52]. Le niveau de SERPINA1 plasmatique augmente ainsi dans les cas d'arthrite rhumatoïde, d'infection bactérienne, d'angéite (inflammation des vaisseaux) et de carcinomatose (nombreuses métastases). Il suivrait même les montées du niveau

d'œstrogène durant la puberté, la grossesse et la prise de médicaments contraceptifs [58]. La SERPINA1 est également retrouvée dans le lait maternel (0.1-0.4 g/L), surtout dans les 20 à 30 premiers jours d'allaitement pour ensuite diminuer. Il semble qu'elle jouerait un rôle dans la protection du lait contre les protéases, mais aussi en protégeant le tractus gastro-intestinal du nouveau-né [59].

1.14.3 Les cibles de la SERPINA1

La SERPINA1 est responsable de l'inhibition de plusieurs sérines protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine, la plasmine, la cathepsine G, la kallikréine, la protéinase 3, la rénine et l'élastase pancréatique [57, 58]. Brièvement, la trypsine et la chymotrypsine sont des enzymes digestives synthétisées par le pancréas. La thrombine et la plasmine ont un rôle dans la coagulation sanguine puisque la thrombine transforme le fibrinogène en fibrine, alors que la plasmine est capable de lyser rapidement un caillot de fibrine. La cathepsine G est une protéine granulaire du neutrophile qui joue un rôle dans l'inflammation et la coagulation sanguine avec la thrombine.

Cependant, le principal rôle de la SERPINA1 est de protéger les voies respiratoires de la destruction protéolytique par la neutrophile élastase [52].

1.14.3.1 *La trypsine*

Bien que la SERPINA1 porte aussi le nom de α 1-antitrysin, la trypsine n'est pas sa principale cible. Il est connu dans la littérature que la trypsine est surexprimée dans différents cancers tels que ceux de l'ovaire, de la prostate, des poumons, de l'estomac et du colon. Son expression est souvent associée à un mauvais pronostic [60]. En fait, la trypsine peut dégrader plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, particulièrement le collagène de type I des membranes basales, en plus d'activer les pro-formes d'autres protéases telles que les MMPs (matrix metalloproteinases). De plus, un groupe japonais a montré par une étude d'immunohistochimie que les tissus ovariens normaux et bénins étaient négatifs, alors que 20% des tumeurs LMP et 50% des TOV exprimaient la trypsine [61].

1.14.3.2 *La neutrophile élastase*

La neutrophile élastase, tout comme la cathepsine G et la protéinase 3 sont des enzymes contenues dans les granules azurophiles (primaires) des neutrophiles. Elles y sont emmagasinées jusqu'à ce que le neutrophile s'active et relâche ses granules en présence d'un stimulus inflammatoire. Ces trois protéases jouent entre autre un rôle de défense contre les champignons, les levures et les bactéries [62].

Dans environ 90% des cas, la neutrophile élastase est inhibée par la SERPINA1, mais elle peut également l'être par le SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor). La neutrophile élastase est une glycoprotéine de 29 kDa qui agit normalement à titre de protéase extracellulaire [56]. Il s'agit de la seule protéase neutre à pouvoir dégrader l'élastine insoluble, une composante des vaisseaux sanguins, de la peau, des poumons et du tissu mammaire. Elle peut également hydrolyser d'autres protéines de la matrice extracellulaire incluant la fibronectine, les protéoglycanes et le collagène de type IV [63, 64].

Des études ont montré la présence de neutrophile élastase dans des tumeurs provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein. Il est cependant difficile de se prononcer à savoir si les cellules cancéreuses elles-mêmes peuvent produire la neutrophile élastase, ou si la présence de cette protéase vient seulement de l'infiltration des neutrophiles dans le tissu tumoral. Malgré cette controverse, des études ont montré qu'une expression élevée de neutrophile élastase dans le tissu tumoral allait de pair avec un mauvais pronostic pour le cancer du sein et des poumons [63-65]. Une étude a même montré qu'un traitement à l'ONO-5046 (Sivelestat), un inhibiteur de la neutrophile élastase (Ono Pharmaceutical), arrêta complètement la croissance des tumeurs de la lignée cellulaire EBC-1 du cancer des poumons dans les souris SCID [63].

1.14.4 Les problèmes associés à une déficience en SERPINA1

Plus de 70 variantes naturelles de la SERPINA1 ont été décrites et caractérisées. Les 2 variantes de déficience les plus communes, S et Z, résultent de mutations ponctuelles dans le gène de la SERPINA1 comparativement à la forme normale (M). Les personnes porteuses de la forme S (Glu264Val) ne souffrent pas de pathologie clinique et sécrètent un niveau équivalent à 60% le niveau de SERPINA1 plasmatique de la forme normale M. Par

contre, la variante Z (Glu342Lys) qui a une incidence beaucoup plus faible que la forme S, est associée à une déficience plasmatique sévère. En fait, les individus homozygotes pour la mutation Z (ZZ) ont un niveau de SERPINA1 plasmatique équivalent à 10-15% de celui de la forme normale [66]. Cette déficience cause, chez les enfants et les jeunes adultes, des problèmes majeurs au niveau du foie et des poumons. La variante Z est assez rare, elle est retrouvée chez seulement 0.1% de la population. Une personne ayant un niveau sanguin de SERPINA1 plus faible ou égal à 11 $\mu\text{mol/L}$ est considérée comme étant déficiente en SERPINA1. L'unique traitement pour les personnes atteintes est une thérapie par voie intraveineuse consistant en de la SERPINA1 plasmatique purifiée [58].

1.14.4.1 L'emphysème chronique

La SERPINA1 doit être en quantité suffisante pour protéger nos voies respiratoires inférieures de la destruction par la neutrophile élastase. L'emphysème pulmonaire est la conséquence irréversible de la destruction des parois alvéolaires due à une perte d'inhibition de la dégradation de l'élastine par la neutrophile élastase en raison d'un manque de SERPINA1.

Ainsi, une déficience génétique en SERPINA1 est associée avec une prédisposition accrue à développer des maladies pulmonaires obstructives chroniques telles que l'emphysème, les risques étant encore plus élevés chez les fumeurs de cigarette. En fait, la fumée de cigarette active les neutrophiles et favorise donc la sécrétion de neutrophile élastase au niveau des voies respiratoires [57]. Il semblerait également que le résidu méthionine au site actif (P1) du RCL de la SERPINA1 serait vulnérable aux radicaux-libres présents dans la fumée de cigarette et à ceux relâchés par les cellules inflammatoires en réponse à cette fumée. Ainsi, lorsque le résidu méthionine serait oxydé, le taux d'affinité de la SERPINA1 pour la neutrophile élastase diminuerait de 1000 fois, augmentant ainsi les dommages causés par la neutrophile élastase [56].

1.14.4.2 *La cirrhose du foie*

La mutation impliquée dans la variante Z interfère aussi avec la conformation de la protéine ce qui cause la rétention de la SERPINA1 dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes plutôt que sa sécrétion. Ce mauvais repliement fait en sorte que la SERPINA1 se polymérise. Ne pouvant pas être sécrétés, ces larges complexes causent des dommages au tissu hépatique sous forme d'inclusions intracellulaires. Les hépatocytes détruits sont remplacés par des régions de fibrose, ce qui conduit éventuellement à une cirrhose [58, 66].

IV Les objectifs de mon projet de maîtrise

La SERPINA1 est un inhibiteur de protéases. Les protéases sont connues pour être capable de dégrader la matrice extracellulaire, étape préliminaire de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases. Les résultats antérieurs de notre laboratoire indiquaient que les tumeurs LMP (qui ne sont pas invasives) expriment la SERPINA1, alors que les tumeurs TOV (qui sont invasives) n'expriment peu ou pas de SERPINA1. Mon hypothèse est que la sécrétion de SERPINA1 par les cellules LMP pourrait limiter leur progression tumorale. Le premier objectif de mon projet de maîtrise était d'abord de surexprimer la SERPINA1 dans deux lignées cellulaires invasives du cancer de l'ovaire. Ensuite, d'évaluer l'effet de cette surexpression au niveau de la croissance cellulaire, la capacité de migration, l'invasion d'une matrice extracellulaire, la formation de structures tridimensionnelles et de tumeurs dans les souris. Le deuxième objectif était de caractériser le niveau d'expression de la SERPINA1 dans le plasma et les tissus ovariens de patientes saines ou présentant des tumeurs LMP ou TOV.

- Chapitre 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Échantillons et lignées cellulaires

Les échantillons de tissus ovariens tumoraux et sains, en plus des échantillons sanguins, ont été collectés et mis en banque (Banque de tissus et de données du Réseau de Recherche sur le Cancer des Fonds de la Recherche en Santé du Québec) suite aux chirurgies effectuées au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). Les patientes ont accepté de contribuer à la recherche en signant un formulaire de consentement au préalable. L'histopathologie, la classe tumorale, le grade et le stade des tumeurs ont été déterminés selon les critères de la FIGO par un pathologiste certifié.

L'ARN provenant de 32 échantillons de tumeurs mises en culture (cultures primaires) et de 35 échantillons de tissus a servi pour les PCR en temps réel (Q-PCR), alors que le plasma sanguin de 44 patientes différentes a été utilisé pour réaliser une expérience d'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) (Tableau II).

Échantillons de patientes saines	ELISA	Q-PCR cultures primaires	Échantillons de patientes atteintes d'une tumeur BOV	Q-PCR tissus	Q-PCR cultures primaires	Échantillons de patientes atteintes d'une tumeur LMP	ELISA	Q-PCR tissus	Q-PCR cultures primaires	Échantillons de patientes atteintes d'une tumeur TOV	ELISA	Q-PCR tissus	Q-PCR cultures primaires
NOV 61		X	BOV 319G		X	LMP 206D		X	X	TOV 513			X
NOV 504D	X		BOV 406D	X		LMP 720G			X	TOV 884D	X		X
NOV 653G	X		BOV 429G	X		LMP 796D		X		TOV 908D	X	X	X
NOV 821	X		BOV 846D	X	X	LMP 845		X		TOV 952D	X	X	X
NOV 848D	X		BOV 985G	X		LMP 916			X	TOV 959D	X	X	X
NOV 900	X		BOV 1024	X		LMP 920D	X	X		TOV 993	X	X	X
NOV 1181	X		BOV 1161G	X		LMP 942G	X			TOV 999D		X	X
NOV 1275G		X	BOV 1207D	X		LMP 984	X	X		TOV 1048			X
NOV 2617	X		BOV 1325G	X		LMP 991G			X	TOV 1054D	X		
NOV 2618	X		BOV 2399G		X	LMP 1010G	X	X		TOV 1095D	X		
NOV 2955	X		BOV 2712D	X	X	LMP 1064D	X			TOV 1108D	X		
NOV 2956	X		BOV 2732G	X	X	LMP 1101G	X			TOV 1127D	X		
NOV 2970	X		BOV 2860D		X	LMP 1228G		X		TOV 1142D	X		
NOV 3018	X		BOV 2889D	X	X	LMP 2762	X			TOV 1148G	X		
NOV 3019	X		BOV 2957D	X	X	LMP 2888	X			TOV 1150D	X		
NOV 3048	X					LMP 2966	X	X	X	TOV 2548	X		
NOV 3049	X					LMP 2982	X			TOV 2579	X		
NOV 3057	X					LMP 3028	X			TOV 2658	X		
NOV 3059	X					LMP 3046	X			TOV 2699	X		
NOV 3069	X					LMP 3056	X			TOV 2711	X		
NOV 3081	X					LMP 3068	X			TOV 2885	X		
NOV 3086	X					LMP 3094	X			TOV 2886	X		
NOV 3107	X					LMP 3120	X			TOV 2912	X		
NOV 3134	X					LMP 3185	X			TOV 2929	X		
						LMP 3313	X			TOV 2954	X		
										TOV 2996	X		
										TOV 3002	X		
										TOV 3020	X		
										TOV 3050	X		
										TOV 3083	X		
										TOV 3085	X		

Tableau II Liste des différents échantillons provenant de patientes saines ou présentant une tumeur BOV, LMP ou TOV, utilisés pour réaliser les expériences d'ELISA et de PCR en temps réel.

Le microétalage de tissus ovariens utilisé pour ce projet est composé de 237 tumeurs provenant de patientes différentes, et de 18 lignées cellulaires dérivées de différents cancers. Les 237 tumeurs représentent tous les types histopathologiques (171 tumeurs séreuses, 33 endométrioïdes, 15 mucineuses, 13 à cellules claires et 5 mixtes) et les différents grades de la maladie (37 GB, 25 G1, 55 G2, 120 G3).

Les deux lignées cellulaires choisies pour réaliser la surexpression de la SERPINA1 sont la TOV 112D et la TOV 1946. Le profil d'expression des différentes lignées cellulaires de cancer de l'ovaire du laboratoire a été vérifié sur la micropuce à ADN U133 et les données indiquent que ces deux lignées n'expriment pas la SERPINA1.

La lignée cellulaire TOV 112D a été dérivée antérieurement au laboratoire à partir d'une tumeur solide à l'aide d'une technique de digestion par les collagénases [45]. La patiente atteinte de cette tumeur était âgée de 42 ans lors du diagnostic et est décédée moins de 3 mois après avoir subi une cytoréduction chirurgicale optimale et reçu un traitement de chimiothérapie. La tumeur était de type endométrioïde, de stade IIIC et de grade 3 [47].

La lignée cellulaire TOV 1946 a été dérivée au laboratoire par un simple grattage du tissu de la tumeur solide. La patiente était âgée de 75 ans lors du diagnostic. Elle était atteinte d'une tumeur séreuse de stade IIIC et de grade 3 et est décédée de complications post-opératoires [46].

Ces deux lignées sont maintenues en culture dans du milieu complet, c'est-à-dire dans du milieu OSE 1X (Wisent, Qc, Canada) supplémenté avec 10% de FBS (fetal bovine serum), 2.5 µg/mL d'amphotéricine B (Wisent, Qc, Canada) et 50 µg/mL de gentamicine (Gibco™). Les cellules sont divisées environ 1:4 deux fois par semaine et maintenues dans des Pétris 100 mm. Les cellules sont conservées dans un incubateur humidifié à 37°C, avec une atmosphère contenant 5% de CO₂.

2.2 Techniques de biologie moléculaire

2.2.1 Extraction d'ARN

Le réactif TRIzol[®] (Invitrogen) a été utilisé pour extraire l'ARN total des cultures primaires, des différents clones TOV 112D et TOV 1946, et des tissus tumoraux en suivant

les instructions du manufacturier. L'ARN a été extrait lorsque les cellules cultivées occupaient environ 80% du Pétri 100 mm, alors que les tissus devaient d'abord être homogénéisés. Enfin, la qualité de ces ARN a été vérifiée en utilisant l'appareil 2100 Bioanalyzer et le "RNA 6000 Nano LabChip kit" (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) selon les instructions du fabricant. Les ARN ont été considérés comme acceptables lorsque leur RIN (RNA integrity number) était supérieur à 6.5.

2.2.2 PCR quantitatif en temps réel (Q-PCR)

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés selon les recommandations du kit "QuantiTect[®] Reverse Transcription" (QIAGEN Inc., Mississauga, ON, Canada). Brièvement, l'ADN génomique a été éliminé en traitant les échantillons d'ARN à la désoxyribonucléase durant une incubation de 2 minutes à 42°C. Puis, l'ADNc a été synthétisé à partir d'un µg d'ARN, à l'aide d'un mélange d'oligo-dT et d'amorces aléatoires de PCR, durant une incubation de 15 minutes à 42°C. Afin d'inactiver la transcriptase inverse, une incubation de 3 minutes à 95°C était nécessaire. La RT-PCR a été réalisée sur une machine MBS Satellite 0.2G Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation). Les échantillons ont été dilués dans de l'eau (1:5 ou 1:10) avant d'effectuer les Q-PCR. Les Q-PCR ont été réalisées sur un appareil Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Montreal Biotech Inc., QC, Canada) et le "QuantiFast[™]SYBR[®] Green PCR" (QIAGEN Inc., Mississauga, ON, Canada) a été utilisé comme marqueur. Chacun des tubes avait un volume final de 25 µL contenant 5 µL d'ADNc de l'échantillon et 10 pmol de chacune des amorces. Les amorces qui ont été utilisées pour amplifier la SERPINA1 sont 5'-CCGCCATCTTCTTCCTGCCTGA-3' (sens) et 5'-CCGGAGAGGTCAGCCCCATTG-3' (anti-sens), alors que celles pour ERK1 sont 5'-GCGCTGGCTCACCCCTACCT-3' (sens) et 5'-GCCCCAGGGTGCAGAGATGTC-3' (anti-sens). Les réactions de Q-PCR ont été réalisées selon les instructions du manufacturier et chaque échantillon a été fait en duplicata. De plus, des dilutions (1:5) en série ont été effectuées afin de générer une courbe standard pour le gène ERK1 et SERPINA1, en vue de déterminer l'efficacité de la Q-PCR. Des courbes de fusion ont aussi été effectuées pour chacune des réactions dans le but de vérifier leur spécificité. La méthode d'analyse de Pfaffl, pour mesurer l'expression relative de la SERPINA1, a été utilisée [67]. Selon cette formule,

$$R = \frac{(E_{SERPINA1})^{\Delta C_p \text{ SERPINA1}(\text{contrôle-échantillon})}}{(E_{ERK1})^{\Delta C_p \text{ ERK1}(\text{contrôle-échantillon})}}$$

R est le ratio de l'expression relative, E est l'efficacité de la réaction de PCR, et ΔC_p est la différence des Ct (point de croisement de l'échantillon à un seuil donné). Le gène de référence ERK1 a été sélectionné pour son expression stable dans les échantillons selon l'analyse de la micropuce, alors que l'échantillon BOV 2957D a été utilisé pour normaliser les cultures primaires et les tissus. Les produits PCR ont aussi été migrés sur gel d'agarose 2% pour vérifier la taille des amplicons. Finalement, un test statistique non-paramétrique Mann-Whitney a été fait en utilisant la version 11.0 du logiciel d'analyse statistique SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., IL, USA) pour vérifier si la différence d'expression entre les différents groupes était significative.

2.2.3 Clonage de la SERPINA1

Un clone IMAGE de la SERPINA1 disponible commercialement chez Invitrogen (Full-length mammalian gene collection, #catalogue : 4644658) a été utilisé pour le clonage. Ce clone IMAGE consiste en un vecteur pOTB7, dans lequel est insérée la séquence codante complète de la SERPINA1 (Figure 15). Le vecteur d'entrée qui a été choisi pour le clonage est le plasmide pcDNA3.1+ (Invitrogen).

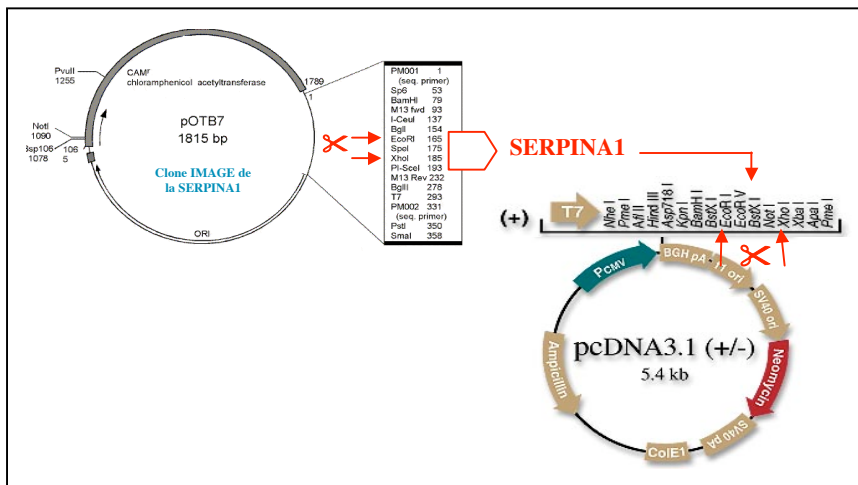


Figure 15 Clonage de la SERPINA1

En premier lieu, le clone IMAGE et le pcDNA3.1+ ont été digérés séparément par l'enzyme EcoRI à 37°C pendant 2 heures. Puis, une précipitation à l'éthanol a été réalisée. Brièvement, de l'acétate de sodium 3M et de l'éthanol froid (-20°C) ont été ajoutés aux tubes avant de mettre le tout à -20°C durant 30 minutes et de centrifuger 30 minutes à

13000 rpm à 4°C. Ensuite, le surnageant a été jeté, le culot lavé à l'éthanol 70% froid (-20°C) et une centrifugation de 15 minutes à 13000 rpm à 4°C a été réalisée. Ensuite, le surnageant a été jeté et le culot mis à sécher durant 10 minutes, avant d'être dissout dans de l'eau. La seconde digestion du clone IMAGE et du plasmide pcDNA3.1+ a été faite par l'enzyme XhoI à 37°C durant 12 heures. Le lendemain, une précipitation à l'éthanol a été réalisée pour les deux tubes, tel que décrite précédemment. Afin de vérifier l'efficacité des deux digestions précédentes, une petite quantité a été migrée sur un gel d'agarose 0.8% (préparé avec du tampon TAE 1X) avec le marqueur d'ADN HyperLadder 1 (Bioline, MA, USA).

2.2.3.1 Insertion de la SERPINA1 dans le pcDNA3.1+

En second lieu, la ligation (introduction de la SERPINA1 dans le plasmide d'entrée) a été réalisée avec la T4 DNA ligase (Invitrogen) selon les procédures du manufacturier, en prenant soin d'effectuer un contrôle en parallèle (de l'eau a été utilisée à la place du clone IMAGE digéré EcoRI-XhoI). Après les 15 minutes d'incubation à température pièce, la transformation de cellules DH5 α compétentes a été effectuée à l'aide du kit "Subcloning efficiency™ DH5 α ™" (Invitrogen). Brièvement, 6 μ L du mélange de ligation ou de mélange contrôle a été ajouté à un tube contenant 50 μ L de DH5 α . Les tubes ont par la suite été mis sur glace durant 30 minutes, puis à 42°C durant 45 secondes, avant d'être remis sur glace durant 2 minutes. Ensuite, 250 μ L de milieu LB ont été ajoutés à chacun des tubes et ceux-ci ont été placés dans un incubateur avec agitation à 37°C durant 1 heure. Après cette incubation, les bactéries de chacun des tubes ont été étalées sur deux boîtes de milieu LB-agar supplémentées en ampicilline (100 μ g/mL), et ont été placées à 37°C durant la nuit.

2.2.3.2 Sélection des bactéries ayant incorporé le pcDNA3.1-SERPINA1

En raison de problèmes avec le kit d'extraction des bandes d'ADN sur gel d'agarose, des précipitations à l'éthanol ont été réalisées suite aux digestions. Cela a été fait afin d'éliminer les tampons de digestions et les enzymes de restriction. Le pcDNA3.1+ a un gène de résistance à l'ampicilline, tandis que le clone IMAGE a une résistance au

chloramphénicol. Ainsi, les bactéries ayant poussées sur les pétris LB-ampicilline pouvaient avoir incorporé le pcDNA3.1+ et le petit bout de 33 pb libéré lors de la digestion du pcDNA3.1+ avec EcoRI et XhoI. Elles pouvaient avoir incorporé le pcDNA3.1+ avec la partie non désirée du clone IMAGE digéré EcoRI et XhoI, ou avoir incorporé le pcDNA3.1+ et la SERPINA1. Ainsi, pour sélectionner les colonies où les bactéries avaient incorporé le pcDNA3.1+ et la SERPINA1, trente colonies ont été isolées. Pour ce faire, un trait d'environ un cm a été fait sur un pétri LB-ampicilline puis, sans flamber, un trait d'un cm était ensuite fait sur un pétri LB-chloramphénicol (170 µg/mL). Puis, les deux pétris ont été placés à 37°C pour la nuit. Les 10 colonies qui ont poussées seulement sur le pétri LB-ampicilline ont étéensemencées dans des tubes contenant du milieu LB-ampicilline (100µg/mL) et réisolées sur d'autres pétris LB-ampicilline. Les pétris ont été mis dans un incubateur à 37°C, alors que les tubes ont été mis dans un agitateur à 37°C pour la nuit. Des mini-préparations d'ADN ont été réalisées pour isoler les plasmides à l'aide du "QIAprep®Spin Miniprep kit" (QIAGEN Inc., Mississauga, ON, Canada), selon les recommandations du manufacturier. Pour vérifier la validité de construction des plasmides, deux digestions ont été effectuées pour les 10 colonies, avec l'enzyme HindIII et PmeI. Les tubes ont été placés dans un bain à 37°C durant 6 heures. Puis, les digestions ont migré sur un grand gel d'agarose 0.8% pour vérifier le profil des bandes avec le marqueur d'ADN HyperLadder 1 (Bioline, MA, USA). Le plasmide de deux des dix colonies testées a été envoyé au séquençage (Centre d'immunogénétique du Centre de recherche du CHUM) (séquencé avec les amorces T7 et "BGH reverse"). Une seule des deux colonies a été sélectionnée, puisque la séquence de la SERPINA1 était entière et sans erreur. Elle a étéensemencée dans 200 mL de milieu LB et le tout a été placé dans un agitateur à 37°C pour la nuit. Ensuite, l'isolement du plasmide pcDNA3.1+ contenant la SERPINA1 a été effectué à l'aide du "QIAfilter™Plasmid Maxi kit" (QIAGEN Inc., Mississauga, ON, Canada) selon les procédures du manufacturier.

2.2.4 Transfections

Le plasmide pcDNA3.1+ et le pcDNA3.1-SERPINA1 ont d'abord été linéarisés avec l'enzyme BglII à 37°C pendant 12 heures. Le réactif FuGENE (Roche Diagnostics) a été utilisé selon les recommandations du manufacturier. La proportion de 3:1 a été choisie,

c'est-à-dire 12 μL de FuGENE pour 4 μg d'ADN (plasmide linéarisé) pour atteindre un volume total de 200 μL , complété avec du milieu OSE sans sérum ni antibiotique. Pour chacune des deux lignées cellulaires, une transfection contrôle a été effectuée en parallèle en utilisant le plasmide pcDNA3.1+ vide. Les mélanges de transfection ont ensuite été ajoutés aux pétris de la lignée TOV 112D et TOV 1946 (à environ 60% de confluence). Après une incubation de 6 heures à 37°C, le milieu de transfection a été retiré et du milieu complet frais a été ajouté aux pétris. Puis, 48 heures plus tard, du milieu complet avec sélection à la généticine (G418) (Gibco™) a été ajouté aux pétris. Des tests de toxicité ont été effectués préalablement et la concentration de 0.8 mg de G418 par mL de milieu complet a été choisie pour sélectionner seulement les cellules ayant incorporées le plasmide qui possède le gène de résistance.

2.2.5 Génération et sélection de clones stables

Pour les deux pétris transfectés avec le pcDNA3.1+ vide, les cellules ont poussées très rapidement même avec la sélection au G418. La méthode par dilution limite a donc été utilisée pour générer des clones stables et indépendants. Les cellules ont été diluées à une concentration finale de 1 cellule par puits pour 100 μL de milieu dans une plaque de 96 puits. Le milieu utilisé pour la dilution était du milieu conditionné contenant 10% (v/v) d'un filtrat de surnageant de culture des lignées originales non-transfectées TOV 112D et TOV 1946. Les plaques ont ensuite été placées à 37°C pour environ une semaine, puis examinées au microscope pour localiser les clones.

Pour les cellules ayant été transfectées avec le pcDNA3.1-SERPINA1, la méthode "par papiers" a été utilisée, des clones isolés étant visibles dans les pétris. Après avoir rincé les pétris avec du PBS, des petits papiers Whatman 3M autoclavés (d'environ 3 mm par 3 mm) ont été trempés quelques secondes dans la trypsine, puis déposés avec une pince sur chacun des clones isolés. Après 5 minutes, chaque papier a été placé dans un puits différent, d'une plaque de 24 puits, contenant du milieu conditionné. Les plaques ont ensuite été placées à 37°C.

Lorsque les cellules des clones isolés "par papiers" ou par dilution limite occupaient la presque totalité du puits, elles étaient transférées dans des plaques 24 puits, ensuite dans des

plaques 6 puits jusqu'à confluence, pour finalement être mises dans un pétris 60 mm. Lorsque les cellules de deux pétris 60 mm d'un clone étaient à confluence, un était conservé en culture et l'autre servait à une extraction de protéines.

2.3 Techniques de validation des clones générés

2.3.1 Extraction de protéines

Après avoir été rincées avec du PBS, les cellules ont été grattées dans 1 mL de PBS et recueillies dans un tube. Suite à une centrifugation de 10 minutes à 4000 rpm à 4°C, le surnageant a été enlevé et les culots ont été lysés durant 30 minutes à 4°C avec un tampon de lyse (1% Igepal, 10% glycérol, 50mM Tris-Base (pH 8), 2mM EDTA, 5 mM NaF, 150 mM NaCl) contenant des antiprotéases (25X) (Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail Tablets, Roche Diagnostics). Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 30 minutes à 13000 rpm à 4°C. Puis, les surnageants ont été récoltés et conservés à -80°C.

La concentration des protéines a été mesurée par l'analyse de Bradford (Protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) selon les instructions du manufacturier.

2.3.2 Buvardage de type Western

Pour le buvardage de type Western, 30 µg d'extraits protéiques de chacun des clones ont été séparés sur gels de polyacrylamide 10%, puis transférés sur membrane de PVDF. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant une heure à température pièce avec un tampon de blocage (5% de lait en poudre sans matières grasses dilué dans du PBS-Tween 0.05%). Puis, les membranes ont été incubées à 4°C pendant 14 heures avec l'anticorps primaire de la SERPINA1 (Mouse monoclonal [B9] to alpha1-antitrypsin, (ab9399) Abcam Inc., MA, USA) dilué 1:4000 dans du tampon de blocage. Les membranes ont été lavées trois fois avec du tampon PBS-Tween 0.05% pendant 10 minutes, puis incubées 1 heure à température pièce avec l'anticorps secondaire "Goat anti-mouse IgG1" conjugué à l'enzyme HRP (sc-2060, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilué 1:3000 dans du tampon de blocage. Après trois lavages de 10 minutes au PBS-Tween, les membranes ont

finalement été exposées à un substrat chimioluminescent d'ECL (Amersham™) et placées au contact d'un film Kodak.

2.3.3 ELISA

Le kit commercial de quantification "Human alpha1-antitrypsin ELISA" (GenWay Biotech Inc., San Diego, CA) a été utilisé selon les procédures du fabricant. Un mélange d'anticorps primaire de capture dilué 1:100 dans du tampon (0.05 M Carbonate-bicarbonate, pH 9.6) a été préparé et 100 uL a été ajouté par puits, avant de placer la plaque de 96 puits à 4°C durant 14 heures. Une fois l'anticorps de capture retiré, 4 lavages ont été effectués (50mM Tris pH 8, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20) ainsi qu'un blocage (1% de lait dans du PBS) de 1 heure à température pièce sous agitation. Après avoir retiré la solution de blocage, 4 lavages étaient requis avant l'ajout des échantillons à tester et de la gamme de calibration pour une incubation de 1 heure à température ambiante sous agitation. Après 4 lavages, l'anticorps de détection HRP dilué a été ajouté dans chacun des puits pour une durée d'une heure. Après 4 nouveaux lavages, la solution TMB (Tetramethyl benzidine, 1:1) a été ajoutée et la plaque a été incubée à l'obscurité pour environ 10 minutes avant l'ajout de la solution stop (H₂SO₄ 2M) pour arrêter la réaction. La lecture de la plaque a été faite à l'aide de la version 4.7 du logiciel SoftMax Pro et de l'appareil Versa max microplate reader (Molecular Devices), à 450 nm.

Les surnageants de culture ont été récupérés soit au jour 4 des courbes de croissance, soit quatre jours après la formation des sphéroïdes, soit 72 heures après que les tumeurs des souris SCID aient été mises en culture. Les surnageants de culture n'ont pas nécessité de dilution, alors que les plasmas sanguins de patientes ont dû être dilués 1:20 000 avec la solution de blocage pour que la concentration de SERPINA1 puisse être incluse dans la zone de détection du kit qui est de 7.8-500 ng/mL.

2.4 Essais fonctionnels *in vitro*

2.4.1 Courbes de croissance

Au jour 0, les cellules ont étéensemencées dans des plaques six puits (Corning Inc.), à raison de 3 puits par clones pour chaque temps (24, 48, 72, 96 et 120 heures) et de 2×10^5 cellules par puits. Les expériences ont été réalisées en triplicata pour les TOV 112D et les TOV 1946. Chaque jour (tous les 24 heures), les cellules ont été trypsinisées et comptées. Les puits étaient rincés avec 2 mL de PBS et les cellules décollées au moyen de 0.5mL de trypsine. Les cellules ont été resuspendues dans 1 mL final de milieu complet. Le bleu de Trypan a été utilisé pour diluer et compter les cellules avec un hématocytomètre. Suite aux comptes effectués au jour 1, le milieu de toutes les autres plaques a été changé. Au jour 4 (96 heures), avant de débiter les comptes cellulaires, 1 mL de surnageant a été prélevé dans chacun des puits et centrifugé à 13 000 rpm durant 5 minutes à 4°C pour faire précipiter les cellules et les débris. Les surnageants ont ensuite été recueillis et mis en conservation à -80°C. Ces surnageants correspondaient à une sécrétion sur 72 heures et ont été utilisés pour quantifier par ELISA la sécrétion de SERPINA1 par les différents clones.

2.4.2 Essais d'invasion avec Matrigel

L'invasion cellulaire a été déterminée selon l'habilité des cellules à envahir (dégrader et migrer) une membrane basale synthétique, le Matrigel, qui mime la matrice extracellulaire. À noter que le "Matrigel Phenol red-free" (Becton Dickinson) a été utilisé afin de pouvoir colorer les membranes à la fin des expériences. Le Matrigel a été dilué avec du milieu OSE sans sérum pour obtenir 2 différentes concentrations, soient 0.4 mg/mL et 1 mg/mL. Toujours en travaillant sur glace, 50 µL de Matrigel dilué ont été ajouté sur les membranes PET (polyethylene terephthalate) des inserts (Becton Dickinson). Ces membranes possèdent des pores de 8 microns et laissent donc facilement passer les cellules. Les inserts étaient ensuite placés dans des plaques de 24 puits Companion (Becton Dickinson) et incubés à 37°C durant au moins 2 heures pour permettre au Matrigel de se polymériser. Puis, les cellules ont été trypsinisées et resuspendues dans du milieu OSE contenant 1% de FBS. Dans le compartiment supérieur des inserts, 4×10^4 cellules ont été déposées dans 0.5 mL de milieu OSE 1% FBS, alors que le compartiment inférieur était rempli avec du milieu OSE supplémenté par 5% de FBS. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C durant 24

heures (Figure 16). Suite à l'incubation, les cellules n'ayant pas traversées la membrane ont été retirées à l'aide de tiges à bout de coton (Medicon). Puis, les membranes ont été lavées au PBS, fixées au méthanol froid (4°C) et colorées avec du Giemsa (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) dilué 1:10. Finalement, après avoir rincé et séché les inserts, les cellules invasives ont été comptées à l'aide d'un microscope inversé. Les expériences ont été faites en triplicata.

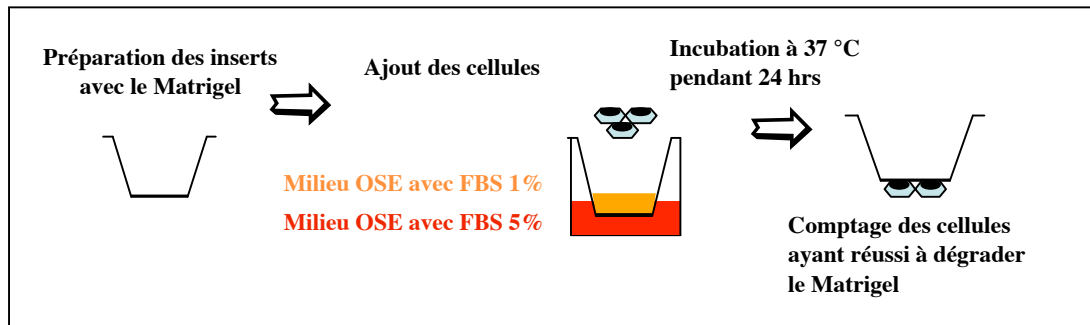


Figure 16 Description des étapes pour l'essai d'invasion avec Matrigel

2.4.3 Essais de migration : Recouvrement suite à une blessure

Au jour 0, des plaques 6 puits Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) permettant une meilleure adhérence des cellules, ont étéensemencées à raison de 2×10^6 cellules par puits. Pour le temps 0, un puits par clone était suffisant, alors que pour les temps de 24 et 48 heures, 2 puits par clones étaient nécessaires. Au jour 1, le milieu de tous les puits a été changé. Au jour 2, les cellules devaient être à confluence. À l'aide d'une pipette et de tips jaunes, des blessures ont été effectuées en gardant toujours la pipette bien droite et en appuyant avec une force constante (Figure 17). Deux stries ont été ainsi réalisées par puits. Lorsque les stries étaient faites, les plaques ont été rincées avec du PBS goutte-à-goutte, avant l'ajout de milieu complet goutte-à-goutte et elles ont ensuite été remises à 37°C pour 24 ou 48 heures. Pour chaque temps, les cellules des plaques ont été fixées, après un lavage au PBS, par l'ajout de PBS-méthanol (50%) à température pièce, puis de méthanol 100% froid (4°C). Les cellules ont ensuite été rincées avec du méthanol 100% à température pièce et mises à sécher. Les plaques ont été colorées en utilisant du Giemsa frais (dilution 1:10 avec de l'eau) (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) et mises à l'abri de la lumière pendant 14 heures. Pour chaque clone de chaque lignée, l'expérience a été réalisée en triplicata. Des photos de toutes les stries ont été prises à un grossissement de 4X à l'aide d'un microscope inversé de type Nikon Eclipse TS100 et d'un appareil photo Nikon Coolpix 5000.

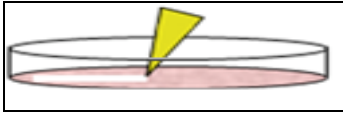


Figure 17 Strie effectuée sur une monocouche de cellules à confluence

2.4.4 Méthode de quantification des stries

Toutes les photos correspondant au temps 0 heure et 48 heures ont été analysées avec le logiciel Image-Pro[®] Plus (MediaCybernetics[®]) version 5.1. Afin d'évaluer la surface des stries, il a tout d'abord fallu créer un filtre (représenté en rose à la figure 18) qui recouvrait tout l'espace non-occupé par les cellules. Une boîte de sélection a aussi été créée et a été utilisée pour les photos de toutes les expériences, autant les TOV 112D que les TOV 1946. La surface de chacune des stries et la surface adjacente (confluence des cellules) à ces dernières a été calculée grâce au logiciel, à 0 et 48 heures. Afin de corriger les variations observées lors de la fixation des cellules avec le méthanol froid (4°C), la surface adjacente (Figure 18C et 18F) a été soustraite à la surface de la strie (Figure 18B et 18E).

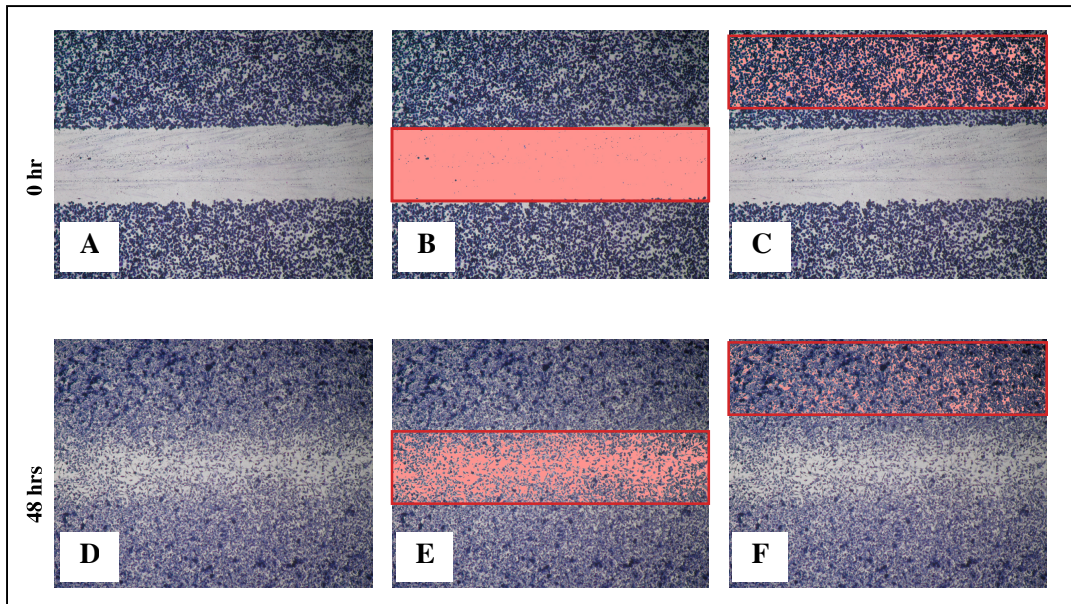


Figure 18 Méthode de quantification utilisant le logiciel Image-Pro Plus.

A), B) et C) correspondent à une même strie au temps 0. D), E) et F) représentent une même strie après 48 heures de recouvrement. Les photos B) et E) montrent la surface de la strie calculée par le logiciel, alors que les photos C) et F) présentent la surface adjacente à la strie calculée par le logiciel au temps 0 et 48 heures.

2.4.5 Formation des sphéroïdes

Les différents clones des lignées cellulaires TOV 112D et TOV 1946 ont été évalués pour leur capacité à former des sphéroïdes (agrégats en 3 dimensions). Pour ce faire, une quarantaine de gouttes, chacune composée de 4×10^3 cellules suspendues dans 16 μ L de milieu OSE complet, ont été placées sur la surface interne du couvercle d'une boîte de Pétri 100 mm (Figure 19). Puis, le couvercle était remis sur le Pétri contenant 5-10 mL de milieu complet pour prévenir la déshydratation des gouttelettes. Les pétris étaient ensuite placés à 37°C. Quelques photos significatives des sphéroïdes pour chaque clone ont été prises quatre jours plus tard, à un grossissement de 4X à l'aide d'un microscope inversé de type Nikon Eclipse TS100 et d'un appareil photo Nikon Coolpix 5000. Enfin, pour chaque clone, les gouttes ont été recueillies et transférées dans un tube. Les surnageants ont été récupérés suite à une centrifugation à 4°C durant 5 minutes à 13000 rpm, puis conservés à -80°C pour être ultérieurement évalués par ELISA pour leur concentration en SERPINA1.

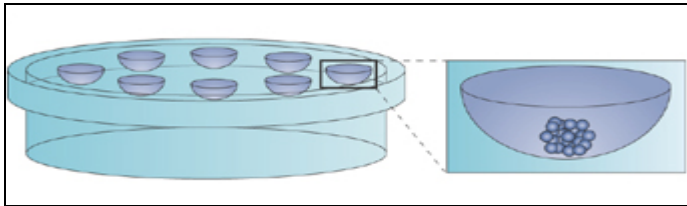


Figure 19 Méthode des gouttelettes inversées utilisée pour la formation des sphéroïdes (tirée de [68]), représentation schématique des gouttelettes dans le Pétri. La figure de droite représente le grossissement d'une goutte contenant un sphéroïde a son apex.

2.5 Essais fonctionnels *in vivo*

2.5.1 Immunohistochimie

Pour fabriquer le microétalage de tissus, une coupe de chacun des blocs de tissus ovariens des patientes a été réalisée. Une coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) a aussi été faite pour chacune des lames, afin de localiser les zones tumorales. Puis, une carotte de 1 mm de diamètre a été prélevée dans la zone tumorale du bloc de tissu et a été placée dans un bloc receveur de paraffine (Figure 20). Lorsque toutes les carottes étaient placées dans le bloc de paraffine, des coupes de 5 μ m d'épaisseur ont été faites et déposées sur des lames.

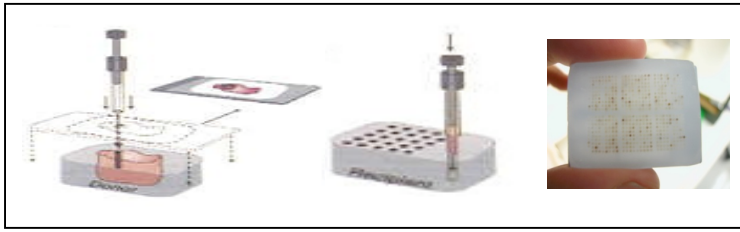


Figure 20 Création d'un microétalage de tissus

Brièvement, une lame contenant le microétalage de tissus ovariens décrit précédemment a été placée dans un four à 60°C pour environ 20 minutes afin d'amollir la paraffine. Le microétalage a été déparaffiné dans du toluène et réhydraté en suivant un gradient d'éthanol (95%, 90, 80%). Pour éliminer l'activité endogène de la peroxydase, un traitement de 5 minutes dans une solution de H₂O₂ 3% a été réalisé. Après avoir subi un rinçage à l'eau distillée, la lame a ensuite été immergée dans du tampon de citrate (0.01 M d'acide citrique, pH 6) bouillant et mise au four micro-ondes durant 10 minutes pour démasquer les antigènes. Après refroidissement et des lavages à l'eau distillée et au PBS, le microétalage devait subir un blocage de 5-10 minutes en utilisant une solution de "Protein blocking serum-free" (DakoCytomation Inc., ON, Canada). Puis, la lame a été incubée pendant 90 minutes à température pièce et à l'obscurité avec l'anticorps de la SERPINA1 (Mouse monoclonal [B9] to alpha1-antitrypsin, (ab9399) Abcam Inc., MA, USA) dilué 1:1250 dans du PBS. La concentration optimale de l'anticorps primaire a été déterminée par une série de dilutions. Une lame servant de contrôle négatif a été utilisée en parallèle et a été incubée avec du PBS. Après cette incubation, la lame a subi deux lavages au PBS, avant d'être incubée durant 20 minutes avec l'anticorps secondaire lié à la biotine (DakoCytomation Inc., ON, Canada). Deux lavages au PBS étaient à nouveau nécessaires avant une autre incubation de 20 minutes, cette fois avec un anticorps couplé au complexe streptavidine-peroxydase (DakoCytomation Inc., ON, Canada). Après 2 lavages additionnels, la réaction a été développée en utilisant du diaminobenzidine (DAB) (DakoCytomation Inc., ON, Canada) et les noyaux ont été colorés avec de l'hématoxyline. Finalement, le microétalage a été déshydraté en suivant un gradient d'éthanol (80, 90, 95%) et puis mis dans du toluène avant d'être recouvert d'une lamelle et séché.

La lame a ensuite été prise en photo à l'aide d'un ScanScope XT System (Aperio Technologies Inc., CA, USA). Puis, à l'aide du logiciel ImageScope version 8.2.5.1263 (Spectrum Plus, Aperio Technologies Inc., CA, USA), deux observateurs indépendants ont

visionné et évalué la coloration des cellules épithéliales tumorales. Pour chaque échantillon, le pourcentage de noyaux marqués positivement (bruns) et l'intensité du cytoplasme (de 0 à 3 : 0 étant négatif et 3 très marqué) a été évalué. Des analyses statistiques ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel SPSS.

2.5.2 Immunocytochimie

Afin de démontrer la spécificité de l'anticorps de la SERPINA1 en immunohistochimie, une expérience test a été réalisée en utilisant la lignée TOV 1946 et le clone 1946-S2. La veille de l'expérience, des petites quantités de cellules ont été déposées sur des lames disposées au fond de boîtes de Pétri. Du milieu était ajouté délicatement afin de recouvrir totalement les lames et les pétris étaient remis à 37°C pour 16 heures. Les lames ont ensuite été immergées dans une solution de PBS pour être rincées, avant d'être fixées dans une solution de formaldéhyde 3.7% durant 10 minutes. Après un lavage au PBS, les cellules ont été perméabilisées durant 5 minutes dans une solution de 0.05% TritonX-100 (dilué dans du PBS). Puis, après un lavage au PBS, un traitement de 10 minutes dans une solution de H₂O₂ 3% a été réalisé. Un blocage de 5 minutes au moyen d'une solution de "Protein blocking serum-free" (DakoCytomation Inc., ON, Canada) a été fait. Les lames ont ensuite été incubées pendant 90 minutes à température pièce et à l'obscurité avec l'anticorps de la SERPINA1 (Mouse monoclonal [B9] to alpha1-antitrypsin, (ab9399) Abcam Inc., MA, USA) dilué 1:900 dans du PBS. Une lame servant de contrôle négatif a été traitée en parallèle sans anticorps. La suite de l'expérience a été la même que celle décrite précédemment pour l'immunohistochimie, excepté que les temps d'incubation pour l'anticorps secondaire et tertiaire ont été de 30 minutes plutôt que 20 minutes. Des photographies ont ensuite été prises à des grossissements de 20X et 40X à l'aide d'un microscope Olympus BX51 muni d'une caméra digitale Olympus Q-color5.

2.5.3 Formation de tumeurs dans les souris SCID

Le potentiel tumoral des clones TOV 112D et TOV 1946 a été évalué par leur habilité à former des tumeurs dans des souris immunodéficientes SCID (avec immunodéficiences combinées sévères, CB17, Charles River) femelles âgées d'environ 42 jours. Les injections

ont été réalisées au niveau du flanc gauche des souris. Un volume de 200 μL a été injecté à chaque souris, constitué de 100 μL de Matrigel (Becton Dickinson) et de 1×10^6 cellules diluées dans 100 μL de D-PBS (Gibco™) froid (4°C). Chacun des groupes était formé de 6 souris. Les souris ont été hébergées dans un environnement stérile. Les tumeurs étaient mesurées deux fois par semaine et les souris ont été sacrifiées avant que la tumeur atteigne les points limites établis par le Comité Institutionnel sur la Protection des Animaux (CIPA) selon les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux. Pour chacun des groupes, deux tumeurs ont été mises en culture par un simple grattage de la tumeur solide. Lorsque ces cellules étaient à confluence, elles étaient divisées 1:2 et après 72 heures, 1 mL de surnageant a été recueilli et traité comme décrit précédemment au jour 4 de la courbe de croissance (section 2.4.1 de ce chapitre), pour ensuite être évalué par ELISA.

- Chapitre 3 RÉSULTATS

3.1 Expression de la SERPINA1 dans les échantillons de patientes

L'ARN provenant des différents échantillons de tissus ovariens a été extrait en vue de synthétiser l'ADNc pour mesurer l'expression de la SERPINA1 par PCR en temps réel. L'ARN provenant de 12 tumeurs BOV, 11 tumeurs LMP et de 12 tumeurs TOV a été utilisé. Pour chacun des 35 échantillons, l'expression de la SERPINA1 et d'ERK1 a été mesurée en duplicata. Grâce à la formule de Pfaffl, l'expression relative de la SERPINA1 a été calculée en fonction de l'expression du gène de référence ERK1 et de l'échantillon contrôle BOV 2957D. Pour cet échantillon, l'efficacité de la réaction avec la SERPINA1 et ERK1 a été déterminée. Par cette expérience, nous avons validé le résultat obtenu avec la micropuce à ADN U133, en incluant des échantillons de tumeurs bénignes, mais aussi en utilisant un plus grand nombre d'échantillons de tissus LMP et TOV. Le résultat de la micropuce à ADN montrait que la SERPINA1 était un gène différentiellement exprimé entre les tumeurs séreuses LMP et TOV, soit surexprimé au niveau des tumeurs LMP comparativement aux tumeurs TOV. Par Q-PCR, il y a également une expression plus élevée de la SERPINA1 dans les tumeurs LMP par rapport aux TOV ($p=0.031$, test de Mann-Whitney) (Figure 21A). Néanmoins, deux échantillons de tumeurs LMP (LMP 796D, LMP 2966D) n'expriment pratiquement pas la SERPINA1, alors que trois échantillons de tumeurs TOV (TOV 1054D, TOV 1127D et TOV 1150D) expriment un assez haut niveau de SERPINA1. Nous avons également pu remarquer que les échantillons de tumeurs BOV n'expriment que très faiblement la SERPINA1 par rapport aux LMP ($p=0.003$) et aux TOV ($p=0.01$). Ce résultat n'a cependant pas été étudié plus en détails, compte tenu de l'impossibilité de travailler à long terme avec les tumeurs BOV.

De plus, les résultats préliminaires n'ont montré aucune différence d'expression de la SERPINA1 lorsque des échantillons de cultures primaires étaient utilisés sur la micropuce à ADN U133 plutôt que des tissus. Nous avons tout de même voulu aller vérifier ce résultat par Q-PCR. Cette fois-ci, ce sont les tumeurs BOV qui expriment le plus de SERPINA1, bien que ce soit de façon beaucoup moins importante qu'au niveau des tissus (Figure 21B). Afin de pouvoir comparer les deux modèles, l'ARN de 5 tumeurs BOV, LMP et TOV, en tissus et en cultures primaires, a été utilisé. Les profils d'expression de la SERPINA1 nous montrent bien que ces deux modèles donnent des résultats assez différents.

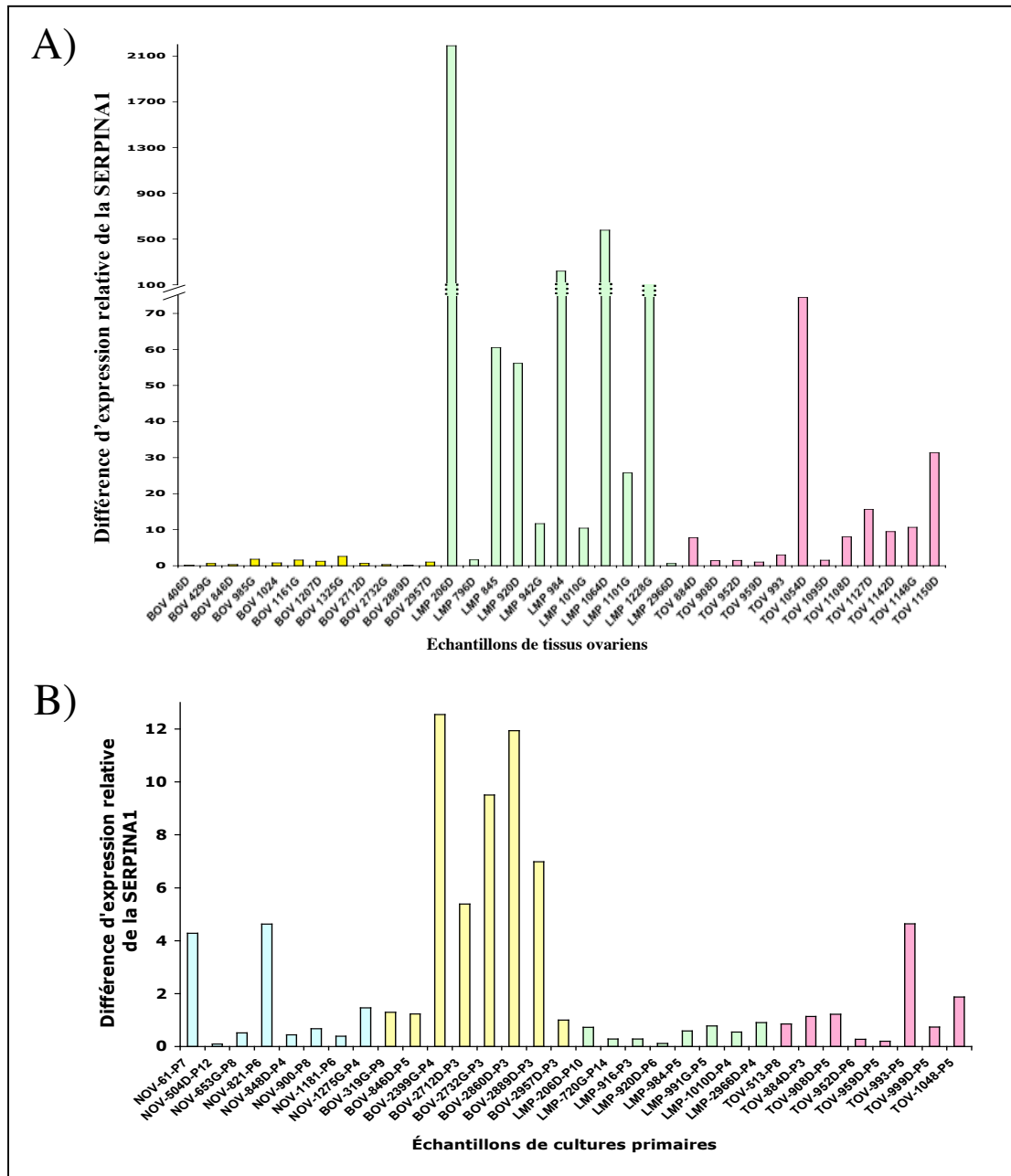


Figure 21 : Mesure de la quantité d'ARNm du gène SERPINA1 dans les échantillons de tissus et de cultures primaires du cancer épithélial de l'ovaire. Les Q-PCR sont analysés grâce à la formule de Pfaffl, en utilisant ERK1 comme gène de référence et l'échantillon BOV 2957D comme contrôle. A) Expression relative (ratio de SERPINA1/ERK1) de la SERPINA1 dans les échantillons de tissus ovariens provenant de patientes différentes atteintes de tumeurs BOV, LMP ou TOV du cancer épithélial de l'ovaire. B) Expression relative de la SERPINA1 dans les échantillons de cultures primaires dérivées d'ovaires normaux (NOV), ou de tumeurs BOV, LMP ou TOV. Chaque échantillon a été testé en duplicata.

Nous avons également voulu mesurer le taux de SERPINA1 dans le plasma des patientes par ELISA. Pour ce faire, nous avons utilisé le plasma provenant de 16 patientes sans cancer, de 12 patientes présentant une tumeur LMP et de 16 patientes ayant une tumeur TOV. Les taux plasmatique de SERPINA1 obtenus oscillent majoritairement entre 1 et 2.5 g/L (Figure 22) et il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes.

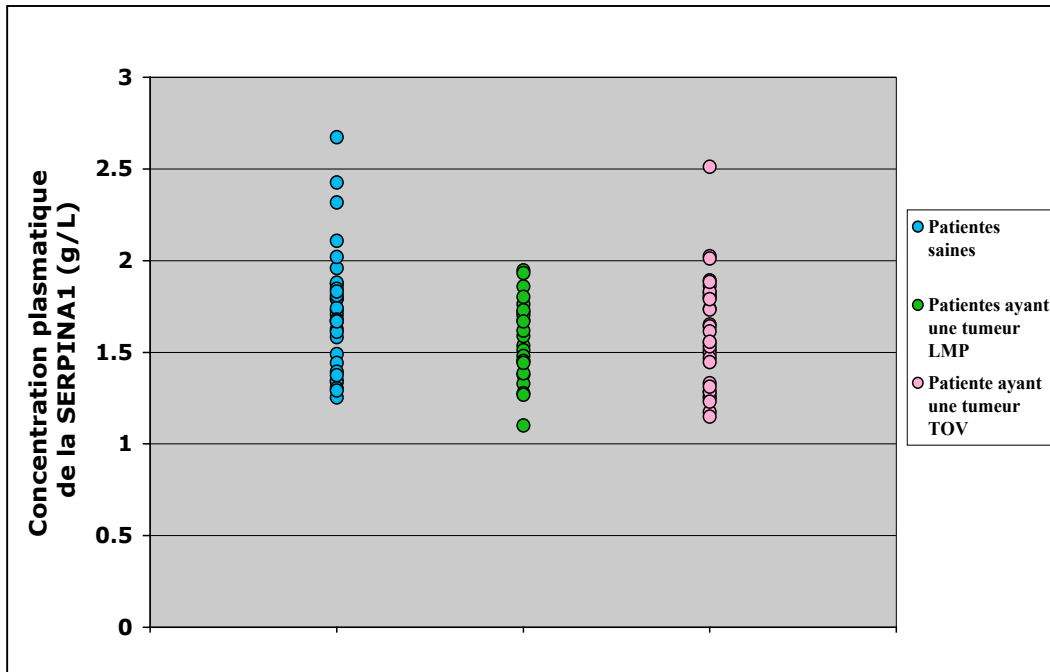


Figure 22 : Taux de SERPINA1 dans le plasma. La concentration plasmatique de SERPINA1 est mesurée par ELISA en utilisant le plasma de patientes saines, ayant une tumeur LMP ou TOV. Les échantillons ont été dilués 1:20 000 pour que la concentration de SERPINA1 puisse être incluse dans la zone de détection du kit commercial utilisé. L'expérience a été réalisée en duplicata.

3.2 Expression et sécrétion des différents clones surexprimant la SERPINA1

Les lignées cellulaires invasives du cancer épithélial de l’ovaire dérivées au laboratoire, soit la TOV 112D et la TOV 1946, ont été sélectionnées pour cette étude puisqu’elles n’expriment pas la SERPINA1 selon les données de la micropuce à ADN.

Après avoir transfecté le plasmide pcDNA3.1+ vide et le plasmide pcDNA3.1-SERPINA1 dans les lignées cellulaires TOV 112D et TOV 1946, nous avons réussi à dériver différents clones stables et indépendants.

Il est important de noter que pour tous les résultats présentés, les clones surexprimant la SERPINA1 seront nommés de S1 à S4, précédés du numéro de la lignée de laquelle ils sont dérivés, soit la TOV 112D ou la TOV 1946. Les clones contrôles comprennent les lignées non-transfectées (Wild-Type : WT) et trois clones contrôles nommés de A à C, contenant le plasmide pcDNA3.1+ vide, indiqués par le C pour contrôle, suivi du numéro de la lignée à partir de laquelle ils ont été dérivés.

Afin de vérifier que ces derniers avaient bel et bien incorporé le plasmide pcDNA3.1-SERPINA1, nous avons d’abord analysé la synthèse protéique de la SERPINA1 par buvardage de type Western. La SERPINA1 est synthétisée par les clones surexprimant la SERPINA1 et peu ou pas par les clones contrôles (Figure 23A). Nous avons aussi montré par Q-PCR, que l’ARNm du gène SERPINA1 est produit par les clones surexprimant la SERPINA1 et non pas par les clones contrôles (Figure 23B). Finalement, afin de vérifier que la SERPINA1 est bien fonctionnelle dans ces clones et sachant qu’il s’agit d’une protéine sécrétée, nous avons recueilli le surnageant des milieux de cultures. Après avoir laissé les cellules sécréter la SERPINA1 pendant 72 heures, nous avons mesuré le taux de SERPINA1 par ELISA. En ayant recueilli les surnageants pendant les essais de croissance, nous avons pu normaliser cette sécrétion pour 10 000 cellules. Tel qu’attendu, les clones surexprimant la SERPINA1 la sécrètent et non les clones contrôles, autant pour ceux dérivés de la lignée TOV 112D que ceux de la lignée TOV 1946. Il est aussi intéressant de noter que les clones dérivés de la lignée TOV 1946 sécrètent 2 à 3 fois plus de SERPINA1 (Figure 23C).

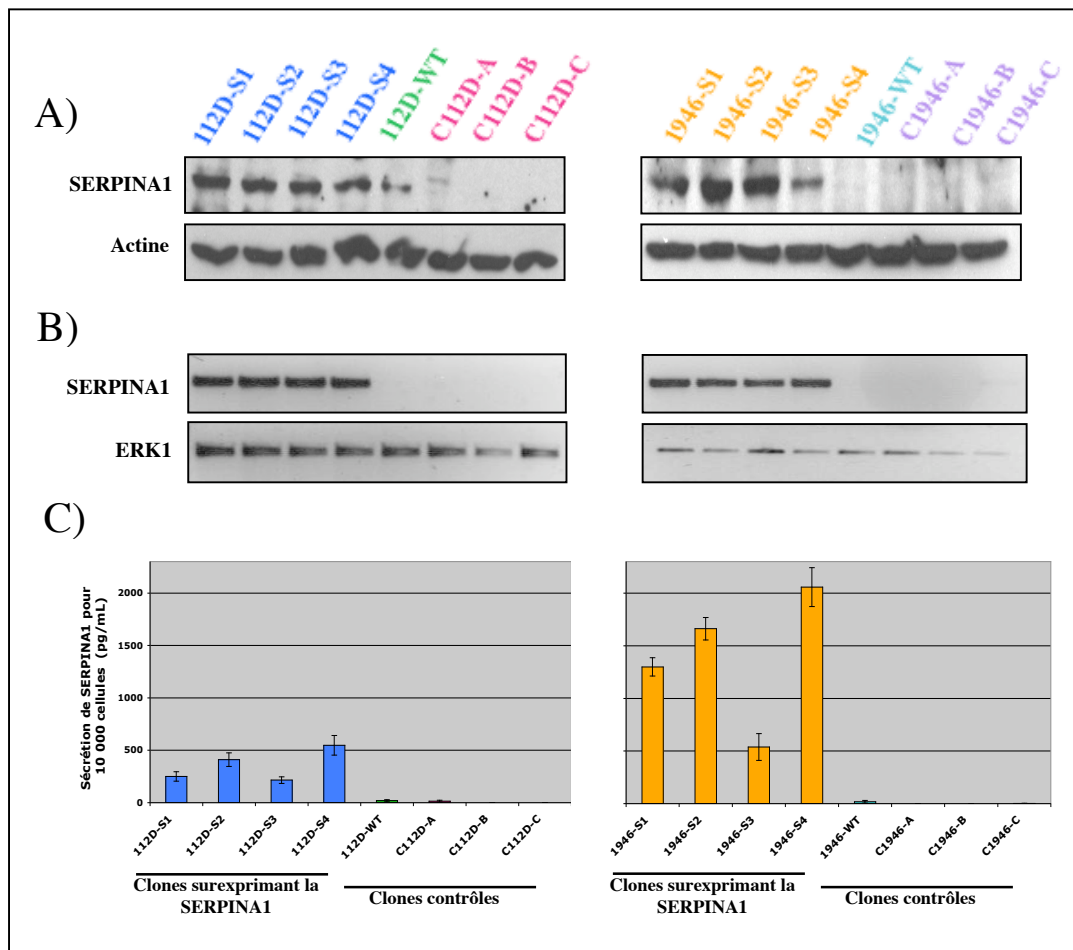


Figure 23 : Caractérisation de l'expression et de la sécrétion de la SERPINA1 dans les clones stables générés. A) Un buvardage de type Western, réalisé en duplicata, a été utilisé pour évaluer l'expression de la protéine SERPINA1 dans les clones des 2 lignées cellulaires où la SERPINA1 a été transfectée comparativement aux clones contrôles. L'actine a servi comme contrôle de quantité de protéine chargée sur le gel. B) L'ARN extrait de tous les clones a servi à synthétiser de l'ADNc avec lequel une PCR en temps réel a été réalisée en duplicata. Les produits PCR amplifiés après 32 cycles sont migrés sur un gel d'agarose 0.8%. ERK1 a été utilisé comme gène de contrôle interne. C) Les surnageants du milieu de culture des différents clones ont été recueillis au jour 4 (96 heures) des comptes cellulaires et correspondent à une sécrétion de SERPINA1 sur 72 heures. La concentration de SERPINA1 a été normalisée pour 10 000 cellules. Pour chaque expérience, 3 échantillons d'un même clone ont été testés, et chaque expérience a été réalisée en triplicata. (112D-S1 à S4 et 1946-S1 à S4 : clones surexprimant la SERPINA1, 112D et 1946-WT : lignées non-transfectées, C112D-A à C et C1946-A à C : clones contrôles).

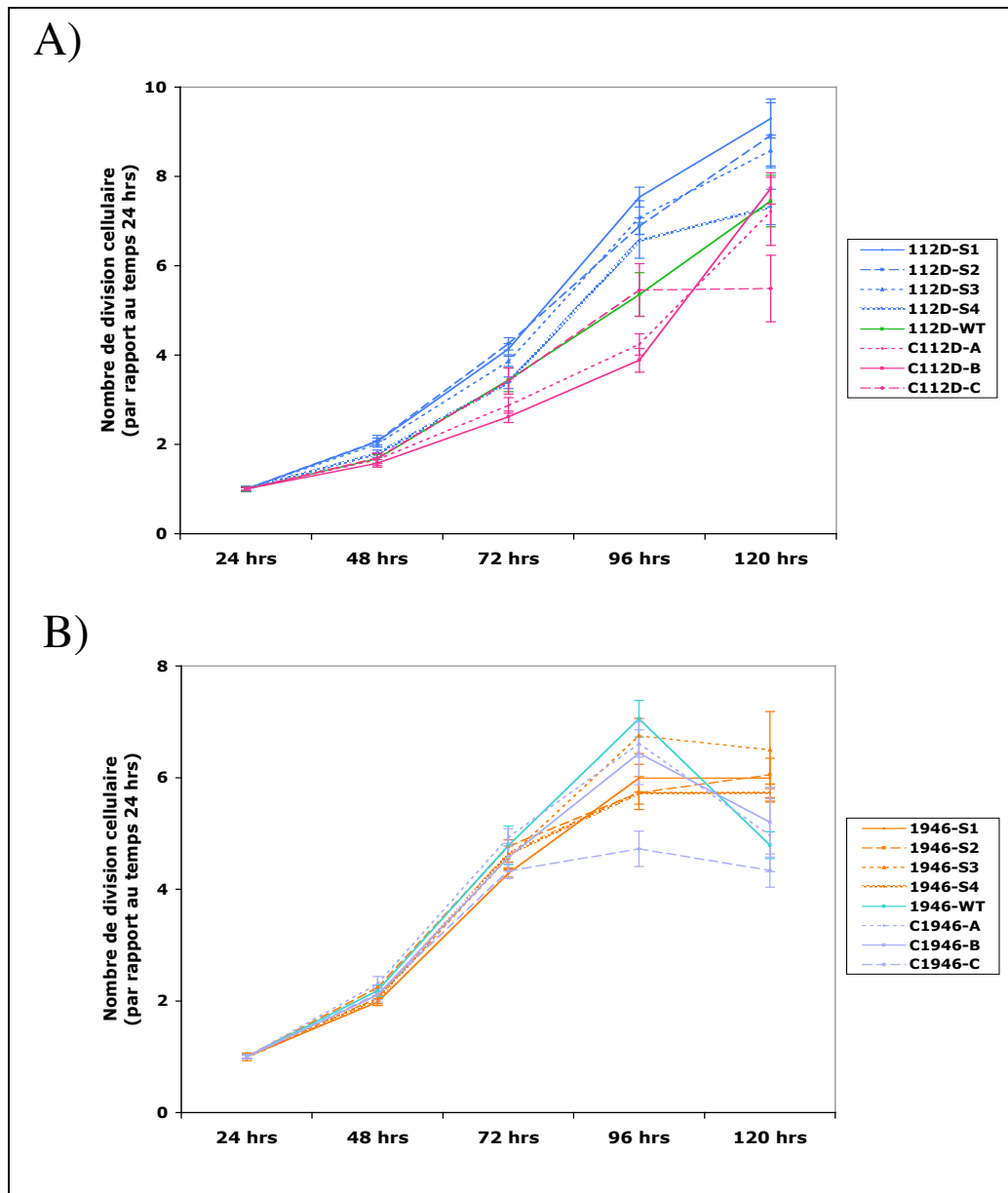


Figure 24 : Taux de croissance des différents clones surexprimant la SERPINA1. Courbes de croissance des différents clones dérivés de la lignée cellulaire TOV112D (A) et de la lignée TOV1946 (B). Au temps 0, 200 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. Les comptes cellulaires ont débutés au temps 24 hrs et tous les comptes subséquents ont été normalisés par rapport au nombre de cellules à 24 hrs. Pour chaque expérience, 3 échantillons d'un même clone ont été testés, et chaque expérience a été réalisée en triplicata. (112D-S1 à S4 et 1946-S1 à S4 : clones surexprimant la SERPINA1, 112D et 1946-WT : lignées non-transfectées, C112D-A à C et C1946-A à C : clones contrôles).

3.3 Effets *in vitro* de la surexpression de la SERPINA1 dans les lignées invasives du cancer de l'ovaire

Nous avons maintenant le matériel nécessaire afin de déterminer l'effet de la surexpression de la SERPINA1 au niveau de différents paramètres biologiques, soit la croissance cellulaire, la capacité de migration, la formation d'une structure tridimensionnelle, l'invasion d'une matrice extracellulaire et la formation de tumeurs dans les souris.

3.3.1 Niveaux de croissance des différents clones surexprimant la SERPINA1

Nous voulions dans un premier temps évaluer le taux de croissance de nos différents clones. Après avoirensemencé 200 000 cellules au jour 0, les comptes cellulaires ont été effectués après 24, 48, 72, 96 et 120 heures en utilisant le bleu de Trypan pour compter uniquement les cellules vivantes. Que ce soit pour les clones dérivés de la lignée TOV 112D ou de la lignée TOV 1946, aucune différence significative n'a été notée au niveau de la croissance cellulaire (Figure 24). La SERPINA1 ne semble donc pas affecter ce paramètre biologique.

3.3.2 Capacité des différents clones à envahir une matrice synthétique de Matrigel

Afin de mesurer le taux d'invasion des différents clones dérivés de la lignée TOV 112D et TOV 1946, nous avons choisi d'évaluer leur capacité à envahir (dégradation et migration) une matrice synthétique de Matrigel (Figure 25). Nous avons utilisé une matrice poreuse à 0.4 mg/ml et aussi voulu voir ce qui se passait avec une matrice plus compacte à 1 mg/ml. Lorsque nous comparons uniquement les résultats obtenus à 0.4 mg/ml, nous observons que les clones TOV 112D surexprimant la SERPINA1 envahissent plus la matrice de Matrigel que les clones contrôles ($p=0.043$) (Figure 25A). Pour les clones dérivés de la lignée TOV 1946, nous n'obtenons cependant pas une différence significative ($p=0.149$) entre ces deux groupes en présence d'une matrice à 0.4 mg/ml (Figure 25B).

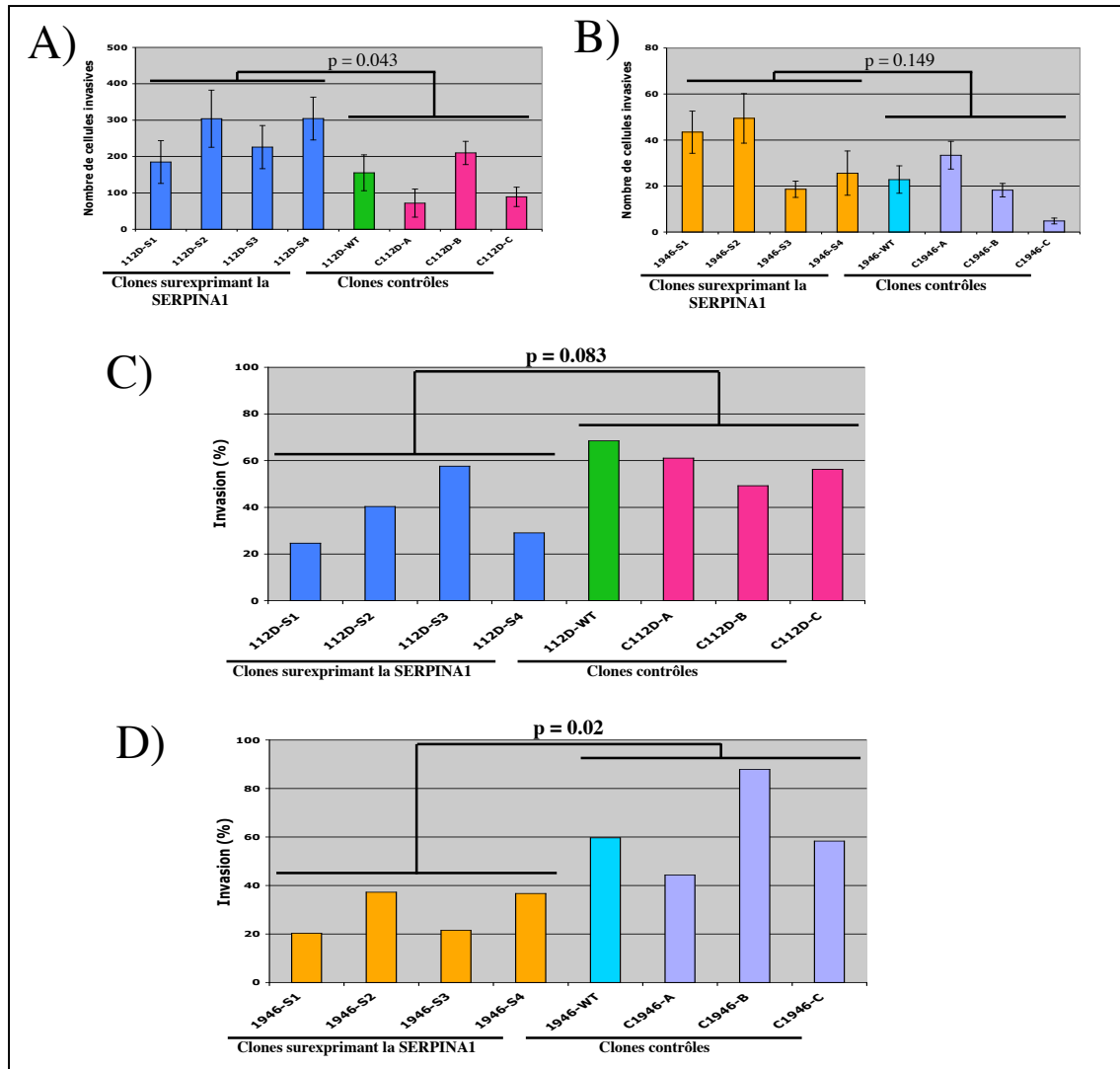


Figure 25 : Mesure de la capacité des différents clones à envahir une matrice synthétique de Matrigel. Taux d'invasion (dégradation et migration) des différents clones dérivés de la lignée TOV 112D (A, C) et de la lignée TOV 1946 (B, D). Après 24 heures, les cellules non invasives ont été retirées et les cellules invasives ont été comptées grâce à un microscope inversé. L'expérience a été réalisée à 3 reprises. Deux concentrations de Matrigel ont été utilisées, soit 0.4 mg/mL et 1 mg/mL. Les graphiques A) et B) représentent l'invasion des cellules sur une matrice de Matrigel à 0.4 mg/mL. En C) et D), le taux d'invasion des différents clones face à une matrice compacte (1 mg/mL), en comparaison à une matrice poreuse (0.4 mg/mL) est présenté (% d'invasion). Des analyses statistiques de Mann-Whitney ont été effectuées afin de comparer la capacité d'invasion des cellules surexprimant la SERPINA1 par rapport aux contrôles. (112D-S1 à S4 et 1946-S1 à S4 : clones surexprimant la SERPINA1, 112D et 1946-WT : lignées non-transfectées, C112D-A à C et C1946-A à C : clones contrôles).

En utilisant deux concentrations différentes de Matrigel, nous avons déterminé la capacité d'invasion des différents clones face à une matrice compacte, comparativement à une matrice poreuse. Le test statistique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer le taux d'invasion des clones surexprimant la SERPINA1 par rapport aux contrôles, et cela pour les deux lignées cellulaires. Alors que la différence observée pour les clones TOV 112D (Figure 25C) n'est pas significative ($p=0.083$), une différence significative ($p=0.02$) est obtenue pour les clones TOV 1946 (Figure 25D). Cela montre que, pour les clones TOV 1946 surexprimant la SERPINA1, la capacité d'invasion des cellules est diminuée lorsqu'elles font face à une matrice compacte (1 mg/mL) comparativement aux clones contrôles. Les clones qui surexpriment cette antiprotéase sont donc plus affectés par la densité de la matrice synthétique à laquelle ils sont exposés par rapport aux contrôles. Il est également intéressant de noter que, pour de mêmes conditions expérimentales, le nombre de cellules invasives est plus élevé du côté des clones TOV 112D que chez les clones TOV 1946. Par exemple, chez les clones TOV 112D surexprimant la SERPINA1, environ 185 à 305 cellules ont réussi à envahir la matrice poreuse, alors qu'elles n'ont été qu'environ 19 à 50 chez les clones TOV 1946 surexprimant la SERPINA1 (Figure 25A-B). Il est à noter que les données brutes recueillies lors des essais d'invasion sur une matrice compacte (1 mg/mL) sont présentées en annexe (Figure 33).

3.3.3 Capacité de migration des différents clones surexprimant la SERPINA1

Nous avons opté pour la méthode de recouvrement suite à une blessure pour étudier la capacité de migration des différents clones. Pour ce faire, nous avons infligé des blessures sous forme de stries à des cellules à confluence cultivées en monocouche et nous avons pris une photographie de chacune des stries (Figure 26A et 27A). Puis, à l'aide du logiciel Image-Pro Plus, nous avons pu calculer la surface (espace non-occupé par les cellules) de toutes les stries et calculer le pourcentage de recouvrement de chaque blessure selon la procédure décrite précédemment (section 2.4.4). Pour les clones dérivés de la lignée TOV 112D surexprimant la SERPINA1, la migration était assez rapide (Figure 26A). Le pourcentage de recouvrement des blessures est plus élevé chez ces derniers que chez les clones contrôles ($p=0.021$), les stries étant presque totalement recouvertes après 48 heures (Figure 26B). Il est important de noter que cette différence entre les deux groupes n'est pas due à une prolifération plus rapide des clones surexprimant la SERPINA1, comme nous avons pu le constater avec les courbes de croissance présentées précédemment.

Pour les clones dérivés de la lignée TOV 1946, aucune différence significative n'a été noté ($p=0.773$) à l'aide du test de Mann-Whitney (Figure 27B). Ainsi, contrairement aux clones TOV 112D, la surexpression de la SERPINA1 ne semble pas avoir d'effet au niveau de la migration cellulaire pour les clones dérivés de la lignée TOV 1946.

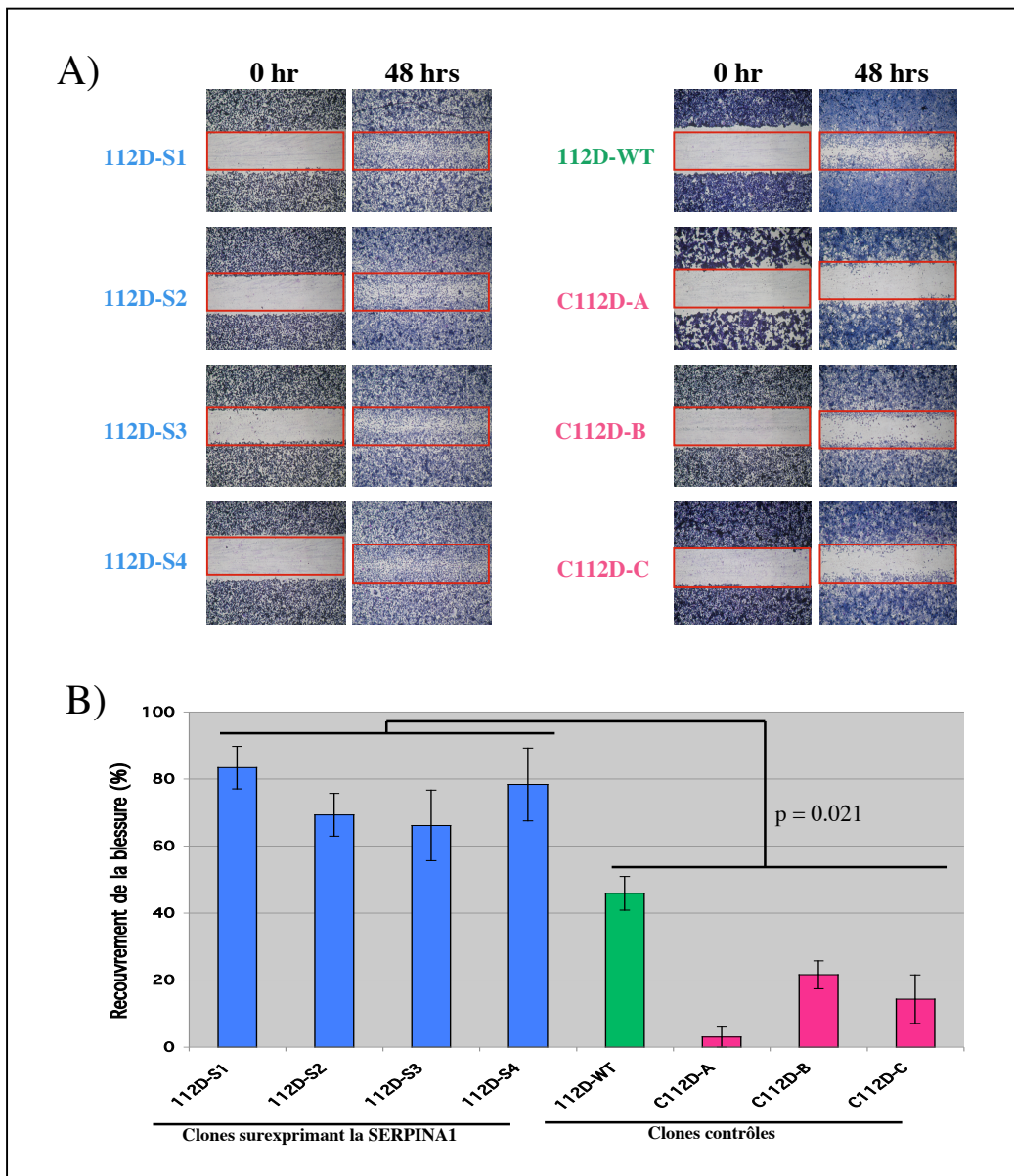


Figure 26 : Capacité de migration des différents clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 112D. Des stries ont été réalisées sur des cellules à confluence cultivées en monocouche. A) Photographies des blessures faites sur différents clones dérivés de la lignée TOV 112D au temps 0 et après 48 heures de recouvrement. B) Taux de recouvrement des blessures déterminé par le logiciel Image-Pro Plus. L'expérience a été réalisée à 3 reprises (pour chaque expérience : 2 stries pour le temps 0 et 4 stries pour le temps à 48 heures pour chaque clone). L'analyse statistique a été faite à l'aide du Test de Mann-Whitney. (112D-S1 à S4: clones surexprimant la SERPINA1, 112D-WT : lignée non-transfectée, C112D-A à C: clones contrôles).

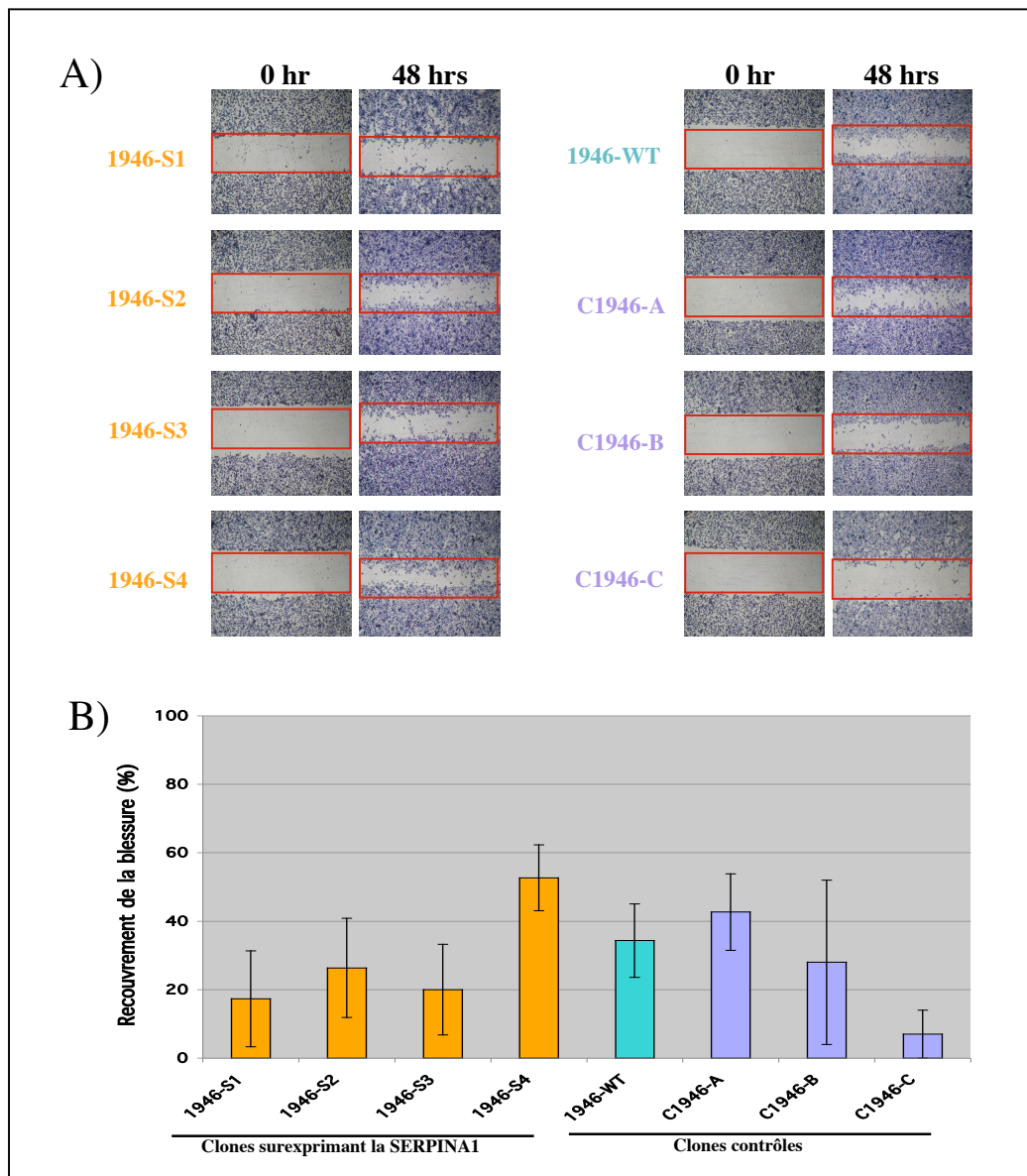


Figure 27 : Capacité de migration des différents clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 1946. Des stries ont été réalisées sur des cellules à confluence cultivées en monocouche. A) Photographies des blessures faites sur différents clones dérivés de la lignée TOV 1946 au temps 0 et après 48 heures de recouvrement. B) Taux de recouvrement des blessures déterminé par le logiciel Image-Pro Plus. L'expérience a été réalisée à 3 reprises (pour chaque expérience : 2 stries pour le temps 0 et 4 stries pour le temps à 48 heures pour chaque clone). L'analyse statistique a été faite à l'aide du Test de Mann-Whitney. (1946-S1 à S4 : clones surexprimant la SERPINA1, 1946-WT : lignée non-transfectée, C1946-A à C : clones contrôles).

3.3.4 Capacité des différents clones à former des structures tridimensionnelles

Nous avons ensuite voulu aller voir l'effet de la surexpression de la SERPINA1 sur la formation de structures cellulaires en trois dimensions. Ainsi, nous avons utilisé une technique développée au laboratoire, soit la formation de sphéroïdes dans des gouttelettes inversées. Tel que le montrent les photographies, les deux lignées cellulaires forment des sphéroïdes. Néanmoins, aucune différence n'a été remarquée quant à la morphologie (grosueur, densité) des sphéroïdes provenant des clones surexprimant la SERPINA1 par rapport aux contrôles et aux lignées cellulaires originales (Figure 28A et 29A). À noter que la lignée TOV 112D ainsi que les clones dérivés de celle-ci forment des sphéroïdes plus compacts que ceux de la lignée TOV 1946 et des clones dérivés de cette dernière. Ainsi, la surexpression de la SERPINA1 ne semble pas non plus avoir un impact sur les interactions cellules-cellules, puisque la SERPINA1 est bel et bien sécrétée dans le milieu de culture de nos sphéroïdes (Figure 28B et 29B). Nous avons également remarqué que les clones TOV 1946, qui surexpriment la SERPINA1, la sécrètent toujours en plus grande quantité que leurs semblables TOV 112D.

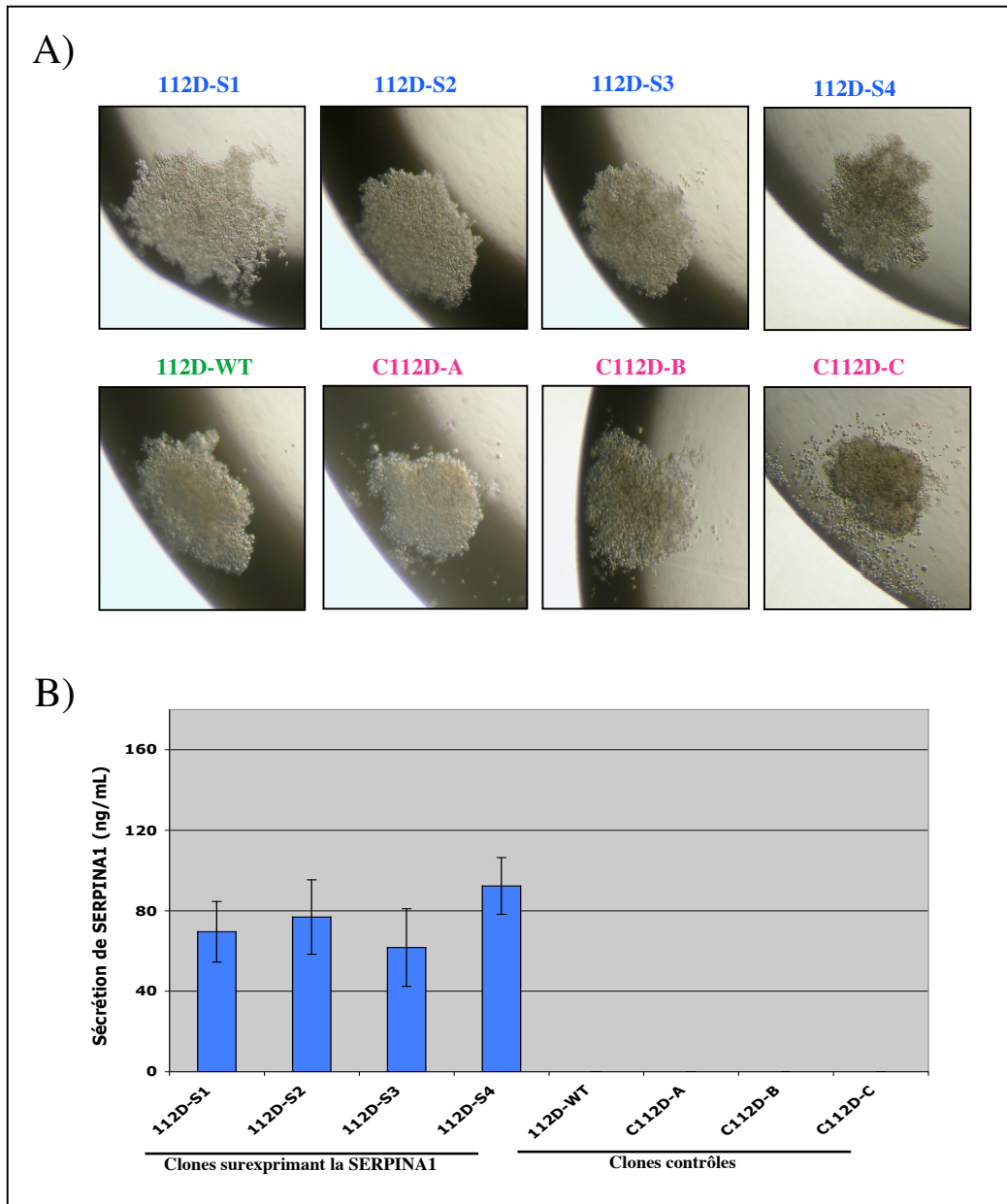


Figure 28 : Formation de structures tridimensionnelles par les clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 112D. L'habilité des clones dérivés de la lignée TOV 112D à former des agrégats en trois dimensions est mesurée grâce à la méthode des gouttelettes inversées. A) Photographies significatives de sphéroïdes formés après quatre jours. B) Sécrétion de SERPINA1 par les sphéroïdes après quatre jours (ELISA). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (112D-S1 à S4: clones surexprimant la SERPINA1, 112D-WT : lignée non-transfectée, C112D-A à C: clones contrôles).

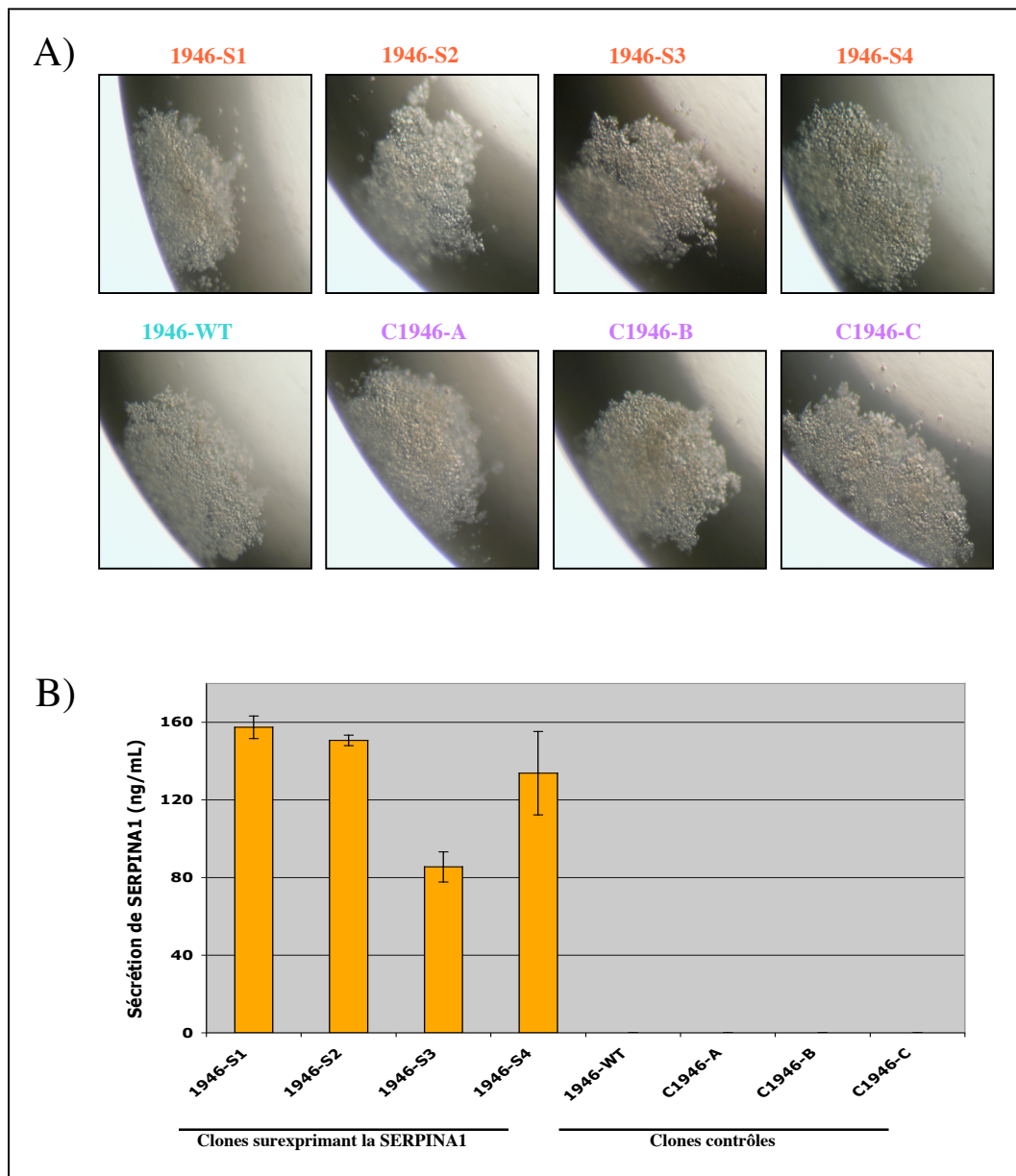


Figure 29 : Formation de structures tridimensionnelles par les clones surexprimant la SERPINA1 dérivés de la lignée TOV 1946. L'habilité des clones dérivés de la lignée TOV 1946 à former des agrégats en trois dimensions est mesurée grâce à la méthode des gouttelettes inversées. A) Photographies significatives de sphéroïdes formés après quatre jours. B) Sécrétion de SERPINA1 par les sphéroïdes après quatre jours (ELISA). Trois expériences indépendantes ont été réalisées. (1946-S1 à S4 : clones surexprimant la SERPINA1, 1946-WT : lignée non-transfectée, C1946-A à C : clones contrôles).

3.4 Essais fonctionnels *in vivo* sur les tissus ovariens et les souris SCID

3.4.1 Test de spécificité de l'anticorps

Pour valider l'utilisation de notre anticorps anti-SERPINA1 pour notre étude d'immunohistochimie sur un microétagage de tissus ovariens, nous avons d'abord vérifié sa spécificité par immunocytochimie. Nous avons utilisé les cellules 1946-WT à titre de contrôle négatif, puisque cette lignée n'exprime pas la SERPINA1 et nous avons utilisé les cellules du clone 1946-S2 qui surexpriment la SERPINA1 comme contrôle positif. Comme l'indiquent les photographies prises, notre anticorps est spécifique, puisque seules les cellules 1946-S2 sont marquées en brun (Figure 30A).

3.4.2 Expression de la SERPINA1 sur le microétagage de tissus ovariens

Nous avons procédé à une technique d'immunohistochimie sur le microétagage de tissus ovariens contenant 237 tumeurs différentes. En ce qui concerne les 18 lignées cellulaires présentes sur le microétagage, nous avons pu observer qu'aucune d'entre elles n'expriment la SERPINA1 (une photographie des deux lignées utilisées dans ce projet, soit la TOV 112D et la TOV 1946, est présentée à la Figure 30B). Les lignées cellulaires représentées sur le microétagage sont des lignées du cancer de la prostate, du sein, du colon et des ovaires. Pour ce qui est des échantillons de tumeurs, nous avons remarqué que la SERPINA1 est quelquefois localisée au noyau, mais qu'elle est majoritairement présente au niveau cytoplasmique (Figure 30B). De plus, un marquage au niveau apical des cellules est retrouvé chez certaines tumeurs et la SERPINA1 est exprimée dans le stroma de la majorité des échantillons de tissus.

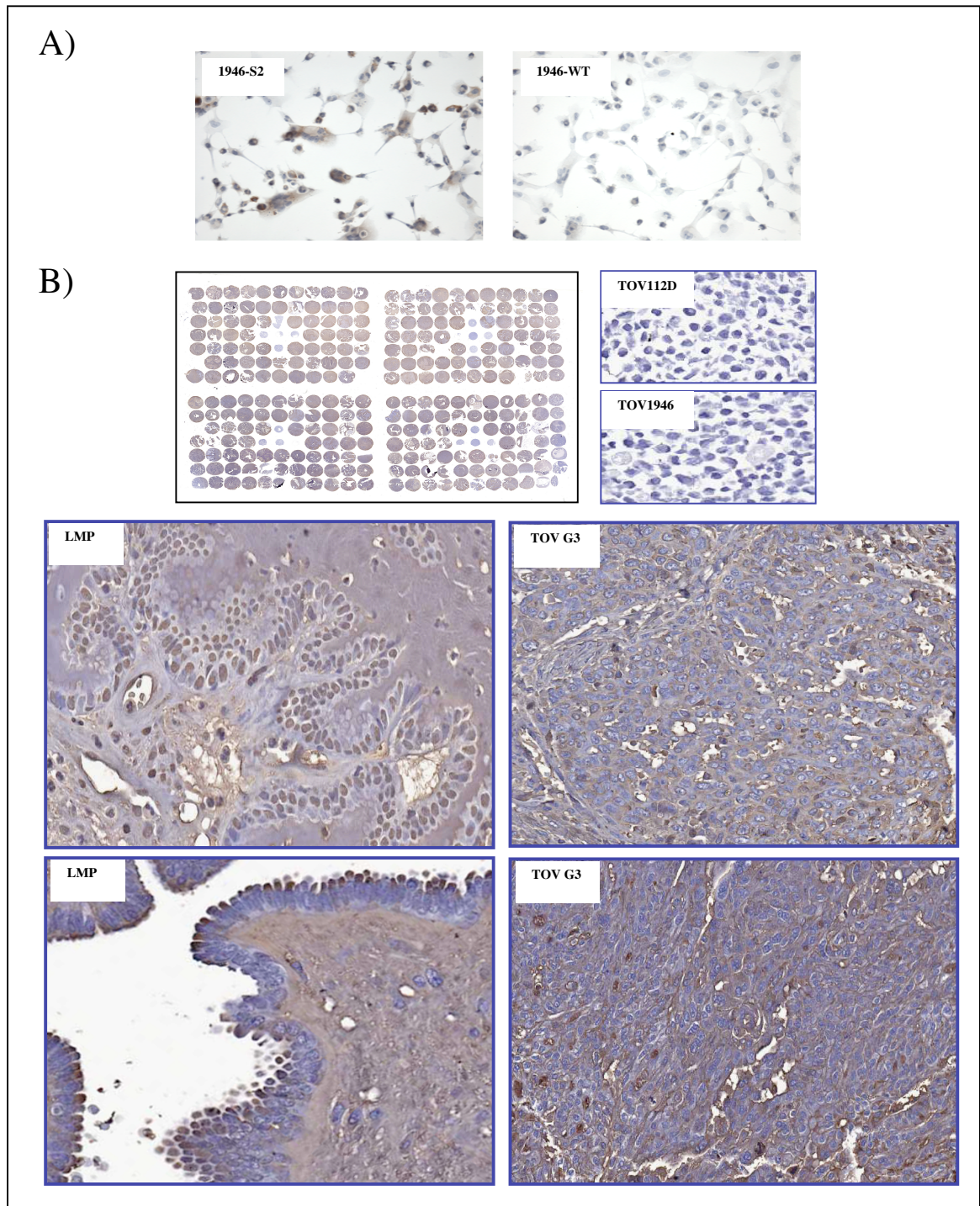


Figure 30 : Expression *in situ* de la SERPINA1 dans les tissus ovariens. A) Test de la spécificité de l'anticorps par immunocytochimie sur des cellules provenant du clone 1946-S2 surexprimant la SERPINA1 et de la lignée TOV 1946 non-transfectée. B) Exemples de colorations obtenues par immunohistochimie sur des échantillons du microétagage de tissus ovariens. Les photographies du microétagage de tissus entier, de deux lignées cellulaires, de deux tumeurs LMP et de deux tumeurs TOV sont représentées.

3.4.3 Relation entre l'expression de la SERPINA1 et quelques paramètres cliniques

Après que la lame ait été photographiée, deux observateurs indépendants ont évalué le pourcentage de noyaux marqués (bruns) au niveau des cellules épithéliales, en plus de l'intensité cytoplasmique (selon un score de 0 à 3, 0 étant négatif et 3 très fortement exprimé). Ensuite, nous avons comparé mes scores avec ceux de la deuxième personne afin de vérifier, par un test statistique, le coefficient de corrélation intraclasse. Puisque nos valeurs (nucléaires et cytoplasmiques) corrôlaient à plus de 70%, nous avons fait la moyenne des scores des deux observateurs et ce sont ces valeurs moyennes qui ont été utilisées pour les différentes analyses statistiques.

Nous avons effectué des graphiques de Kaplan-Meier pour voir s'il y a des corrôlations entre la survie, de même qu'avec la survie sans maladie (Disease-free survival, DFS) des patientes (en mois) et les deux différents marquages obtenus. Pour faire les analyses statistiques, nous avons sélectionné seulement les patientes atteintes de tumeurs sereuses et nous avons pris soin de retirer les tumeurs LMP, sachant que les patientes qui en sont atteintes ont généralement un très bon pronostic.

Que ce soit au niveau nucléaire ou cytoplasmique, aucune corrôlation significative n'a été obtenue avec la survie des patientes (Figure 31A et 31C). Nous avons également regardé s'il y a une relation entre la survie sans maladie des patientes et le pourcentage de noyaux marqués (Figure 31B), ainsi qu'avec l'intensité cytoplasmique (Figure 31D). Encore une fois, les valeurs statistiques ne sont pas significatives. À noter que le seuil utilisé pour le marquage nucléaire est de 2.5%, alors que celui du marquage cytoplasmique est de 2. Puisque l'aire sous les courbes ROC n'était pas significative, la médiane des valeurs cytoplasmiques et nucléaires a été sélectionnée comme seuil. Les valeurs moyennes cytoplasmiques et nucléaires ont donc été catégorisées avec ces seuils, en vue de réaliser les graphiques de Kaplan-Meier.

Les relations possibles entre l'expression de la SERPINA1 et les différents paramètres cliniques tels que l'âge des patientes, le stade et le grade de la maladie ont été évaluées à l'aide de la corrôlation de Spearman (Figure 31E). L'unique corrôlation significative ressortie de cette étude est l'intensité cytoplasmique qui semble être en lien avec le grade des tumeurs. Nous avons représenté le pourcentage de noyaux marqués et l'intensité cytoplasmique en fonction des différents grades tumoraux. De cette façon, nous pouvons

montrer qu'il y a une différence significative entre les tumeurs LMP (GB) et G1 ($p=0.017$), de même qu'entre les tumeurs GB et G2 ($p=0.039$), mais que ce n'est pas significatif entre les GB et les G3 ($p=0.063$), au niveau du marquage nucléaire. Ainsi, lorsque nous regroupons les tumeurs TOV de grade 1 à 3, nous obtenons une différence significative avec les tumeurs LMP ($p=0.029$). Pour ce qui est du marquage cytoplasmique, une différence significative est retrouvée entre les tumeurs GB et G2 ($p<0.0001$), ainsi qu'entre les GB et G3 ($p=0.001$). Une différence significative est aussi présente entre les tumeurs de grade 1 et 2 ($p=0.04$), de même que lorsque nous comparons les tumeurs LMP avec les tumeurs TOV (G1 à G3) ($p<0.0001$). Ce qui est intéressant de noter, c'est que la SERPINA1 semble être plus présente au niveau nucléaire chez les tumeurs LMP que chez les tumeurs TOV (Figure 31F). L'effet inverse est retrouvé au niveau cytoplasmique, le niveau de SERPINA1 étant plus élevé chez les tissus TOV que chez les tissus LMP.

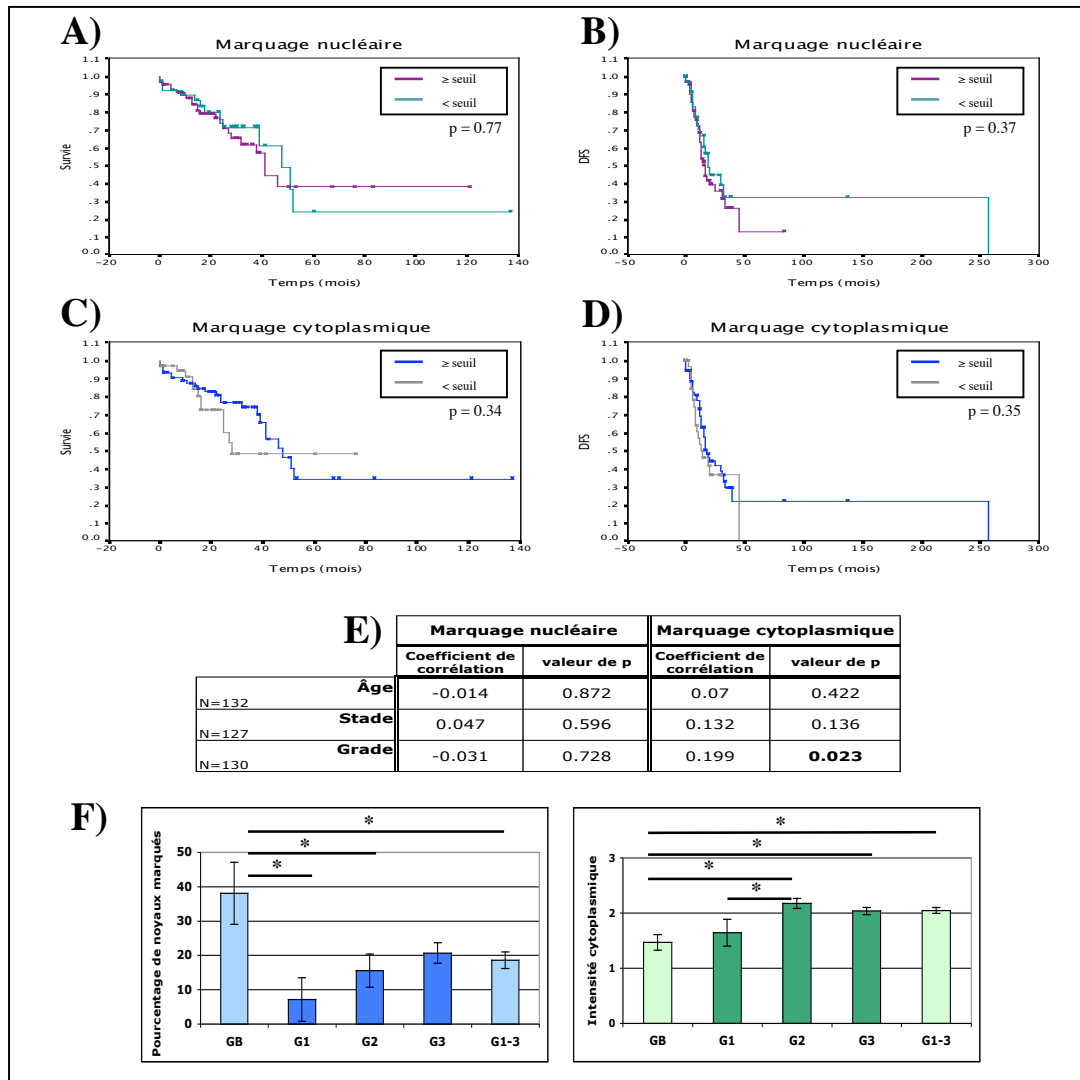


Figure 31 : Relation entre l'expression de la SERPINA1 et les différents paramètres cliniques de la maladie. Graphiques de Kaplan-Meier représentant l'expression de la SERPINA1 au niveau nucléaire (A) et cytoplasmique (C) en fonction de la survie des patientes atteintes de tumeurs séreuses du cancer épithélial de l'ovaire. Graphiques de Kaplan-Meier représentant l'expression de la SERPINA1 au niveau nucléaire (B) et cytoplasmique (D) par rapport à la DFS (Disease-free survival ou survie sans maladie) des patientes atteintes de tumeurs séreuses ovariennes. E) Corrélation de Spearman entre les différents paramètres cliniques et le marquage nucléaire et cytoplasmique de la SERPINA1 au niveau des tumeurs séreuses. F) Relation entre les tumeurs séreuses LMP (GB) et les tumeurs séreuses TOV (G1 à G3) en fonction du pourcentage de noyaux marqués et de l'intensité cytoplasmique par un test statistique de Mann-Whitney (*: $p < 0.05$). Puisque la SERPINA1 est une protéine sécrétée, cela peut expliquer son expression différentielle entre les tumeurs LMP et TOV au niveau cytoplasmique (voir section 4.8 de la discussion).

3.4.4 Capacité des différents clones à former des tumeurs dans les souris SCID

L'habilité des différents clones à former des tumeurs dans des souris SCID femelles a finalement été évaluée. Six souris par groupe ont été utilisées, soit le plus petit nombre nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Un million de cellules tumorales ont été injectées sous la peau (injection sous-cutanée) au niveau du flanc gauche de chacune des souris. Deux fois par semaine, les tumeurs ont été mesurées. Nous avons présenté le volume des tumeurs de chacune des souris en fonction du temps, donc selon le nombre de jour suivant l'injection de cellules. Le volume tumoral du groupe de souris ayant reçu les cellules TOV 112D non-transfectées (112-WT) est pratiquement identique au groupe de souris ayant été injecté avec les cellules 112-S2 surexprimant la SERPINA1 (Figure 32A). Nous avons cependant remarqué un léger retard de la croissance des tumeurs pour le groupe ayant reçu les cellules 112D-S4 surexprimant aussi la SERPINA1. Un retard encore plus élevé, d'environ 2 semaines a été observé pour le groupe ayant reçu les cellules C112D-B, bien que les tumeurs aient tout de même réussies à atteindre le même volume que les autres groupes. Ce résultat s'est manifesté au niveau de la survie des souris (Figure 32B). De plus, les tumeurs de 2 souris sacrifiées par groupe ont été mises en culture afin de vérifier si la SERPINA1 était toujours exprimée dans les tumeurs. Par ELISA, nous avons pu montrer que les tumeurs issues de clones surexprimant la SERPINA1 sécrètent toujours la SERPINA1 et non celles issues des clones contrôles.

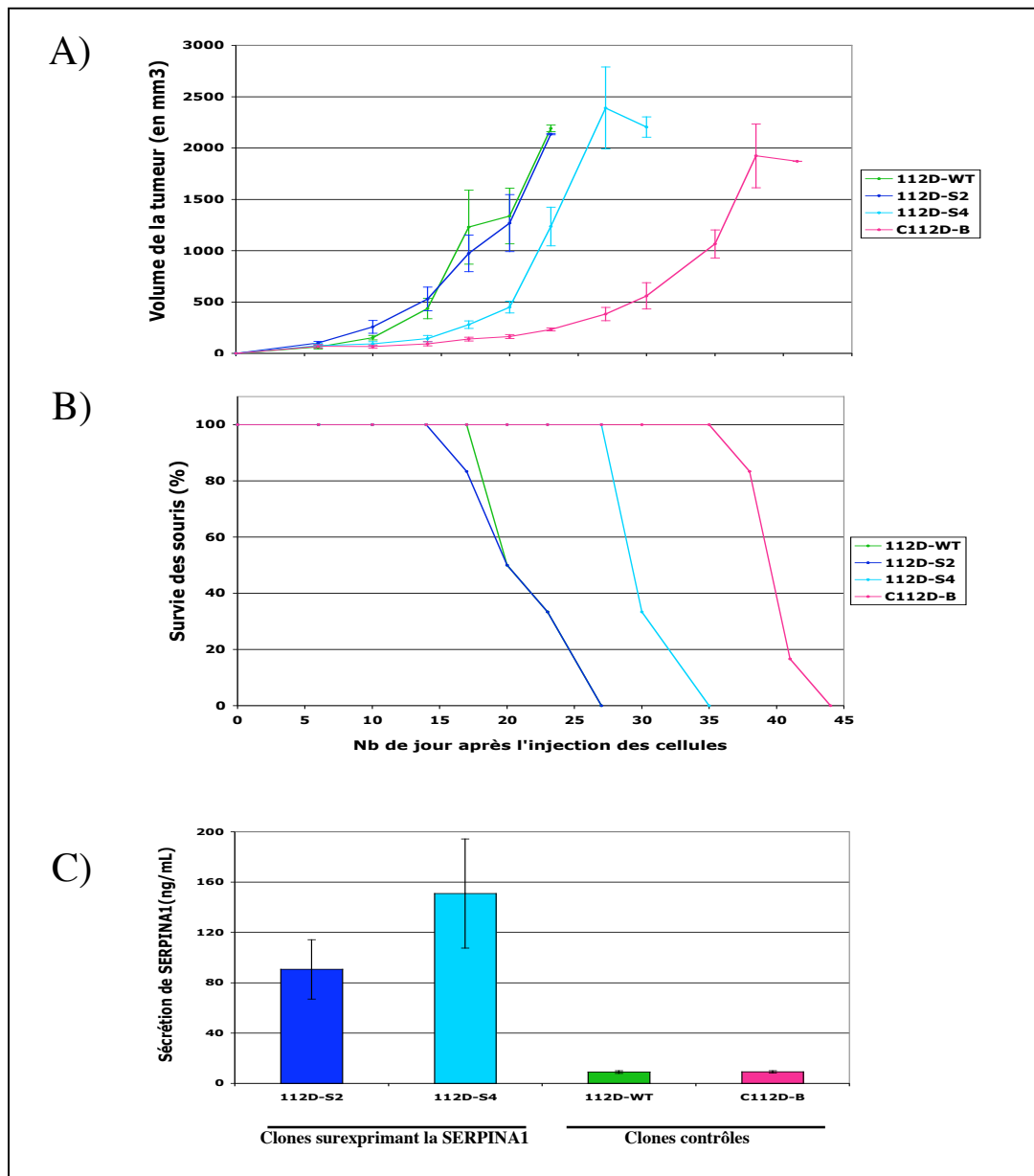


Figure 32 : Capacité des clones dérivés de la lignée TOV 112D à former des tumeurs dans les souris SCID. A) Volume des tumeurs de chacune des souris selon les différents groupes (6 souris par groupe), en fonction du nombre de jour suivant l'injection des cellules tumorales. B) Taux de survie des souris selon les différents groupes, en fonction du nombre de jour suivant l'injection des cellules tumorales. C) Taux de SERPINA1 dans le surnageant des tumeurs mises en culture après 72 heures, mesuré par ELISA (2 souris par groupe). (112D-S2 et S4: clones surexprimant la SERPINA1, 112D-WT : lignée non-transfectée, C112D-B: clone contrôle). Cette étude *in vivo* a été réalisée une seule fois.

- Chapitre 4 DISCUSSION

4.1 Comparaison entre la quantité d'ARNm du gène SERPINA1 obtenue avec le modèle des tissus et celui des cultures primaires

Dans notre laboratoire, la SERPINA1 a été identifiée comme étant surexprimée chez les tumeurs borderlines (LMP) comparativement aux tumeurs invasives (TOV), suite à l'analyse de la micropuce à ADN U133. Un groupe américain a aussi identifié la SERPINA1 en utilisant des tumeurs BOV (ARN de 4 échantillons), LMP (ARN de 4 échantillons) et TOV (ARN de 5 échantillons) de cancer épithélial de l'ovaire. Leurs résultats montrent que la SERPINA1 est faiblement exprimée dans les tumeurs BOV, moyennement dans les tumeurs TOV et plus fortement dans les tumeurs LMP [69]. Bien que nous n'avons pas utilisé la même micropuce à ADN, ni la même analyse d'identification des gènes, il est intéressant de constater que le profil d'expression de la SERPINA1 que nous avons obtenu par la PCR en temps réel avec nos 35 échantillons de tissus (Figure 21A) corrèle avec leur résultat. De plus, une étude d'un groupe japonais a montré que la SERPINA1 est un gène sous-exprimé dans les tumeurs hormono-réfractaires (25 échantillons) comparativement aux tumeurs hormono-sensibles (10 échantillons) dans le cancer de la prostate [70]. Bien que ce ne soit pas le même type de cancer, nos résultats vont dans le même sens qu'eux, puisque les tumeurs hormono-réfractaires du cancer de la prostate sont beaucoup plus agressives que les hormono-sensibles, entre autre parce qu'elles répondent peu aux thérapies.

Pour ce qui est des Q-PCR sur nos échantillons de tissus de cancer ovariens, nous pouvons observer que la moitié des échantillons de tumeurs séreuses LMP expriment très fortement la SERPINA1, alors que trois l'expriment de façon plus modérée et deux que très faiblement. Nous avons donc vérifié les données cliniques de chacune des patientes pour déceler toute corrélation possible. Cependant, les variations observées ne semblent pas avoir de lien avec le stade de la maladie, ni la survie des patientes. À titre d'exemple, les patientes LMP 942G, 984, 1010G et 1064D avaient une tumeur LMP de stade I, ce qui correspond à des stades précoces de la maladie. À l'opposé, les patientes LMP 206D, 796D, 845, 920D, 1101G et 1228G avaient plutôt une tumeur LMP de stade III. Nous avons également voulu voir le lien possible avec la présence ou non d'implants, invasifs ou non-invasifs. Encore une fois, aucune corrélation n'a été observée, puisqu'aucun implant n'a été diagnostiqué chez les patientes LMP 1010G et 1064D, qui présentent un niveau d'expression (en ARNm) différent en SERPINA1. Les patientes LMP 206D, 845 et 920D

présentaient des implants invasifs, alors que chez les patientes LMP 796D, 1101G et 1228G, les implants étaient non-invasifs. À l’opposé, tous les échantillons de tissus TOV présentés sont de type séreux et ils proviennent tous de tumeurs de grade 3, à l’exception de l’échantillon TOV 1148G qui est plutôt de grade 2. Aussi, 10 des 12 tumeurs TOV sont de stade IIIC, à l’exception de la tumeur TOV 1150D qui est de stade IIC, et la tumeur TOV 1054D qui est de stade IB. Ainsi, contrairement aux tumeurs LMP, il semble que le stade de la maladie corrèle avec l’expression (en ARNm) de la SERPINA1, pour les tumeurs TOV. En effet, les tumeurs TOV 1054D et TOV 1150D qui expriment fortement la SERPINA1, sont de stade plus faible que les autres tumeurs TOV, ce qui les rapproche des tumeurs LMP.

Nous avons également pu remarquer une différence dans les profils d’expression de la SERPINA1 sur la micropuce selon l’utilisation des échantillons de tissus ou de cultures primaires. Le modèle du tissu d’origine est plus représentatif de la maladie, mais il n’est pas constitué uniquement de cellules tumorales. Les tissus présentent souvent des contaminants tels que des cellules normales, stromales ou infiltrantes. Cela n’est cependant pas considéré comme un désavantage, puisque ces cellules font généralement partie de l’environnement tumoral *in vivo*. Par contre, nous ne savons pas si ce sont les cellules tumorales, les cellules stromales ou les cellules inflammatoires qui sont responsables de la sécrétion de la SERPINA1. La culture primaire est dérivée de la tumeur originale, et ce modèle est donc enrichi en cellules cancéreuses. Cependant, la mise en culture des cellules, en plus de la perte de l’environnement tumoral, peuvent avoir un impact sur l’expression des gènes, ce qui pourrait aussi expliquer les profils différents d’expression de la SERPINA1 obtenus par ces deux modèles.

4.2 Taux de SERPINA1 dans le plasma sanguin des patientes

Les niveaux de SERPINA1 plasmatiques que nous avons obtenus entre 1 et 2.5 g/L, grâce aux plasmas provenant de 44 patientes différentes, concordent avec ceux (1-2 g/L) retrouvés dans la littérature [52]. La SERPINA1, qui est produite principalement par le foie, est donc une antiprotéase présente en grande quantité dans le plasma sanguin. Une petite augmentation de production au niveau des ovaires par exemple, sera masquée par l’immense production des hépatocytes. La SERPINA1 ne peut donc pas être considérée

comme un marqueur sérique potentiel pour le dépistage du cancer épithélial de l’ovaire ou pour le diagnostic différentiel de la maladie. Nous aurions également pu effectuer cette même expérience, en utilisant plutôt des ascites. En fait, environ 1/3 des patientes atteintes d’un cancer de l’ovaire présentent de l’ascite. Il s’agit d’un épanchement liquidien inflammatoire dans la cavité péritonéale contenant entre autre, des cellules cancéreuses, des lymphocytes et des cellules mésothéliales [71]. Cependant, puisque l’ascite reflète souvent les mêmes profils protéiques que ceux du plasma sanguin en raison de la perméabilité des vaisseaux, il est peu probable de retrouver des différences au niveau de l’ascite des différentes classes tumorales (BOV, LMP, TOV). À noter également que nous n’avons pas vérifié les taux de trypsine et de neutrophile élastase dans le plasma sanguin de nos patientes, afin d’évaluer l’activité inhibitrice de la SERPINA1.

4.3 Sécrétion différentielle de la SERPINA1 dans nos différents clones

Les clones dérivés de la lignée TOV 1946 sécrètent plus de SERPINA1 que ceux dérivés de la lignée TOV 112D. Cependant, cela ne semble pas affecter les différents paramètres biologiques que nous avons étudiés, soit la croissance cellulaire, la capacité d’invasion et de migration des cellules et la formation des sphéroïdes. Nous n’avons pas vérifié l’activité de la SERPINA1 sécrétée par nos différents clones, mais il serait intéressant de le faire. Il est à noter également que pour l’ensemble de nos expériences, les clones dérivés de ces deux lignées cellulaires ne se comportaient pas toujours exactement de la même façon. Cela peut être dû au fait que ces deux lignées ont été dérivées de patientes atteintes de tumeurs différentes. Rappelons que la lignée cellulaire TOV 112D est une lignée de type endométrioïde, alors que la TOV 1946 est une lignée séreuse. La SERPINA1 a été identifiée antérieurement dans notre laboratoire à partir d’échantillons de type séreux. Nous avons surexprimé la SERPINA1 dans la lignée TOV 112D en raison de l’agressivité de cette dernière, mais aussi afin de comparer les effets de cette surexpression sur deux types de cancer ovariens différents.

Nous avons également observé une variabilité entre nos différents clones surexprimant la SERPINA1, mais aussi entre nos clones contrôles, cela pour les deux lignées cellulaires. C’est pourquoi nous avons utilisé, dans l’ensemble de nos expériences, plusieurs clones surexprimant la SERPINA1 et clones contrôles.

4.4 Croissance cellulaire de nos clones surexprimant la SERPINA1

Nous n'avons pas observé de différence au niveau de la croissance cellulaire entre les clones qui surexpriment la SERPINA1 et les clones contrôles. Nous avons utilisé la méthode compte cellulaire, utilisée couramment dans notre laboratoire, sur une période totale de 5 jours (120 heures). Déjà après 4 jours (96 heures), les cellules des clones TOV 1946 étaient presque à confluence dans les plaques de 6 puits, ce qui explique la présence de plateaux ou de pentes descendantes au niveau des courbes (Figure 24B). En ce qui concerne les cellules des clones dérivés de la lignée TOV 112D, les courbes de croissance après 5 jours continuent toujours de monter, excepté pour le clone C112D-C où un plateau est visible. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules de la lignée cellulaire TOV 112D sont plus petites que celles de la TOV 1946, et n'étaient donc pas à pleine confluence au 5^e jour. Ainsi, il aurait pu être intéressant pour les clones dérivés de la lignée TOV 112D d'étendre les expériences de croissance sur une plus longue période. Il est à noter que nous avonsensemencé 200 000 cellules au jour 0 et normalisé le nombre de cellules comptées aux jours 2 à 5 en fonction du nombre de cellules comptées au jour 1 (24 heures), puisque ce ne sont pas les 200 000 cellules qui adhéraient et qu'il y avait de petites variations entre les différents clones. Cela a donc été fait pour que toutes les courbes débutent au même point afin que la comparaison des niveaux de croissance entre les différents clones soit plus facile. Au laboratoire, la caractérisation des différentes lignées cellulaires du cancer de l'ovaire a permis d'observer que le temps nécessaire au dédoublement des cellules est plus court chez la lignée TOV 112D que chez la TOV 1946 [46, 47].

Une étude avec la lignée cellulaire MCF-7 du cancer du sein a montré que la SERPINA1 est en mesure de bloquer le clivage du pro-TGF α lié à la surface des cellules en TGF α . Le TGF α stimule la prolifération et la croissance des cellules MCF-7 en absence d'ancrage, cela de façon autocrine et/ou paracrine. Après avoir surexprimé la SERPINA1 dans les cellules MCF-7 (transfection avec la séquence entière d'ADNc de la SERPINA1), ils ont observé une corrélation inverse entre le niveau de synthèse de SERPINA1 par leurs différents clones et la croissance de ceux-ci en agar mou, donc sans ancrage [72]. À l'opposé, une autre étude, avec la lignée cellulaire métastatique MDA-MB 468 du cancer du sein, a montré cette-fois que la SERPINA1 peut inhiber et aussi promouvoir la prolifération cellulaire, dépendant de la nature de la SERPINA1 utilisée (native ou clivée). En fait, lorsque la SERPINA1 est ajoutée au milieu de culture des cellules MDA-MB et

laissée durant 2 heures, la prolifération est diminuée de 61%. Si par contre, seulement le fragment C-terminal (C-36) de la SERPINA1 est mis en présence de ces cellules, cela a plutôt l'effet d'augmenter la prolifération [73]. Le fragment C-36 (26 résidus) est relâché lors du clivage de la SERPINA1 et a été montré entre autre, comme étant en mesure d'activer les monocytes et aussi comme un inhibiteur *in vitro* de la réplication du virus d'immunodéficience humaine (VIH-1) [74]. Finalement, l'étude de prolifération avec la lignée MDA-MB 468 a été réalisée par un essai d'incorporation de la thymidine et non par des comptes cellulaires. Il semble toutefois que la nature de la forme de la SERPINA1 étudiée a des effets vraiment opposés sur la prolifération cellulaire et peut donc donner lieu à des résultats différents d'une étude à une autre. Il est important de préciser que l'antigène du kit ELISA que nous avons utilisé est en fait la protéine entière de la SERPINA1. Selon la compagnie, il devrait reconnaître les deux formes (active et clivée, mais pas le C-36). Par conséquent, il est difficile de mesurer l'activité antiprotéase de la SERPINA1 normalement observable par la diminution de la concentration de SERPINA1 active dans le milieu.

4.5 Capacité d'invasion de nos différents clones

Puisque la SERPINA1 est un inhibiteur de protéases, nous avons comme hypothèse de départ que la capacité d'invasion des cellules surexprimant la SERPINA1 serait diminuée par rapport aux clones contrôles. En présence d'une matrice poreuse (0.4 mg/mL) de Matrigel, le nombre de cellules invasives est plus élevé chez les clones TOV 112D qui surexpriment la SERPINA1, que chez les contrôles ($p=0.043$) (Figure 25A). Ce résultat étonnant à première vue peut être expliqué par le phénomène de la migration amiboïde.

Dans le même sens que nos résultats, un groupe allemand a montré que, dans une matrice de collagène de faible densité, les cellules de fibrosarcome HT-1080 se déplacent plus vite lorsqu'elles sont en présence d'inhibiteurs de protéases qu'en leur absence, alors que l'inverse se produit dans une matrice de collagène beaucoup plus dense [75]. Ce même groupe a montré qu'en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (qui inhibe la dégradation du collagène à près de 95%), les cellules changent leur comportement migratoire. En fait, malgré cette inhibition, une migration persistante de la part des cellules demeure en présence d'une matrice poreuse. Ils ont aussi remarqués que les cellules mises en présence du mélange d'inhibiteurs sont plus arrondies, moins polarisées et moins

adhérentes. Les cellules sont donc en mesure de compenser cette inhibition des protéases par une migration non-protéolytique ou migration amiboïde qu'ils ont nommé transition mésenchymateuse-amiboïde [76].

Le concept de migration amiboïde a été établi antérieurement en raison du mode de migration de l'amibe, un organisme unicellulaire, capable de se déplacer par de multiples déformations du cytosquelette appelées pseudopodes. Quelques cellules eucaryotes, telles que les lymphocytes T activés et certaines cellules tumorales utilisent ce type de migration pour traverser des barrières tissulaires sans avoir à dégrader la matrice extracellulaire. Généralement, la migration amiboïde implique des cellules isolées, peu ou pas de destruction de la matrice extracellulaire et une adhésion faible (indépendante des intégrines) due à la formation d'un pseudopode suivie d'une déformation active du corps cellulaire (propulsion). Au contraire, la migration mésenchymateuse implique des cellules regroupées, nécessite une polarisation cellulaire avant-arrière, des adhésions focales, une destruction de la matrice extracellulaire et la contraction du cytosquelette [76, 77]. En plus d'être indépendante des protéases, la migration de type amiboïde est de 10 à 30 fois plus rapide que le type mésenchymateux [78].

Avec une matrice synthétique différente et un type cellulaire différent nous observons, pour les clones dérivés de la lignée TOV 1946, le même phénomène que le groupe allemand [75]. La diminution de la capacité d'invasion des clones face à une matrice compacte comparativement à une matrice poreuse est plus importante chez les clones qui surexpriment la SERPINA1 ($p=0.02$). En d'autres mots, cela veut dire que lorsque les cellules sont confrontées à une matrice compacte par rapport à une matrice poreuse, les cellules TOV 1946 surexprimant la SERPINA1 ont une capacité d'invasion d'environ 29%, tandis qu'elle est de 62.5% chez les cellules TOV 1946 contrôles. Ainsi, les clones TOV 1946 surexprimant cette antiprotéase sont presque deux fois plus affectés par ce changement de densité de la matrice par rapport aux contrôles.

L'autre observation possible est le nombre de cellules invasives qui est beaucoup plus élevé chez les clones TOV 112D que ceux des TOV 1946. Puisque les mêmes conditions expérimentales ont été suivies, l'explication la plus probable vient du fait que les cellules de la lignée TOV 112D sont plus petites que celles de la lignée TOV 1946. Ainsi, leur petite taille leur permet de passer plus facilement à travers la matrice et la membrane poreuse.

Les modèles de matrice en trois dimensions miment davantage les conditions *in vivo* par rapport à la culture en monocouche (deux dimensions). Ils nous permettent d'étudier des facteurs spécifiques, dans des conditions respectant la dimension, l'architecture et la polarité des cellules. Cependant la complexité et la diversité des matrices extracellulaires *in vivo*, au niveau de leur organisation et de leur composition, fait en sorte qu'il est difficile de les reproduire *in vitro* [79].

Par exemple, le Matrigel consiste en une préparation de membrane basale extraite des cellules de sarcomes de souris Engelbreth-Holm-Swarm. Nous avons donc choisi d'utiliser ce type de matrice, car cette dernière mime la matrice extracellulaire en étant composée de laminine, de collagène de type IV, de protéoglycanes (héparan-sulfate), d'entactine et de nidogène. Cependant, le Matrigel est une matrice assez hétérogène et peut contenir des facteurs de croissance. Il est connu que le Matrigel diffère des membranes basales retrouvées *in vivo*, car il forme des gels faiblement composés de liaisons croisées (liaisons transversales ou de pontages entre les composantes) [79]. Néanmoins, lorsqu'elle est préparée à de fortes concentrations, la matrice de Matrigel peut être en mesure de limiter la migration des cellules qui sont privées de protéolyse. Cela explique donc pourquoi nous avons observé une diminution accrue de la capacité d'invasion en présence d'une matrice compacte de 1 mg/mL chez les clones surexprimant la SERPINA1 par rapport aux clones contrôles. Par contre, en présence d'une matrice de 0.4 mg/mL, les cellules TOV 112D surexprimant la SERPINA1 pouvaient arriver à se "faufiler" dans le maillage de faible densité, par une simple migration amiboïde. Ainsi, la SERPINA1 est probablement responsable de l'activation de la migration amiboïde chez les clones qui la surexpriment, ce qui leur permettait de migrer plus rapidement dans une matrice poreuse car ils n'avaient pas à dégrader la matrice contrairement aux clones contrôles.

Finalement, il serait intéressant de voir l'effet de la surexpression de la SERPINA1 sur d'autres types de matrice synthétique, bien que nous avons essayé avec du collagène de type I, mais sans succès, puisqu'aucune cellule n'a réussi à traverser la membrane poreuse. Des essais d'invasion en utilisant une couche de cellules endothéliales (HUVEC) à titre de barrière pourraient aussi être envisagés, tout cela dans le but de comparer les profils d'invasion des cellules par rapports aux différentes matrices. Il faut toutefois se rappeler que les matrices en trois dimensions utilisées *in vitro* constituent une simplification de la

matrice extracellulaire *in vivo*, cela en termes de structure et de composantes, puisque toutes les interactions cellules-cellules et les facteurs environnants sont absents.

4.6 Capacité de migration de nos clones surexprimant la SERPINA1

Nous supposons aussi que la migration serait affectée chez les clones qui surexpriment la SERPINA1 par rapport aux contrôles. Pour les clones dérivés de la lignée TOV 1946, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes. Cependant, pour les clones dérivés de la lignée TOV 112D, il semble que les clones qui surexpriment l'antiprotéase migre beaucoup plus vite que les contrôles. Cela rejoint les résultats que nous avons obtenus lors des essais d'invasion. Au microscope, nous avons remarqué que les cellules TOV 112D surexprimant la SERPINA1 étaient plus arrondies que les contrôles, une caractéristique de la transition mésenchymateuse-amiboïde. Les cellules de la lignée TOV 112D non-transfectées sont aussi moins adhérentes que les cellules de la lignée TOV 1946 non-transfectée. En étant donc moins adhérentes initialement, cela leur permet de se déplacer plus rapidement. Ainsi, la surexpression de la SERPINA1 pourrait aider les cellules à développer un mode de migration non-protéolytique pour compenser l'inhibition des protéases. Cela expliquerait peut-être pourquoi un effet est visible chez les clones TOV 112D et non chez les clones TOV 1946.

4.7 Habileté de nos différents clones à former des structures tridimensionnelles

Dans notre modèle *in vitro* tridimensionnel, la surexpression de la SERPINA1 n'a pas eu d'impact au niveau de la morphologie des sphéroïdes, bien que la SERPINA1 était sécrétée dans le surnageant de ceux-ci. Le modèle des gouttelettes inversées permet aux cellules tumorales de former des agrégats en trois dimensions, ce qui se rapproche de la croissance des tumeurs chez les patientes. Toutefois, le microenvironnement tumoral n'est pas présent dans notre modèle *in vitro*, ce qui peut expliquer pourquoi nous n'avons pu observer de différences entre les différents groupes. Afin de créer un microenvironnement plus complexe, l'ajout de différents types cellulaires (des fibroblastes par exemple) dans nos gouttelettes inversées pourrait être expérimenté. En fait, cela permettrait de meilleures interactions cellules-cellules à l'intérieur des sphéroïdes et par conséquent nous donnerait la

possibilité de mieux étudier l'effet de la surexpression de la SERPINA1 sur la formation de structures tridimensionnelles.

4.8 Relation entre l'expression de la SERPINA1 au niveau des échantillons présents sur le microétalage de tissus, et les différents paramètres cliniques de la maladie

La majorité des 237 tissus présents sur le microétalage expriment la SERPINA1, au niveau nucléaire et/ou cytoplasmique, selon différentes intensités. La SERPINA1 est également exprimée dans les tissus ovariens sains et les tumeurs bénignes (résultats non présentés). Ce qui est intéressant, c'est le fait que les 18 lignées cellulaires présentes sur le microétalage n'expriment pas du tout la SERPINA1. Puisque les lignées TOV 112D et TOV 1946, n'expriment pas la SERPINA1 selon les données de la micropuce U133, cela montrent, tout comme notre essai d'immunocytochimie, que notre anticorps anti-SERPINA1 est spécifique. Mais, pourquoi les lignées cellulaires sont-elles complètement négatives au niveau cytoplasmique et nucléaire, alors que les tumeurs invasives expriment la SERPINA1 à des niveaux assez élevés sur le microétalage de tissus (Figure 30B)? Les lignées cellulaires ont pourtant été dérivées à partir de tumeurs invasives. Cela nous fait donc une fois de plus remarquer qu'il existe des différences significatives entre les modèles cellulaires, dans ce cas-ci entre les tissus d'origine et les lignées cellulaires dérivées de ceux-ci. En étant mises en culture, les cellules tumorales sont privées du microenvironnement tumoral d'origine, des interactions avec les cellules stromales, les cellules inflammatoires, les facteurs de croissance, les hormones, les protéases, etc. Elles n'ont donc aucune pression sélective à produire cet inhibiteur de protéases, ce qui peut peut-être expliquer pourquoi la SERPINA1 n'est progressivement plus exprimée au niveau des lignées cellulaires. Par ailleurs, nous ne sommes toujours pas certains si ce sont les cellules épithéliales qui sécrètent la SERPINA1 ou si cette sécrétion provient plutôt des cellules stromales ou inflammatoires. Cependant, puisque nous avons observé un marquage cytoplasmique de la SERPINA1 dans les tissus ovariens du microétalage, cela nous laisse croire que la SERPINA1 peut être du moins, synthétisée par les cellules épithéliales ovariennes.

Ce qui est aussi important de préciser, c'est qu'il nous a été très difficile d'évaluer l'expression de la SERPINA1, puisqu'elle était présente partout, même au niveau du stroma

des tumeurs. Nous n'avons cependant pas considéré le stroma dans notre évaluation compte tenu que celui-ci était souvent marqué dans l'ensemble des échantillons du microétalage.

Nous n'avons pas observé de corrélation significative avec le stade de la maladie et l'âge des patientes, mais uniquement avec le grade tumoral. Les expériences de PCR en temps réel ont confirmé le résultat obtenu avec la micropuce U133, soit que la SERPINA1 est moins exprimée dans les tissus de tumeurs TOV que dans les tissus de tumeurs LMP (Figure 1A). Pourtant, lorsque nous avons comparé les tumeurs LMP avec les tumeurs TOV (tout grades confondus), nous avons observé, au niveau du cytoplasme, que la SERPINA1 est plus présente chez les tumeurs TOV (G1-G3) que chez les LMP ($p < 0.0001$). Cependant, il semble que la SERPINA1 est plus souvent retrouvée au niveau nucléaire chez les tumeurs LMP que chez les TOV. Cela est assez surprenant, puisque la SERPINA1 est une protéine extracellulaire. Quelques membres de la superfamille des serpins sont des protéines intracellulaires et des études sur la SERPINB2 ont montré qu'elle pouvait être à la fois extra et intracellulaire et même être retrouvée dans le compartiment nucléaire [52]. Ainsi, nous ne savons actuellement pas la raison de la localisation nucléaire de la SERPINA1 chez certains des échantillons de tissus ovariens, principalement chez les tumeurs LMP. Nous avons évalué le pourcentage de noyaux marqués dans chacun des échantillons, mais il faut mentionner que ce n'était que très rarement du tout (100%) ou rien (0%). Alors pourquoi la SERPINA1 se retrouve-t-elle au noyau de certaines cellules plus que d'autres? Rappelons que la SERPINA1 est une protéine sécrétée principalement par les hépatocytes, mais aussi par les monocytes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires. Un groupe a aussi montré que les cellules MCF-7 du cancer du sein synthétisent et sécrètent la SERPINA1 [72]. Ainsi, il se peut que la présence de la SERPINA1 au niveau du cytoplasme des cellules épithéliales ovariennes indique qu'elles sont en mesure de synthétiser la SERPINA1 et de la sécréter tout comme les cellules MCF-7. Un autre fait intéressant à noter, est que la majorité des tissus LMP du microétalage présentent un marquage apical de la SERPINA1 (Figure 30B, tissus LMP en bas à gauche), un compartiment cellulaire à partir duquel la sécrétion a lieu. Ce marquage apical n'a pu être observé au niveau des tumeurs TOV, car les cellules épithéliales de ces dernières ont majoritairement perdues leur polarité. Ainsi, le niveau cytoplasmique de SERPINA1 plus faible chez les tumeurs LMP, est peut-être seulement dû au fait que la SERPINA1 est sécrétée par les cellules épithéliales des tumeurs LMP qui ont conservées leur polarité,

contrairement aux tumeurs TOV où la SERPINA1 est accumulée. Nous pourrions supposer que le fait d'être sécrétée par les tumeurs LMP fait en sorte que la SERPINA1 peut pleinement exercer son rôle d'inhibiteurs de protéases, ce qui pourrait expliquer pourquoi les tumeurs LMP ne sont pas invasives et offrent un meilleur pronostic aux patientes atteintes, mais cela reste à confirmer.

Actuellement, nous ne savons pas si la SERPINA1 est réellement synthétisée par des types cellulaires autres que ceux mentionnés précédemment, bien que quelques études ont montré son expression dans différents tissus. Par exemple, l'expression de la SERPINA1 a été montrée dans les îlots pancréatiques, au niveau des reins (anse de Henle, tubules corticaux), de la muqueuse gastrique et intestinale, dans le sperme et dans les follicules pileux [55]. Une étude a même établi que la SERPINA1 est présente dans les cellules épithéliales normales, dans le stroma et dans les cellules tumorales de l'ovaire [80]. Les auteurs de cette étude ne pouvaient par contre pas se prononcer à savoir si la SERPINA1 est synthétisée dans l'ovaire ou si sa présence est due à un phénomène d'endocytose de la part des cellules ovariennes. Ils soutiennent également que la présence de la SERPINA1 au niveau du stroma pourrait servir à prévenir l'autodigestion du tissu ovarien par les enzymes protéolytiques impliquées dans le processus de l'ovulation. Cela pourrait ainsi expliquer pourquoi la SERPINA1 est présente autant dans les tissus ovariens normaux que tumoraux.

De plus, l'expression de la neutrophile élastase n'est pas connue dans le cancer de l'ovaire, alors que la trypsine est retrouvée dans environ 50% des tumeurs TOV, comparativement à 20% des tumeurs LMP [61]. La trypsine, qui rappelons-le peut être inhibée par la SERPINA1, est par contre absente chez les ovaires normaux et les tumeurs bénignes, ce qui pourrait aussi expliquer pourquoi la SERPINA1 est différentiellement exprimée aux niveaux des tissus ovariens sains et tumoraux.

Il est aussi important de mentionner que nous avons sélectionné uniquement les échantillons de type séreux pour effectuer les corrélations, puisque la SERPINA1 a été identifiée antérieurement au laboratoire dans des échantillons de tumeurs séreuses. Nous avons effectué les analyses statistiques et aucune corrélation entre les types histopathologiques et le marquage nucléaire ou cytoplasmique n'est ressortie. Les graphiques de Kaplan-Meier n'ont pas non plus montré de relation entre le marquage nucléaire ou cytoplasmique et la survie des patientes lorsque toutes les histopathologies étaient conservées pour l'analyse. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de relation entre la

survie (totale et sans maladie) des patientes et le marquage nucléaire ou cytoplasmique en présence des tumeurs séreuses exclusivement. Nous avons même vérifié la survie des patientes sur 5 ans et la survie sans maladie sur 18 mois, sans toutefois améliorer les valeurs statistiques. Dans le cancer de l'estomac, une étude a toutefois montré qu'une forte expression de SERPINA1 est inversement associée avec la survie sans maladie et la survie totale des patientes atteintes [81]. Dans le cancer colorectal, une expression forte en SERPINA1 va de pair avec un mauvais pronostic [82], même observation au niveau du cancer des poumons [83]. Ainsi, toutes ces études vont en quelque sorte à l'encontre de la nôtre, puisque nous avons identifié la SERPINA1 comme étant surexprimée dans les tumeurs LMP, qui ont un très bon pronostic, par rapport aux tumeurs TOV. Nous avons obtenu ce résultat par micropuce à ADN et par Q-PCR, des techniques qui nécessitent l'utilisation de l'ARN, contrairement à ces autres études qui ont plutôt utilisé l'immunohistochimie. De plus, comme il a été mentionné précédemment, il était très difficile d'évaluer l'expression protéique de la SERPINA1 sur notre microétalage de tissus, surtout au niveau cytoplasmique, puisqu'elle semble être sécrétée par les tumeurs LMP et plutôt s'accumuler au cytoplasme dans les tumeurs TOV. Par nos études de PCR en temps réel, nous avons mesuré la quantité d'ARNm dans les différents échantillons, alors que par immunohistochimie, nous avons évalué l'expression protéique de la SERPINA1. Ainsi, la sécrétion de la SERPINA1 par les tumeurs LMP pourrait expliquer pourquoi le niveau cytoplasmique de SERPINA1 est moins élevé dans ces tumeurs que chez les tumeurs TOV, alors que l'inverse est observé en Q-PCR. L'ARNm de la SERPINA1 est présente en quantité plus faible dans les tumeurs TOV, mais si un blocage fait en sorte qu'elle ne peut pas être sécrétée, cela supporte le fait que la SERPINA1 est accumulée dans le cytoplasme des tumeurs TOV comparativement aux LMP. Par ailleurs, ce qui peut aussi expliquer les différences que nous avons obtenues entre notre étude d'immunohistochimie et nos PCR en temps réel, c'est que les échantillons de tissus présents sur le microétalage ont été prélevés spécifiquement dans des zones tumorales. De l'autre côté, l'ARN extrait des tissus provient de l'homogénéisation d'une partie de la tumeur, le pourcentage de tumeur dans cette dernière n'étant pas connu, ni la proportion de cellules stromales et inflammatoires. De plus, de façon générale, il y a plus de stroma dans les tumeurs LMP comparativement aux tumeurs TOV. Tout cela fait donc en sorte qu'il est difficile de comparer les résultats obtenus par Q-PCR avec ceux obtenus par immunohistochimie, sachant que nous ne savons

actuellement pas si ce sont les cellules tumorales, stromales et/ou inflammatoires qui sécrètent la SERPINA1.

4.9 Capacité de nos différents clones à former des tumeurs dans les souris SCID

L'étude *in vivo* dans les souris immunodéficiences SCID est un modèle d'étude représentatif de la maladie. Au laboratoire, une étude antérieure nous a permis de constater que les cellules de la lignée cellulaire TOV 112D forment des tumeurs dans les souris, et cela de façon très rapide [46, 47].

Pour tous les essais fonctionnels réalisés, nous avons remarqué que les lignées non-transfectées TOV 112D et TOV 1946 ne se comportaient pas de la même façon que les clones contrôles. Cela peut être dû au fait que les cellules des lignées non-transfectées n'ont pas subi de possibles modifications lors de la transfection et la sélection.

Ainsi, aucune différence n'a été observée entre le groupe de souris ayant reçu les cellules 112D-S2 surexprimant la SERPINA1 et le groupe ayant reçu les cellules 112D-WT. De plus, nous avons obtenu un léger retard de croissance des tumeurs chez les souris injectées avec les cellules 112D-S4 qui surexpriment la SERPINA1 comparativement au groupe ayant reçu les cellules 112D-WT. Mais, un retard encore plus important a été noté pour le groupe de souris injecté avec les cellules contrôles plasmide vide C112D-B. Malheureusement, il est difficile de conclure quoique ce soit avec cette étude, puisque les souris qui ont été injectées avec les cellules 112D-WT et C112D-B, donc les souris contrôles, n'ont pas réagi de la même façon en fonction du temps, alors que les cellules 112D-WT et C112D-B sécrètent un niveau semblable de SERPINA1.

Nous avons également effectué cette même expérience, en utilisant cette-fois des injections intrapéritonéales. Cependant, les tumeurs ont été très difficiles à détectées et ne l'ont été qu'au stade où les tumeurs atteignaient la limite établi par le CIPA. Il nous a donc été impossible de suivre l'évolution de la croissance des tumeurs. Nous avons donc conclu que les injections sous-cutanées sont plus appropriées pour nos études, puisqu'elles permettent une meilleure mesure des tumeurs. Une étude est actuellement en cours (injection sous-cutanée) avec les clones dérivés de la lignée TOV 1946, cette-fois avec deux groupes de souris supplémentaires (1946-S1, 1946-S2, 1946-S4, 1946-WT, C1946-A, C1946-B), afin d'améliorer la significativité de nos résultats.

CONCLUSION

Ce projet avait principalement pour but d'étudier les effets de la surexpression de la SERPINA1 sur différents paramètres biologiques, en particulier l'invasion d'une matrice biologique par des cellules tumorales. Nous n'avons pas observé d'effet de la SERPINA1 sur la croissance cellulaire et la formation de structures tridimensionnelles. Par contre, nos résultats de migration cellulaire et d'invasion nous ont permis de mettre en lumière l'activation d'un processus de migration amiboïde chez des lignées de cancer de l'ovaire. Ce mécanisme d'échappement activé chez des cellules tumorales en présence d'inhibiteurs de protéases pose la question de l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses ciblant les protéases. En effet, le peu de résultats obtenus lors des études cliniques utilisant des inhibiteurs de protéases (à l'exception des anti-métalloprotéases) est probablement dû à la compréhension limitée que nous avons de la régulation et des effets des nombreuses protéases du microenvironnement tumoral sur les interactions entre les cellules cancéreuses, mais aussi les interactions entre les cellules tumorales et les cellules saines, les cellules immunitaires et les composants de la matrice extracellulaire. Nos résultats montrent ainsi que selon la porosité de la matrice dans laquelle se trouve les cellules cancéreuses, la présence d'antiprotéases à large spectre telles que la SERPINA1 peut favoriser ou inhiber la migration des cellules. Une thérapie qui cible les protéases peut donc s'avérer efficace dans certains types de cancers mais représenter un mécanisme de résistance aux thérapies pour d'autres cancers. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes protéolytiques intratumoraux est donc essentielle avant le développement d'autres études cliniques. L'étude présentement en cours avec les clones dérivés de la lignée TOV 1946, nous permettra de déterminer si la surexpression de la SERPINA1 a un effet ou non sur le développement et la croissance des tumeurs *in vivo*, dans un modèle murin de xénogreffes. Cette étude pourra également nous apporter les premiers éléments de compréhension pour déterminer si la surexpression de la SERPINA1 par les tumeurs LMP est un simple dérèglement (aléatoire ou programmé) de la machinerie cellulaire ou plutôt un mécanisme de défense développé par l'organisme, visant à limiter la dissémination des cellules cancéreuses en inhibant certaines protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

PERSPECTIVES

Jusqu'à maintenant, nous ne pouvons pas expliquer la différence de marquage de la SERPINA1 observée sur le microétalage de tissus, ni pourquoi elle est localisée quelquefois au noyau des cellules. Par conséquent, les perspectives à court terme de ce projet sont premièrement de réaliser des fractionnements cellulaires sur nos différents clones surexprimant la SERPINA1 afin de voir, par buvardage de type Western, si la SERPINA1 transloque au noyau tel qu'observé en immunohistochimie. L'utilisation de la fluorescence pour étudier la localisation de la SERPINA1 serait également intéressante. De cette façon, nous pourrions déterminer si la localisation de la SERPINA1 dans nos clones qui la surexpriment se rapproche de ce que nous avons obtenu avec les échantillons du microétalage de tissus.

Deuxièmement, il serait aussi très intéressant d'évaluer la croissance cellulaire de nos différents clones dérivés des lignées cellulaires TOV 112D et TOV 1946 en agar mou. Cela nous permettrait de déterminer si la surexpression de la SERPINA1 et potentiellement sa localisation au noyau, a un effet sur la prolifération sans ancrage des cellules dans notre modèle de cancer de l'ovaire, tout comme il a été question avec la lignée cellulaire MCF-7 [72].

À moyen terme, l'établissement de cultures primaires dérivées à partir d'ovaires normaux, de tumeurs bénignes, borderlines et invasives pourrait nous permettre d'étudier la sécrétion de la SERPINA1 par ces cellules. Compte tenu que les cellules ovariennes en culture primaire sont privées du microenvironnement tumoral, entre autre des cellules stromales et du système immunitaire, nous pourrions prouver par ELISA que les cellules ovariennes sécrètent bel et bien la SERPINA1. La présence de SERPINA1 dans le surnageant des cultures primaires LMP expliquerait pourquoi la SERPINA1 est exprimée au niveau apical des tumeurs LMP sur le microétalage de tissus. D'un autre côté, l'absence de cette antiprotéase dans le surnageant des cultures primaires TOV nous indiquerait que les tumeurs TOV ne sont pas en mesure de sécréter la SERPINA1, ce qui expliquerait aussi pourquoi elle est plus présente au niveau cytoplasmique chez ces tumeurs comparativement aux tumeurs LMP sur le microétalage de tissus.

Il serait finalement intéressant d'identifier les cibles de la SERPINA1 dans le cancer épithélial de l'ovaire. Par ELISA et au moyen de différents substrats, la présence et l'activité de plusieurs protéases pourraient être testées sur les surnageants, les extraits cytoplasmiques et les extraits nucléaires des clones contrôles et des clones surexprimant la SERPINA1. Cela nous permettrait de déterminer si la SERPINA1 transloque au noyau en raison de sa trop grande concentration dans les tumeurs LMP qui la surexpriment, ou si elle s'y retrouve pour aller inhiber certaines protéases nucléaires. Par conséquent, l'identification de protéases peut-être nouvelles, pouvant jouer un rôle dans la progression tumorale et être inhibées par la SERPINA1 dans les tumeurs LMP et non dans les tumeurs TOV, pourraient éventuellement être utilisées comme cibles thérapeutiques potentielles pour les tumeurs invasives du cancer épithélial de l'ovaire.

- Chapitre 5 BIBLIOGRAPHIE

1. Heffner, L.J., *Reproduction humaine*. De Boeck Université ed. 2003. 128 pages.
2. Nordqvist, K., *Sex differentiation -- gonadogenesis and novel genes*. Int J Dev Biol, 1995. **39**(5): p. 727-36.
3. Satoh, M., *Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos*. J Anat, 1991. **177**: p. 85-107.
4. Wilhelm, D., S. Palmer, and P. Koopman, *Sex determination and gonadal development in mammals*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 1-28.
5. Campbell, N.A., *Biologie*. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc ed. 1995, Montréal. 1190 pages.
6. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
7. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 255-88.
8. Guyton, A.C., *Précis de physiologie médicale*. PICCIN ed. 2003. 1048 pages.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
10. *Statistiques canadiennes sur le cancer 2008*. 2008, Société canadienne du cancer, Institut National du cancer du Canada, Statistique Canada, Registres du cancer des provinces et des territoires, Agence de la santé publique du Canada.
11. Colombo, N., et al., *Ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **60**(2): p. 159-79.
12. Salehi, F., et al., *Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008. **11**(3-4): p. 301-21.
13. Purdie, D.M., et al., *Body size and ovarian cancer: case-control study and systematic review (Australia)*. Cancer Causes Control, 2001. **12**(9): p. 855-63.
14. Benedet, J.L., *Staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecologic cancers*. 2000, FIGO.
15. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **247**(1-2): p. 4-21.
16. Hanna, L. and M. Adams, *Prevention of ovarian cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006. **20**(2): p. 339-62.
17. Landen, C.N., Jr., M.J. Birrer, and A.K. Sood, *Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(6): p. 995-1005.
18. Colombo, N., et al., *Management of ovarian stromal cell tumors*. J Clin Oncol, 2007. **25**(20): p. 2944-51.
19. Boyle, K.J. and S. Torrealday, *Benign gynecologic conditions*. Surg Clin North Am, 2008. **88**(2): p. 245-64, v.
20. Fader, A.N. and P.G. Rose, *Role of surgery in ovarian carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(20): p. 2873-83.
21. Ouellet, V., et al., *Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4672-87.

22. Dietel, M. and S. Hauptmann, *Serous tumors of low malignant potential of the ovary. I. Diagnostic pathology*. Virchows Arch, 2000. **436**(5): p. 403-12.
23. Hart, W.R., *Borderline epithelial tumors of the ovary*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S33-50.
24. Jones, M.B., *Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management*. Clin Obstet Gynecol, 2006. **49**(3): p. 517-25.
25. Harrison, M.L., C. Jameson, and M.E. Gore, *Mucinous ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(2): p. 209-14.
26. Soslow, R.A., *Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 161-74.
27. Kaku, T., et al., *Histological classification of ovarian cancer*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(1): p. 9-17.
28. Cannistra, S.A., *Cancer of the ovary*. N Engl J Med, 2004. **351**(24): p. 2519-29.
29. Silverberg, S.G., *Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(1): p. 7-15.
30. Funt, S.A. and H. Hricak, *Ovarian malignancies*. Top Magn Reson Imaging, 2003. **14**(4): p. 329-37.
31. Ahmed, N., E.W. Thompson, and M.A. Quinn, *Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 581-8.
32. Feeley, K.M. and M. Wells, *Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy*. Histopathology, 2001. **38**(2): p. 87-95.
33. Bell, D.A., *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S19-32.
34. Jordan, S., A. Green, and P. Webb, *Benign epithelial ovarian tumours-cancer precursors or markers for ovarian cancer risk?* Cancer Causes Control, 2006. **17**(5): p. 623-32.
35. Chien, J.R., et al., *Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer*. J Cell Biochem, 2007. **102**(5): p. 1117-29.
36. Crum, C.P., et al., *Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer*. Clin Med Res, 2007. **5**(1): p. 35-44.
37. Crum, C.P., et al., *The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(1): p. 3-9.
38. Yin, B.W. and K.O. Lloyd, *Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27371-5.
39. Verheijen, R.H., et al., *CA 125: fundamental and clinical aspects*. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(2): p. 117-24.
40. Landrum, L.M., et al., *Intraperitoneal chemotherapy for patients with advanced epithelial ovarian cancer: a review of complications and completion rates*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(2): p. 342-7.
41. Petignat, P., et al., *Should intraperitoneal chemotherapy be considered as standard first-line treatment in advanced stage ovarian cancer?* Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **62**(2): p. 137-47.

42. Provencher, D.M., [*Intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer: a complex strategy but what an exciting avenue!*]. *Bull Cancer*, 2006. **93**(9): p. 959-60.
43. Armstrong, D.K., *Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease*. *Oncologist*, 2002. **7 Suppl 5**: p. 20-8.
44. Kruk, P.A., S.L. Maines-Bandiera, and N. Auersperg, *A simplified method to culture human ovarian surface epithelium*. *Lab Invest*, 1990. **63**(1): p. 132-6.
45. Lounis, H., et al., *Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies*. *Exp Cell Res*, 1994. **215**(2): p. 303-9.
46. Ouellet, V., et al., *Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 152.
47. Provencher, D.M., et al., *Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000. **36**(6): p. 357-61.
48. Tonin, P.N., et al., *Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model*. *Oncogene*, 2001. **20**(45): p. 6617-26.
49. Zietarska, M., et al., *Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC)*. *Mol Carcinog*, 2007. **46**(10): p. 872-85.
50. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
51. van Gent, D., et al., *Serpins: structure, function and molecular evolution*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(11): p. 1536-47.
52. Gettins, P.G., *Serpin structure, mechanism, and function*. *Chem Rev*, 2002. **102**(12): p. 4751-804.
53. Silverman, G.A., et al., *The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33293-6.
54. Law, R.H., et al., *An overview of the serpin superfamily*. *Genome Biol*, 2006. **7**(5): p. 216.
55. Carlson, J.A., et al., *Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(1): p. 26-36.
56. Crystal, R.G., *Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(5): p. 1343-52.
57. Kalsheker, N., S. Morley, and K. Morgan, *Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(2): p. 93-8.
58. Lisowska-Myjak, B., *AAT as a diagnostic tool*. *Clin Chim Acta*, 2005. **352**(1-2): p. 1-13.
59. Chohanadisai, W. and B. Lonnerdal, *Alpha(1)-antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: origin, concentrations, and stability*. *Am J Clin Nutr*, 2002. **76**(4): p. 828-33.
60. Soreide, K., et al., *Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis*. *J Pathol*, 2006. **209**(2): p. 147-56.
61. Hirahara, F., et al., *Differential expression of trypsin in human ovarian carcinomas and low-malignant-potential tumors*. *Gynecol Oncol*, 1998. **68**(2): p. 162-5.

62. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.
63. Sato, T., et al., *Neutrophil elastase and cancer*. Surg Oncol, 2006. **15**(4): p. 217-22.
64. Yamashita, J., M. Ogawa, and T. Shirakusa, *Free-form neutrophil elastase is an independent marker predicting recurrence in primary breast cancer*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(3): p. 375-8.
65. Akizuki, M., et al., *Prognostic significance of immunoreactive neutrophil elastase in human breast cancer: long-term follow-up results in 313 patients*. Neoplasia, 2007. **9**(3): p. 260-4.
66. Lomas, D.A. and R. Mahadeva, *Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1585-90.
67. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
68. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
69. Warrenfeltz, S., et al., *Gene expression profiling of epithelial ovarian tumours correlated with malignant potential*. Mol Cancer, 2004. **3**: p. 27.
70. Tamura, K., et al., *Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles*. Cancer Res, 2007. **67**(11): p. 5117-25.
71. Puiffe, M.L., et al., *Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer*. Neoplasia, 2007. **9**(10): p. 820-9.
72. Yavelow, J., et al., *Alpha 1-antitrypsin blocks the release of transforming growth factor-alpha from MCF-7 human breast cancer cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(3): p. 745-52.
73. Zelvyte, I., S. Lindgren, and S. Janciauskiene, *Multiple effects of alpha1-antitrypsin on breast carcinoma MDA-MB 468 cell growth and invasiveness*. Eur J Cancer Prev, 2003. **12**(2): p. 117-24.
74. Congote, L.F., *The C-terminal 26-residue peptide of serpin A1 is an inhibitor of HIV-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(2): p. 617-22.
75. Wolf, K., et al., *Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 893-904.
76. Wolf, K., et al., *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 267-77.
77. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
78. Wong, S.Y. and R.O. Hynes, *Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide?* Cell Cycle, 2006. **5**(8): p. 812-7.
79. Even-Ram, S. and K.M. Yamada, *Cell migration in 3D matrix*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 524-32.
80. Bagdasarian, A., et al., *Isolation of alpha 1-protease inhibitor from human normal and malignant ovarian tissue*. J Clin Invest, 1981. **67**(1): p. 281-91.

81. Allgayer, H., et al., *Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(1): p. 62-73.
82. Karashima, S., et al., *Prognostic significance of alpha-1-antitrypsin in early stage of colorectal carcinomas*. Int J Cancer, 1990. **45**(2): p. 244-50.
83. Higashiyama, M., et al., *An evaluation of the prognostic significance of alpha-1-antitrypsin expression in adenocarcinomas of the lung: an immunohistochemical analysis*. Br J Cancer, 1992. **65**(2): p. 300-2.

- Chapitre 6 ANNEXE

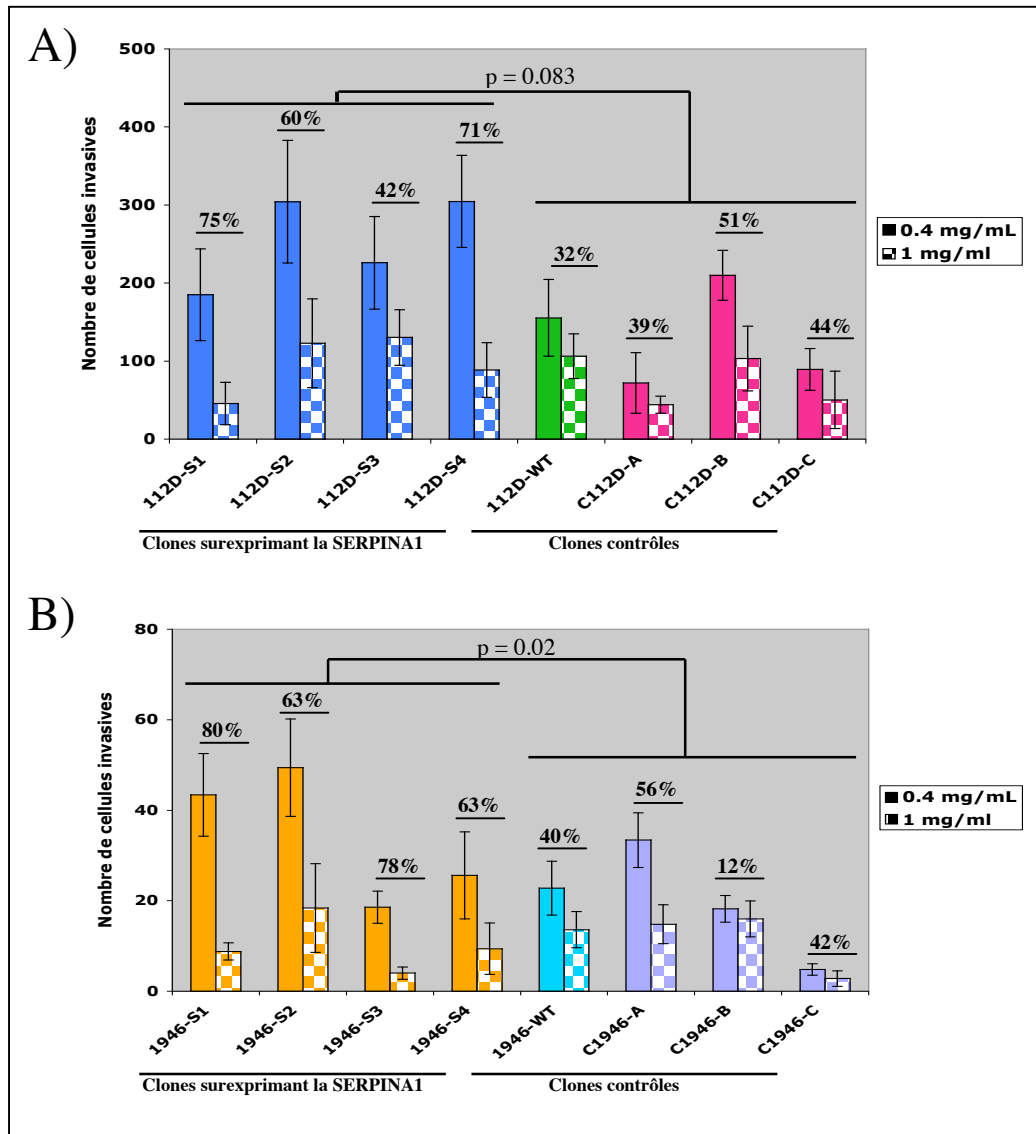


Figure 33: Capacité des différents clones à envahir une matrice de Matrigel compacte et poreuse. Taux d'invasion (dégradation et migration) des différents clones dérivés de la lignée TOV 112D (A) et de la lignée TOV 1946 (B). Après 24 heures, les cellules non invasives ont été retirées et les cellules invasives ont été comptées grâce à un microscope inversé. L'expérience a été réalisée à 3 reprises. Deux concentrations de Matrigel ont été utilisées, soit 0.4 mg/mL (histogrammes pleins) et 1 mg/mL (histogrammes quadrillés). En A) et B), la diminution de la capacité d'invasion de chacun des clones face à une matrice compacte (1 mg/mL), en comparaison à une matrice poreuse (0.4 mg/mL) est indiquée (% de diminution). Des analyses statistiques de Mann-Whitney ont été effectuées afin de comparer la capacité d'invasion (en %) des cellules surexprimant la SERPINA1 par rapport aux contrôles. (112D-S1 à S4 et 1946-S1 à S4 : clones surexprimant la SERPINA1, 112D et 1946-WT : lignées non-transfectées, C112D-A à C et C1946-A à C : clones contrôles).