

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire de la résistance aux inhibiteurs de PARP dans le cancer épithélial de l'ovaire par le biais de modèles cellulaires diversifiés

*Par*

Skye Sauriol

Faculté de médecine

Programmes de biologie moléculaire

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en biologie moléculaire, option maladies complexes humaines

Avril 2022

© Skye Sauriol, 2022

Université de Montréal

Unité académique : Département de médecine, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

**Caractérisation moléculaire de la résistance aux inhibiteurs de PARP dans le cancer de l’ovaire de type séreux de haut grade par le biais de modèles cellulaires diversifiés**

*Présentée par*

**Skye Sauriol**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Derek Boerboom**

Président-rapporteur

**Anne-Marie Mes-Masson**

Directrice de recherche

**Diane Provencher**

Codirectrice

**Gerardo Ferbeyre**

Membre du jury

**Guy Poirier**

Examineur externe

**Nathalie Labrecque**

Représentante de la doyenne

## Résumé

Le cancer de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus létal, et cinquième cause de mort attribuable au cancer chez les femmes nord-américaines. La létalité de cette maladie est due notamment à sa détection tardive, à sa forte hétérogénéité, et à sa résistance au traitement. L’amélioration du sort des patientes atteintes du cancer de l’ovaire passera donc par une meilleure caractérisation de la maladie, ce qui inclut la découverte de biomarqueurs et le développement de voies de traitement efficaces. Pour ce faire, des modèles d’étude représentatifs et bien caractérisés sont nécessaires, et la nature hétérogène du cancer de l’ovaire souligne le besoin d’un grand nombre de modèles diversifiés sous plusieurs aspects.

Les modèles cellulaires sont une option peu dispendieuse et facile à entretenir, avec lesquels il est possible d’effectuer des expériences à haut débit. La fiabilité des modèles cellulaires se base sur l’abondance et la diversité, où un grand nombre de lignées cellulaires issues de contextes cliniques et moléculaires variés sont requises pour dresser un portrait représentatif de la maladie. Dans le cadre de cette thèse, dix nouveaux modèles de cancer épithélial de l’ovaire, incluant des lignées de deux sous-types rares, sont décrits et caractérisés rigoureusement. Ces modèles sont diversifiés en phénotypes et en génotypes, et sont démontrés comme représentatifs de la maladie de laquelle ils sont issus. Ces nouvelles lignées, s’ajoutant à plusieurs autres dérivées dans notre laboratoire, pourront servir à étudier le cancer de l’ovaire sous plusieurs aspects.

Notamment, un nombre de ces lignées ont servi à l’étude de la résistance au traitement aux inhibiteurs de la polymérase de poly(ADP-ribose) (PARP), une voie thérapeutique émergente des dix dernières années. Malgré des études prometteuses, plusieurs patientes ne répondent pas au traitement initial, ou cessent de répondre après une durée de traitement, menant à une rechute. Ces deux phénomènes, dits résistance intrinsèque et résistance acquise respectivement, nuisent grandement à la survie des patientes. À l’aide de lignées cellulaires initialement sensibles, nous avons développés des modèles de résistance acquise aux inhibiteurs de PARP par exposition prolongée. Ces lignées dérivées, en combinaison avec des lignées intrinsèquement résistantes, ont mené à la découverte d’un traitement combiné synergique entre les inhibiteurs de PARP et

une autre classe de molécule, les inhibiteurs de la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT). Cette enzyme étant responsable de la synthèse du substrat de PARP, la combinaison de ces deux thérapies éradique de façon efficace les modèles résistants, autant à résistance acquise qu'intrinsèque, et ralentit la croissance tumorale en modèle murin. Les inhibiteurs de PARP étant déjà approuvés, et les inhibiteurs de NAMPT étant déjà en essais cliniques, la combinaison de ces voies thérapeutiques serait facilement envisageable en clinique, et l'universalité de son efficacité pourrait drastiquement améliorer le sort de patientes atteintes du cancer de l'ovaire, n'ayant aucun autre recours efficace.

**Mots-clés** : cancer de l'ovaire, modèles, lignées cellulaires, inhibiteurs de PARP, résistance au traitement, inhibiteurs de NAMPT, synergie, xénogreffes.

## Abstract

Ovarian cancer is the most lethal gynecological cancer, and fifth leading cause of cancer-related deaths in North American women. The lethality of this disease is notably due to its late detection, its strong heterogeneity, and its resistance to treatment. Improving the fate of ovarian cancer patients will require a better characterization of the disease, which includes discovering biomarkers and effective treatment options. To this effect, representative and well characterized study models are required, and the heterogeneous nature of ovarian cancer underlines the need for a vast number of models with diverse characteristics.

Cellular models are an inexpensive and easy to maintain option, with which high throughput experiments are possible. The reliability of cellular models depends on their abundance and diversity, where a large number of cell lines from various clinical and molecular contexts are required to accurately represent the disease. In the context of this thesis, ten new models of epithelial ovarian cancer, including cell lines of two rare subtypes, are described and rigorously characterized. These models are diverse in phenotype and genotype, and are shown to accurately represent the disease from which they are derived. These new cell lines, in addition to many others described in our laboratory, will serve to better study ovarian cancer and its many facets.

Notably, a number of these cell lines were used to study resistance to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor treatment, an emerging therapy of the past ten years. Despite encouraging studies, a number of patients do not respond initially, or cease to respond after a length of treatment, leading to relapse. These two phenomena, dubbed intrinsic and acquired resistance respectively, greatly hinder patient survival. Using initially sensitive cell lines, we developed models of acquired PARP inhibitor resistance by prolonged exposure. These derived cell lines, along with intrinsically resistant cell lines, served to discover a synergistic combination treatment between PARP inhibitors and another class of drugs, nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. NAMPT as an enzyme is mainly responsible for synthesizing PARP's substrate, and the combination of these two therapies effectively inhibits models of both intrinsic and acquired resistance, and slows tumor growth in mice. PARP inhibitors

are already routinely used in the clinic, and NAMPT inhibitors are currently undergoing clinical trials, making this combination of therapeutic options easily conceivable for clinical use in the future, and the universality of its efficacy could drastically improve the fate of ovarian cancer patients who are out of options.

**Keywords** : ovarian cancer, models, cell lines, PARP inhibitors, resistance to treatment, NAMPT inhibitors, synergy, xenografts.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des figures.....	12
Liste des sigles et abréviations.....	13
Remerciements.....	20
Chapitre 1 - Introduction.....	21
1.1    Le cancer.....	21
1.2    Le cancer de l’ovaire.....	21
1.2.1    Létalité.....	22
1.2.2    Facteurs de risque.....	22
1.2.3    Site primaire.....	23
1.2.3.1    Cancer non épithélial de l’ovaire.....	24
1.2.3.2    Cancer épithélial de l’ovaire.....	25
1.2.4    Sites secondaires.....	25
1.3    Le cancer épithélial de l’ovaire.....	26
1.3.1    Caractéristiques moléculaires.....	26
1.3.1.1    Carcinome séreux de haut grade.....	26
1.3.1.2    Carcinome séreux de bas grade.....	27
1.3.1.3    Carcinome mucineux.....	27
1.3.1.4    Carcinome à cellules claires.....	27
1.3.1.5    Carcinome endométriöide.....	28

1.3.2	Modèles d'étude .....	28
1.3.2.1	Modèles à base de tissus .....	28
1.3.2.2	Modèles cellulaires .....	29
1.3.3	Stratégies thérapeutiques cliniques.....	32
1.3.3.1	Détection.....	32
1.3.3.2	Évolution du traitement.....	33
1.3.3.2.1	Thérapies en études cliniques.....	34
1.3.3.3	Traitement de première ligne.....	35
1.3.3.4	Traitement des récurrences.....	35
1.4	Les inhibiteurs de PARP.....	36
1.4.1	Polymérase de poly(ADP-ribose) 1 (PARP1) .....	36
1.4.1.1	Structure .....	37
1.4.1.2	Activité catalytique .....	38
1.4.1.3	Rôles dans la réparation de l'ADN .....	39
1.4.1.3.1	Réparation des cassures simple-brin .....	39
1.4.1.3.2	Réparation des cassures double-brin.....	40
1.4.1.4	Autres rôles nucléaires .....	40
1.4.1.5	Rôles dans le cytoplasme.....	41
1.4.1.6	Rôles dans la mitochondrie.....	41
1.4.1.7	Substrat.....	41
1.4.1.7.1	Biosynthèse du NAD .....	42
1.4.1.7.2	Rôles du NAD.....	43
1.4.2	Mutations BRCA .....	44
1.4.2.1	Létalité synthétique .....	45



1.4.3	Résistance.....	47
1.4.3.1	Résistance intrinsèque.....	47
1.4.3.1.1	Facteurs de résistance intrinsèque.....	48
1.4.3.1.2	Solutions.....	48
1.4.3.2	Résistance acquise.....	49
1.4.3.2.1	Facteurs de résistance acquise.....	49
1.4.3.2.2	Traitements.....	50
1.5	Projet de thèse.....	51
1.5.1	Contexte et problématique.....	51
1.5.2	Hypothèses de recherche.....	51
1.5.3	Objectifs de recherche.....	52
Chapitre 2 – Résultats.....		53
2.1	Article 1 — Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease.....	53
2.1.1	Article 1 — Résumé en français.....	53
2.1.2	Article 1 — Version originale soumise à Cancers.....	54
2.1.2.1	Abstract.....	54
2.1.2.2	Introduction.....	55
2.1.2.3	Results.....	57
2.1.2.4	Discussion.....	66
2.1.2.5	Materials and Methods.....	70
2.1.2.6	Conclusions.....	76
2.1.2.7	Acknowledgments.....	77
2.1.2.8	Supplementary Materials.....	77

2.1.2.9	Author Contributions .....	77
2.1.2.10	Funding.....	78
2.1.2.11	Conflicts of Interest.....	78
2.1.2.12	Figures and Tables.....	79
2.1.2.13	References .....	90
2.1.2.14	Supplementary Figures and Tables.....	99
2.1.2.15	References (Supplementary) .....	112
2.2	Article 2 — Inhibition of NAD salvage counters acquired PARP inhibitor resistance in high-grade serous epithelial ovarian cancer .....	113
2.2.1	Article 2 — Résumé en français .....	113
2.2.2	Article 2 — Manuscrit en préparation .....	114
2.2.2.1	Abstract.....	114
2.2.2.2	Introduction .....	115
2.2.2.3	Results.....	116
2.2.2.4	Discussion.....	119
2.2.2.5	Materials and Methods.....	122
2.2.2.6	Acknowledgments.....	127
2.2.2.7	Conflicts of Interest.....	127
2.2.2.8	Figures and Tables.....	128
2.2.2.9	References .....	133
2.2.2.10	Supplementary Figures and Tables.....	138
Chapitre 3 – Discussion .....		149
3.1	Valeur et impact des résultats .....	149
3.1.1	Modèles d'étude .....	149

3.1.1.1	Données d'expression.....	150
3.1.2	Résistance aux inhibiteurs de PARP .....	153
3.1.2.1	Voies de traitement spécifiques .....	155
3.1.2.2	Voie de traitement universelle .....	161
Chapitre 4 – Conclusions et perspectives .....		165
Références bibliographiques.....		169
Annexes.....		193
A.1	Liste des publications .....	193
A.1.1	Articles publiés .....	193
A.1.2	Articles en préparation.....	193
A.2	Contributions des auteurs.....	194
A.2.1	Article #1 .....	194
A.2.2	Article #2 .....	195
A.3	Figures non publiées .....	196

## Liste des figures

<b>Figure 1 –</b>	Histologie de l’ovaire normal .....	24
<b>Figure 2 –</b>	Lignées de cancer de l’ovaire existantes, extraites de Cellosaurus .....	31
<b>Figure 3 –</b>	Inhibiteurs de PARP approuvés ou en études cliniques.....	34
<b>Figure 4 –</b>	Les dix-sept polymérase de poly(ADP-ribose).....	37
<b>Figure 5 –</b>	Structure protéique de PARP1 .....	38
<b>Figure 6 –</b>	Les trois voies de biosynthèse du NAD .....	43
<b>Figure 7 –</b>	Hypothèses sur la létalité synthétique entre PARPi et mutation BRCA.....	46
<b>Figure 8 –</b>	Classification hiérarchique de nos trente-deux lignées cellulaires de CEO. ....	196
<b>Figure 9 –</b>	Expression génique de marqueurs par nos lignées de CEO. ....	197
<b>Figure 10 –</b>	Sensibilité de dix-sept de nos lignées de CEO à niraparib et talazoparib. ....	198
<b>Figure 11 –</b>	Voies et gènes les plus fortement associés à la résistance intrinsèque. ....	199
<b>Figure 12 –</b>	Intégrine beta-3 comme facteur de résistance.....	200
<b>Figure 13 –</b>	Profil des gènes différentiellement exprimés dans nos lignées dérivées.....	201
<b>Figure 14 –</b>	Implication de la phosphorylation oxydative dans la résistance d’OV1946. ....	202
<b>Figure 15 –</b>	Implication de PARP14 dans la résistance de TOV3041G.....	203
<b>Figure 16 –</b>	Profil des voies de réparation de l’ADN de lignées résistantes. ....	204

## Liste des sigles et abréviations

2D : deux dimensions; bidimensionnel

3-HAA : *3-hydroxyanthranilic acid*

34βE12 : kératines 34βE12

3D : trois dimensions; tridimensionnel

53BP1 : *p53-binding protein 1*

AAAS : *American Association for the Advancement of Science*

ABCB1 : translocase ABCB1 ATP-dépendante

ACMS : alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdéhyde

ACMSD : alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdéhyde décarboxylase

AD : domaine d'auto-modification

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

AMS : alpha- aminomucolate semialdéhyde

ATCC : *American Type Culture Collection*

ATP : adénosine triphosphate

ARID1A : *AT-Rich Interaction Domain 1A*

ARN : acide ribonucléique

ART : ADP-ribosyl transférase

BER : *base excision repair*

BRAF : sérine/thréonine-protéine kinase B-raf

BRCA1 : *breast cancer 1 DNA repair associated*

BRCA2 : *breast cancer 2 DNA repair associated*

BRCT : domaine protéique *BRCA1 C-terminal*

BRIP1 : *BRCA1 Interacting Helicase 1*

CA-125 : *cancer antigen 125*

CAM5.2 : kératines CAM5.2

CAT : domaine catalytique

CCC : carcinome à cellules claires

CCCH : motif cystéine-cystéine-cystéine-histidine

CD20 : antigène des lymphocytes B CD20

CDB : cassure d'AND double-brin

CDK12 : *cyclin dependent kinase 12*

CDKN2A : *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

CDX2 : *caudal type homeobox 2*

CE : carcinome endométrioïde

CEO: cancer épithélial de l'ovaire

CHD1L : *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like*

CHK1 : *checkpoint kinase 1*

CHK2 : *checkpoint kinase 2*

Cl<sub>50</sub> : concentration inhibitrice demi-maximale

CK17 : cytokératine 17

CK20 : cytokératine 20

CM : carcinome mucineux

CNEO : cancer non épithélial de l'ovaire

CSB : cassure d'ADN simple-brin

CSBG : carcinome séreux de bas grade

CSHG: carcinome séreux de haut grade

CSMD3 : *CUB and sushi multiple domains 3*

CTNNB1 : caténine beta 1

DDX21 : hélicase d'ARN nucléolaire 2

DR-GFP : plasmide *direct repeat-green fluorescent protein*

EJ5 : plasmide *end joining 5-green fluorescent protein*

ER: *estrogen receptor*

ERBB2 : *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2*

FAT3 : cadhérine atypique FAT 3

FDA: *Food and Drug Administration*

HD: domaine hélicoïdal

HE4 : *human epididymis protein 4*

HR : *homologous recombination*

IDO : indolamine 2,3-dioxygénase

ITGB3 : intégrine beta-3

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

KEGG : *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

$K_M$  : constante de Michaelis

KMT2B, KMT2D : *lysine methyltransferase 2B, 2D*

KRAS : GTPase KRAS

L-kin : L-kinurenine

LDHA : L-lactate déshydrogénase, chaîne A

MART : mono-ADP-ribosyltransférase

MDPI : *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*

MMR : *mismatch repair*

mTOR : *mechanistic target of rapamycin*

MUC2 : mucine 2

MUC5AC : mucine 5AC

MVP-BD : *major vault protein binding domain*

NAD : nicotinamide adénine dinucleotide

NAAD : acide nicotinique adénine dinucléotide

NAM : nicotinamide

NAMN : acide nicotinique mononucléotide

NAMPT : nicotinamide phosphoribosyltransférase

NAPRT : nicotinate phosphoribosyltransférase

NCCN : *National Comprehensive Cancer Network*

NER : *nucleotide excision repair*

NF1: *neurofibromin 1*

NHEJ : *non-homologous end joining*



NLS : *nuclear localization signal*

NMNAT1-3 : *nicotinamide mononucleotide adénylyltransférase 1-3*

NR : *nicotinamide riboside*

NRAS : *GTPase NRAS*

NT5E : *nucleotidase-5'*

p16 : *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

p38 : *protéine kinase activée par les mitogènes p38*

p53 : *suppresseur de tumeur p53*

PALB2 : *partner and localizer of BRCA2*

PAR : *poly(ADP-ribose)*

PARP : *poly(ADP-ribose) polymerase*

PARP1, PARP2, PARP14 : *poly(ADP-ribose) polymerase 1, 2, 14*

PARPi : *inhibiteur de PARP*

PAX8 : *paired box 8*

PD-L1 : *programmed cell death 1 ligand 1*

PIK3CA : *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PIK3R1 : *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1*

PR : *progesterone receptor*

PTCH1 : *patched homolog 1*

PTEN : *phosphatase and tensin homolog*

QAPRT : *quinolinic acid phosphoribosyltransferase*

RAD51 : *recombinase RAD51*

RAD51C, RAD51D : RAD51 paralogue C, D

RAP80 : sous-unité RAP80 du complexe BRCA1-A

RB1 : *retinoblastoma transcriptional corepressor 1*

RMI : *risk of malignancy index*

ROCA : *risk of ovarian cancer algorithm*

ROMA : *risk of ovarian malignancy algorithm*

SATB2 : *SATB homeobox 2*

siRNA : *small interfering ribonucleic acid*

SLFN11 : membre de la famille Schlafen 11

SOX8 : *SRY-box transcription factor 8*

STAT6 : *signal transducer and activator of transcription 6*

STIC : *serous tubal intraepithelial carcinoma*

STIL : *serous tubal intraepithelial lesion*

STK11 : sérine/thréonine kinase 11

STR : *short tandem repeat*

TDO : tryptophane 2,3-dioxygénase

TP53 : *tumor protein P53*

UV : ultraviolet

VEGF-A : *vascular endothelial growth factor A*

VIT : domaine protéique *vault inter-alpha-trypsin*

vWA : domaine protéique von Willebrand de type A

WEE1 : kinase de point de contrôle G2 WEE1

WGR : domaine protéique tryptophane-glycine-arginine (W-G-R)

WT1 : *Wilms tumor 1*

WWE : domaine protéique tryptophane-tryptophane-glutamate

XDP: xénogreffe dérivée d'une patiente

ZC3HAV1 : *zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1*

ZIP : modèle de synergie *zero interaction potency*

ZnF : domaine protéique de doigt de zinc (*zinc finger*)

ZnF3 : domaine protéique de doigt de zinc 3 (*zinc finger 3*)

## Remerciements

J'aimerais remercier ma famille, en particulier mes parents Claire et Benoit, et mon partenaire Charlélie, qui ont su m'encourager et me garder motivé dans les moments d'incertitude et de frustration. J'aimerais remercier mon parrain Fred, qui m'a poussé à persévérer en recherche et qui n'a jamais douté de mes capacités. J'aimerais remercier les membres de mon comité de doctorat, Drs Provencher, Poirier, Ferbeyre et Bertrand, pour le partage de leur perspicacité et sagesse, qui auront su me guider à travers mon doctorat. Et surtout, j'aimerais remercier Euridice et Anne-Marie pour leur support tout au long de ma formation; dont la sagacité a été une inspiration, et dont la patience, l'écoute et la considération ont été un point de confort sur lequel j'ai toujours pu compter.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 Le cancer

Un os d'homininé datant de 1.6 à 1.8 millions d'années a été retrouvé en 2016 avec des signes de maladie néoplasique (1), et un papyrus d'Égypte antique d'environ 3000 av. J.-C. illustre un cas de cancer du sein, noté comme incurable (2). Le cancer est une maladie ubiquitaire, présente depuis toujours, autant chez l'Homme que chez les animaux (3). Auparavant considérée comme un décret de mort, le cancer est maintenant beaucoup mieux compris. Nous connaissons plusieurs de ses causes et facteurs accélérateurs, et possédons le savoir-faire pour le traiter. Malgré cela, le cancer demeure l'une des premières causes de mortalité au monde (4); en 2018, 18.1 millions ont été diagnostiqués et 9.5 millions sont morts de causes attribuables au cancer (5).

Le cancer est virtuellement toujours issu d'altérations dans le génome et l'épigénome des cellules (6, 7). Ces mutations sont spontanées, mais peuvent découler de diverses sources, soient héréditaires ou environnementales (8). Les sources environnementales incluent le tabac (9), la radiation UV (10), l'infection à certains virus (11-13) et l'exposition à plusieurs autres substances carcinogènes (14). Les sources dites héréditaires sont des mutations germinales, transférables verticalement, qui induisent souvent une instabilité génomique et favorisent l'apparition de mutations tumorigènes. Un grand nombre de ces facteurs, nommés syndromes de prédisposition, ont été découverts au fil du temps (15). Le premier de ces gènes, étudié en 1986, est la mutation du gène *RB1*, qui prédispose au rétinoblastome (16). Depuis, plusieurs autres ont été élucidés, dont la mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, qui prédisposent au cancer du sein et de l'ovaire (17).

## 1.2 Le cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est un cancer peu fréquent, représentant environ 2.3% de tous les cas de cancer diagnostiqués chez les femmes américaines (18). Au Canada, cette statistique était estimée à 2.8% pour 2020 (19). Malgré son faible taux d'incidence, le cancer de l'ovaire est la cinquième plus importante cause de mort attribuable au cancer chez les femmes nord-

américaines. Environ 5% des morts par cancer chez les femmes est dû au cancer de l'ovaire (18, 19), avec un taux moyen de survie à 5 ans estimé à 47% (29% au stade avancé (20)), le classant comme le cancer gynécologique le plus létal (20, 21).

### **1.2.1 Létalité**

La létalité du cancer de l'ovaire est attribuable à plusieurs caractéristiques définissant la malade. Notamment, les symptômes vagues et non spécifiques qui l'accompagnent mènent à une détection tardive, lorsque la maladie est déjà à un stade avancé dans 70% des cas (22). Il arrive également que les patientes atteintes de la maladie n'aient pas de symptômes discernables (20, 22, 23). L'hétérogénéité du cancer de l'ovaire, autant entre les sous-types qu'entre les patientes d'un même sous-type, voire même entre les populations cellulaires au sein d'une même tumeur, contribuent grandement à la difficulté du traitement et à la létalité de la maladie (24). Puis, une grande partie de la létalité du cancer de l'ovaire est attribuable à la résistance au traitement. En effet, 15% à 25% des patientes ne répondent pas au traitement initial (25) (résistance intrinsèque), et une majorité de celles qui répondent rechutent éventuellement avec une maladie résistante, dite à résistance acquise (25-27).

### **1.2.2 Facteurs de risque**

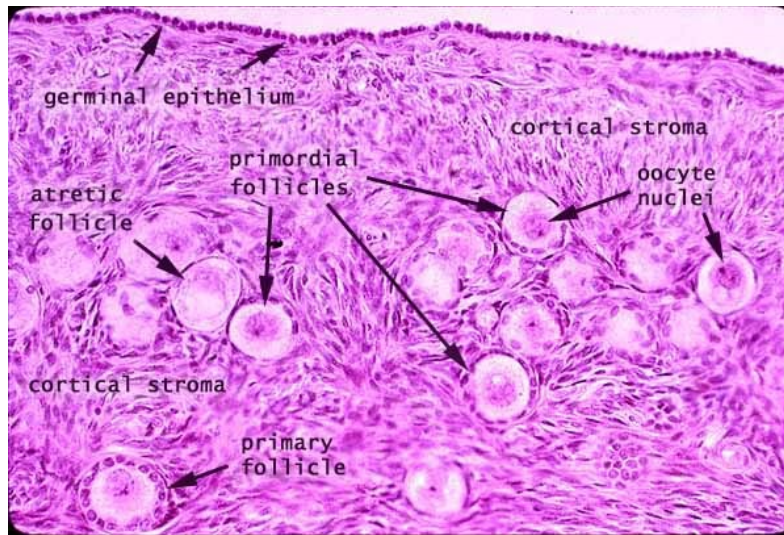
Un lien de prédisposition significatif a été établi entre le cancer de l'ovaire et plusieurs facteurs, génétiques ou autres. L'historique familial et la présence de mutations germinales sont une cause importante de cette maladie : en effet, ces facteurs sont impliqués dans environ 10% des cas de cancer de l'ovaire, la majorité de ceux-ci étant dus spécifiquement à une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2*, des gènes impliqués dans la voie de la recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR) de la réparation de l'ADN (22, 28, 29). En présence d'une mutation dans l'un de ces deux gènes, le risque cumulatif du cancer de l'ovaire passe de 1.6% à 40% et 18%, respectivement (22, 28). Le syndrome de Lynch, caractérisé par la mutation de l'un des gènes de la voie de réparation des mésappariements (*mismatch repair*, MMR) de la réparation de l'ADN (30), est un autre facteur de risque génétique important dans le cancer de l'ovaire, faisant passer le risque de maladie à 10-12% (22, 31). Plusieurs autres mutations génétiques, incluant les gènes *STK11*, *PTCH1*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* et *RAD51D*, augmentent significativement les chances de

développer un cancer de l'ovaire (20, 32, 33). Comme la prédisposition génétique est héréditaire, un test de dépistage routinier chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire pourrait aider à la surveillance et la gestion du cancer familial de l'ovaire (34).

D'autres facteurs non génétiques, tel la cigarette, l'endométriose, l'alimentation et l'ethnicité, ont été démontrés comme pouvant impacter l'incidence de la maladie (22). Une corrélation positive entre l'incidence du cancer de l'ovaire et le nombre cumulatif d'ovulations, soit dû à l'âge, la ménopause tardive, la nulliparité et/ou la puberté précoce, a également été établie (20, 23, 35).

### **1.2.3 Site primaire**

Les ovaires sont des organes ellipsoïdes suspendus entre l'utérus et les parois latérales pelviennes, reconnaissables par la présence de follicules (36), et servent à la production des gamètes (ovules) et d'hormones (notamment l'estrogène, la progestérone et l'inhibine) (37). Le cancer de l'ovaire est en réalité un ensemble de maladies distinctes affectant l'ovaire. Une première distinction est faite selon les cellules d'origine de la tumeur à même l'ovaire, soient épithéliales, germinales ou stromales (38). Les cellules épithéliales forment une couche de surface autour de l'ovaire (39, 40), les cellules germinales (ou ovocytes), contenues dans les follicules, sont les cellules reproductrices (39, 40), et les cellules stromales constituent le tissu interstitiel de l'ovaire (40, 41) (Figure 1). Les carcinomes épithéliaux ayant comme site primaire le péritoine ou les trompes de Fallope sont aussi généralement regroupés dans le cancer épithélial de l'ovaire (CEO), puisque ces tumeurs se propagent rapidement aux ovaires (42).



**Figure 1 –** Histologie de l’ovaire normal<sup>1</sup>.

### 1.2.3.1 Cancer non épithélial de l’ovaire

Les tumeurs stromales et des cordons sexuels de l’ovaire représentent environ 7% de tous les cas de cancer de l’ovaire, et sont issues des cellules stromales ou folliculaires (43). La majorité des cas de tumeurs stromales de l’ovaire sont diagnostiqués chez les jeunes patientes (43), et sont généralement de bas grade. Les malignités stromales les plus communes sont les tumeurs de la granulosa (44), mais incluent aussi les tumeurs à cellules de Sertoli et le fibrosarcome (45). Les tumeurs germinales sont plus rares, représentant environ 3% de tous les cas de cancer de l’ovaire, la majorité des cas diagnostiqués chez les adolescentes et femmes de moins de 30 ans (45, 46). Les cas les plus communs de tumeurs germinales sont les dysgerminomes, les tumeurs du sinus endodermique (*yolk sac tumor*) et les tératomes immatures (45, 46). Le reste des cas de cancer de l’ovaire sont les cancers épithéliaux de l’ovaire (CEO), sur lesquels cette thèse se concentrera davantage.

<sup>1</sup> Figure reproduite de sa publication originale avec permission de l’auteur :  
 40. King DG. Ovarian Cortex : Southern Illionois University Carbondale; 2021 [2022]. Disponible: <https://histology.siu.edu/erg/RE007b.htm>



### 1.2.3.2 Cancer épithélial de l'ovaire

Jusqu'à 90% des cas de cancer de l'ovaire sont des CEO (45, 47). Issues des cellules de l'épithélium, la majorité des CEO sont subdivisés en cinq groupes majeurs selon leur morphologie, architecture tissulaire, et caractéristiques moléculaires et histopathologiques. Le sous-type le plus commun est le carcinome séreux de haut grade (CSHG), représentant la majorité (70%) des cas de CEO (24). Le CSHG est généralement compris comme un continuum initié aux trompes de Fallope, passant de cellules épithéliales des trompes paraissant normales qui surexpriment p53 (signature p53), à des lésions cytologiques atypiques (*serous tubal intraepithelial lesion*, ou STIL), puis à une forme morphologiquement reconnaissable de carcinome pelvien (*serous tubal intraepithelial carcinoma*, ou STIC), considérée comme lésion précurseur du CSHG (48, 49).

Les sous-types moins communs sont le carcinome mucineux (CM) (2-3%), le carcinome à cellules claires (CCC) (5-10%), le carcinome endométrioïde (CE) (10%) et le carcinome séreux de bas grade (CSBG) (<5%) (24, 50). Les autres possibles sous-types épithéliaux, incluant les tumeurs de Brenner, les tumeurs à la limite de la malignité (ou « *borderline* »), et les carcinomes indifférenciés ou à cellules mixtes, ne seront traités dans le cadre de cette thèse, mais sont aussi d'intérêt dans le contexte de l'étude du CEO (45).

### 1.2.4 Sites secondaires

L'un des facteurs contribuant grandement à la létalité du cancer de l'ovaire est sa détection tardive chez environ 70% des patientes (51, 52). La détection tardive est généralement accompagnée d'une dissémination des cellules tumorales au péritoine et à l'épiploon, une couche de tissu adipeux couvrant la cavité abdominale, via le liquide péritonéal (53), et cette dissémination est souvent associée à une accumulation d'ascites dans la cavité abdominale dans les stades avancés (52). La propagation de métastases affecte aussi fréquemment les organes proximaux comme le côlon sigmoïde ou la vessie (52, 53). Aux stades plus avancés, les métastases se rendent jusqu'à la plèvre, aux ganglions et au foie (53, 54), via la circulation péritonéale, lymphatique et sanguine (52-55).

## 1.3 Le cancer épithélial de l’ovaire

### 1.3.1 Caractéristiques moléculaires

Les divers sous-types du CEO peuvent être distingués par plusieurs caractéristiques génétiques, protéiques et histologiques, qui sont importantes pour le diagnostic du sous-type de la maladie (56), ainsi que pour distinguer le CEO primaire d’autres pathologies confondantes, comme les cancers gastrointestinaux métastatiques à l’ovaire (57). Notamment, l’expression de cytokératines comme CK7, CK8, CK18 et CK19 peuvent servir à confirmer la nature épithéliale de tumeurs de CEO (58).

#### 1.3.1.1 Carcinome séreux de haut grade

Le CSHG est caractérisé par la perte de fonction de la protéine p53, soit par silençage génétique ou par mutation somatique du gène *TP53*, dans près de 100% des cas (59, 60). Ces mutations ont comme effet la perte d’expression (mutation nulle) de p53, ou la surexpression d’une variante non fonctionnelle de cette protéine, et ces différents profils peuvent avoir des impacts variés sur la tumeur, notamment au niveau des voies de signalisation (61). Il a été suggéré que la perte de fonction de p53 est très précoce, initie et est essentielle au développement de la maladie (62). D’autres gènes moins fréquemment mutés dans le sous-type CSHG incluent *NF1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RB1*, *PTEN*, *CDK12*, *CSMD3* et *FAT3* (59, 60, 63). Cependant, il a été démontré que la mutation des gènes *TP53*, *PTEN* et *RB1* constituerait le noyau de la transformation du CSHG (63). En plus de caractéristiques génétiques, la présence et l’absence de plusieurs marqueurs protéiques et histopathologiques clés permettent l’identification du sous-type CSHG. La protéine WT1 est exprimée dans la majorité des tumeurs séreuse (CSHG et CSBG), mais peu fréquemment dans les tumeurs CE, CCC ou CM (64). Également, la mutation caractéristique de *TP53* des tumeurs CSHG est reflétée au niveau protéique p53 par une expression anormale, soit une surexpression robuste ou une absence d’expression (58), s’agissant d’une caractéristique presque ubiquitaire (mais non exclusive) du sous-type CSHG (58, 62, 65).

#### **1.3.1.2 Carcinome séreux de bas grade**

Contrairement au CSHG, le CSBG est très peu souvent muté au gène *TP53*; les tumeurs portent plutôt fréquemment une mutation dans l'un des gènes de la voie Ras, soit *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* ou *ERBB2* (66, 67). Les tumeurs de type CSBG peuvent être distinguées au niveau protéique par l'expression de WT1, comme les tumeurs CSHG, mais par une expression normale de p53, ainsi qu'une expression irrégulière plutôt que diffuse de la protéine p16 (65).

#### **1.3.1.3 Carcinome mucineux**

Des mutations du gène *KRAS* sont souvent observées dans le CM, ainsi que des mutations occasionnelles de *TP53* et de *ERBB2* (68-70). Des altérations moins fréquentes mais récurrentes des gènes *BRAF* et *CDKN2A* ont également été observées (71). Au niveau protéique, les tumeurs de ce sous-type peuvent être différenciées par l'absence d'expression de marqueurs des autres sous-types : WT1 (CSHG) (58, 64, 65, 72, 73), Napsin A (CCC) (58, 72, 74), et PR et ER (CE) (58, 72, 73, 75, 76). Le carcinome mucineux peut également être confondu avec les tumeurs d'autres organes (colorectales, endométriales, appendiculaires) métastasées aux ovaires (70, 77); l'expression positive de MUC2, de MUC5AC (78) et de PAX8 (79), ainsi que l'expression négative de SATB2, de la villine, de CDX2 et de CK20 (80), peuvent notamment servir pour différencier le CM de l'ovaire primaire des tumeurs métastatiques similaires.

#### **1.3.1.4 Carcinome à cellules claires**

Les CCC sont porteurs des mutations fréquentes des gènes *ARID1A* et *PIK3CA* (81-84), et des mutations récurrentes de *TP53*, *PTEN* et *KRAS* (82). Dans une majorité des cas de CCC, au moins un gène de la voie mTOR est muté, incluant *PIK3CA* et *PTEN* (82, 84). Le CCC peut être identifié par l'expression positive de Napsin A (58, 72, 74) et par l'absence d'expression de WT1 (58, 64, 73). Comme le CM de l'ovaire, le CCC peut être confondu avec le cancer métastatique d'autres organes, notamment le CCC rénal et le cancer de l'endomètre (85-87). L'expression positive de Napsin A et de certaines cytokératines (CK17, 34 $\beta$ E12 et CAM5.2), ainsi que l'expression négative de ER, PR, WT1, neprilysin et ARID1A, peuvent entre autres servir à démarquer le CCC de l'ovaire des autres cancers à caractéristiques similaires (85-88).

### **1.3.1.5 Carcinome endométriöide**

Les CE sont des cancers hétérogènes, fréquemment porteurs de mutations des gènes *CTNNB1*, *KRAS*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *KMT2D*, *KMT2B*, *PTEN*, *ARID1A*, *SOX8* et *TP53* (89-91). Les mutations des gènes *PIK3R1*, *PTEN* et *ARID1A* sont cependant plus fréquentes dans le cancer de l'endomètre que dans le CE de l'ovaire (89, 90, 92). Au niveau protéique, le CE se distingue par son expression de PR et ER (58, 65, 75, 93) et l'absence d'expression de WT1 (58, 65).

### **1.3.2 Modèles d'étude**

La caractérisation du CEO et de ses sous-types en laboratoire est rendue possible par l'étude de modèles dérivés de patientes, représentatifs de la maladie. Chaque modèle a ses forces et faiblesses, et la découverte de biomarqueurs, les études mécanistiques et le développement de traitements passent généralement par une combinaison de plusieurs types de modèles complémentaires.

#### **1.3.2.1 Modèles à base de tissus**

Les modèles à base de tissus sont directement issus d'échantillons tumoraux de patientes atteintes de la maladie. Ce type de modèle est généralement phénotypiquement proche de la tumeur d'origine, et est avantageux par sa représentativité fidèle de la maladie (94). En effet, ces modèles préservent l'architecture et la composition tumorale d'origine, maintenant ainsi l'hétérogénéité intratumorale caractéristique du CEO et, dans plusieurs de ces modèles, les interactions avec le micro-environnement tumoral (95-97). Les xénogreffes dérivées de patientes (XDP) sont l'un de ces modèles, où un échantillon d'une tumeur de patiente est prélevé et greffé à un modèle animal, généralement une souris (95). Le taux d'implantation des tumeurs dans ce genre de système a longtemps été relativement faible, quoique certains protocoles plus récents observent un taux d'implantation amélioré (98, 99). L'utilisation d'animaux lourdement immunodéficients améliore notamment le taux de réussite (95, 100). Le modèle de XDP reconstitue les interactions entre la tumeur et le stroma et maintient l'hétérogénéité intratumorale, mais en plus du faible taux d'implantation, ce modèle est lent, restreint en nombre d'expériences possibles par la quantité d'échantillon, plutôt coûteux, et difficilement accessible pour les centres de recherche non affiliés à un hôpital (95, 96). Malgré que les échantillons

puissent être maintenus par passages en modèle murin pour être utilisés à plus long terme, chaque passage cause une sélection de sous-populations tumorales et des altérations du microenvironnement tumoral (101, 102). Parallèlement aux XDP, la culture de tranches de tissus organotypiques a longtemps été établie comme modèle d'étude tissulaire représentatif de la tumeur et de son organisation, et est encore utilisée aujourd'hui (103-105). Or, il a récemment été démontré que la culture de tranches de tissus est accompagnée de certains problèmes de viabilité et de nécrose, dû à l'hypoxie (106). Un modèle alternatif émergent fait usage de la microdissection tumorale et d'appareils microfluidiques, où un échantillon de tumeur prélevé est disséqué en pièces micrométriques et arrangés dans des systèmes de canaux. Cette méthode permet l'étude de la tumeur en maintenant sa viabilité et son hétérogénéité, et en reconstituant au moins partiellement le micro-environnement tumoral, et ce sur des courtes périodes de temps dans un plus grand nombre de conditions. Les modèles microfluidiques ont un taux de réussite beaucoup plus élevé que les XDP (97) et un plus faible taux de nécrose que les tranches de tissus (106). Ce type d'approche requiert cependant une plateforme spécialisée, et demeure difficile d'accès sans un hôpital affilié pour les échantillons de patientes. D'autres approches incluent la collection d'ascites ou la digestion de tumeurs solides, qui sont ensuite agrégées pour former des organoïdes primaires, permettant ainsi l'étude *in vitro* d'échantillons de patientes en 3D (107). Cette méthode a aussi un taux de succès plus élevé, mais ne maintient pas la structure originale de la tumeur (108). Plus simplement, des échantillons de patientes, surtout d'ascites, peuvent être mis en pétri et cultivées comme culture primaire en 2D, sacrifiant structure et microenvironnement tumoral pour faciliter l'utilisation et l'entretien, tout en maintenant une proximité génétique à la tumeur d'origine (109). Alternativement, les échantillons tissulaires primaires peuvent être mis en biobanque, permettant leur utilisation sur le long terme, notamment pour de nombreux essais moléculaires dans la recherche de biomarqueurs (110).

### **1.3.2.2 Modèles cellulaires**

Comme les modèles à base de tissus, les modèles cellulaires sont originalement issus d'échantillons de patientes. Cependant, ceux-ci sacrifient de la fidélité à la tumeur d'origine en échange d'une plus grande accessibilité, une facilité d'entretien, de faibles coûts d'utilisation, une durée de vie virtuellement infinie, et une possibilité d'analyses à haut débit (111). Le modèle le

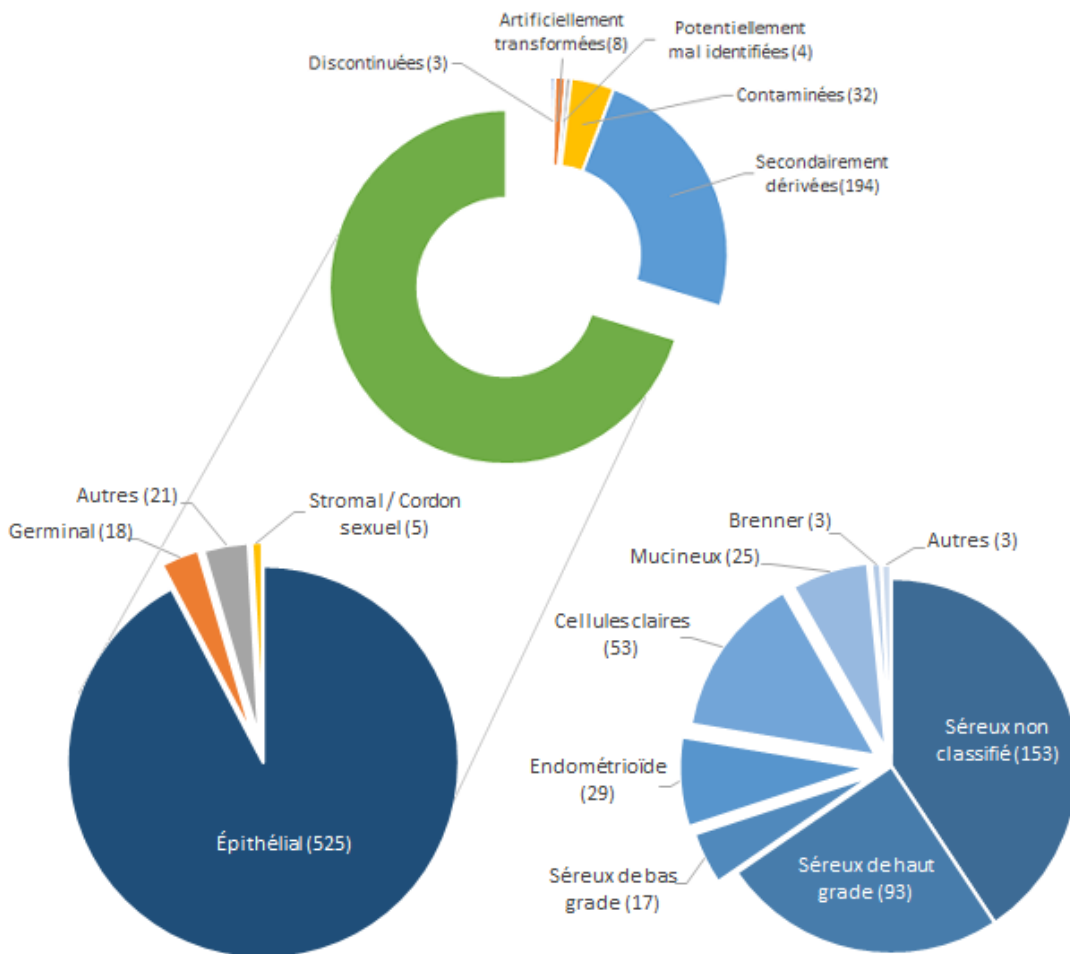
plus courant de ce type est la lignée cellulaire immortalisée, où un échantillon de patiente est mis en culture en laboratoire, et où une population de cette tumeur subit une immortalisation, soit induite ou spontanée (112, 113).

Les lignées cellulaires peuvent facilement être amplifiées et maintenues en culture pendant de longues périodes de temps, permettant une grande versatilité d'essais moléculaires en 2D (111, 114). Or, une lignée cellulaire, quoique potentiellement non homogène (115), ne représente pas aussi pleinement l'hétérogénéité de la tumeur d'origine, exclut certains éléments de la tumeur tels les cellules immunitaires, le stroma et les fibroblastes associés à la tumeur, et ne maintient ni la structure, ni le micro-environnement de la tumeur d'origine (111). Par contre, les lignées cellulaires peuvent être agrégées pour former des sphéroïdes ou organoïdes pour des analyses en 3D (116), ou injectées dans des animaux pour former des xénogreffes (117), récapitulant ainsi au moins partiellement la structure, le micro-environnement et les interactions de la tumeur, renforçant ainsi la versatilité de ce type de modèle (111).

De plus, les modèles cellulaires peuvent être dérivés davantage pour l'étude de certains phénomènes; la sélection clonale ou sous-populationnelle, l'édition génétique et la transfection peuvent servir à créer de nouveaux modèles à partir de lignées cellulaires existantes (118-120). Notamment, l'exposition à long terme d'une lignée cellulaire à une drogue peut permettre de dériver une lignée apparentée résistante à ladite drogue, permettant ainsi l'étude du phénomène de résistance au traitement (121).

Considérant la nature hétérogène du CEO, l'étude de la maladie requiert un grand nombre de modèles hautement diversifiés avec des caractéristiques cliniques bien décrites et variées, prenant en compte la génétique, les mutations et l'historique de traitement des patientes. Cette problématique est accentuée pour les sous-types moins communs; un relativement grand nombre de lignées de type séreuses existent dans la littérature, mais beaucoup moins ont été publiées pour le CCC, le CE, le CM et le CSBG. La base de donnée Cellosaurus, recueillant toutes les lignées publiées, permet notamment d'évaluer le nombre de modèles cellulaires disponibles (Figure 2) (112, 122-127). Parmi les 810 modèles de cancer de l'ovaire inclus dans cette base, excluant les 194 secondairement dérivées, 36 sont de nature douteuse (contaminées ou

potentiellement mal identifiées), 8 ont été manipulés pour fin de transformation, et 3 ont été discontinués par le fournisseur, laissant 569 modèles divers de cancer de l’ovaire. Puis, parmi les 525 lignées épithéliales, excluant les 148 n’ayant pas de sous-type spécifié, la grande majorité est soit de type CSHG ou carcinome séreux non gradé (246 sur 376), et il existe peu de modèles des autres sous-types. Il est à noter cependant que malgré qu’un grand nombre de lignées du type CSHG aient été publiées, des analyses approfondies effectuées sur ces lignées, dont plusieurs couramment utilisées, ont fortement suggéré qu’un nombre de celles-ci ne sont pas représentatives de la maladie au niveau génétique, et seraient de mauvais modèles d’étude pour cette raison (128). La puissance des modèles cellulaires se base sur leur multiplicité, soulignant le besoin d’établir de nouvelles lignées fiables et bien caractérisées, surtout pour les sous-types plus rares.



**Figure 2 –** Lignées de cancer de l’ovaire existantes, extraites de Cellosaurus.

### 1.3.3 Stratégies thérapeutiques cliniques

#### 1.3.3.1 Détection

Le CEO est largement asymptomatique aux stades précoces, et les symptômes aux stades tardifs sont ambigus et peu spécifiques (20, 22, 23, 51). Certains symptômes peuvent être confondus avec les symptômes d'autres conditions comme la dyspepsie, le syndrome du côlon irritable ou les menstruations (23, 129). En effet, les symptômes les plus communs incluent la distension ou le ballonnement abdominal, la formation d'une masse au niveau de l'abdomen, la douleur abdominale et le saignement vaginal anormal (23). Malheureusement, ces symptômes sont souvent indicateurs d'une maladie déjà avancée (130). En effet, la majorité des patientes sont diagnostiquées à des stades avancés (22).

Contrairement à d'autres maladies comme le cancer du sein ou du col de l'utérus, il n'y a pas de dépistage de routine pour le cancer de l'ovaire (131), à moins d'antécédents familiaux pouvant souligner une mutation germinale *BRCA* ou le syndrome de Lynch, une mutation dans l'un des gènes de la voie du MMR (132, 133). Dans le cas d'apparition de symptômes, ou de patientes à risque élevé, la détection du cancer de l'ovaire se fait surtout par échographie intravaginale et par dosage sérique du marqueur CA-125 (132). Or, plusieurs études ont démontré que le CA-125 est peu sensible aux stades précoces de la maladie, ainsi que peu spécifique comme marqueur, pouvant être affecté par plusieurs facteurs confondants comme les menstruations, la grossesse et l'endométriose (134-137). Une autre protéine, HE4, a été étudiée par plusieurs groupes comme marqueur du cancer de l'ovaire pour potentiellement remplacer le CA-125 ou y être combiné, et les résultats sont encourageants (134, 136, 138). D'autres méthodes de dépistage, dont des algorithmes multifactoriels comme l'indice de risque de malignité (*risk of malignancy index*, RMI), l'algorithme de risque de malignité ovarienne (*risk of ovarian malignancy algorithm*, ROMA) et l'algorithme de risque de cancer ovarien (*risk of ovarian cancer algorithm*, ROCA), ont été proposés sans réelle amélioration aux techniques existantes (20, 134). La recherche pour de nouvelles méthodes de prédiction précoce, intégrant par exemple l'ADN tumoral circulant ou l'épigénétique, est encore sujet d'actualité, et plusieurs études examinant cet aspect de la maladie sont en cours (139-143).



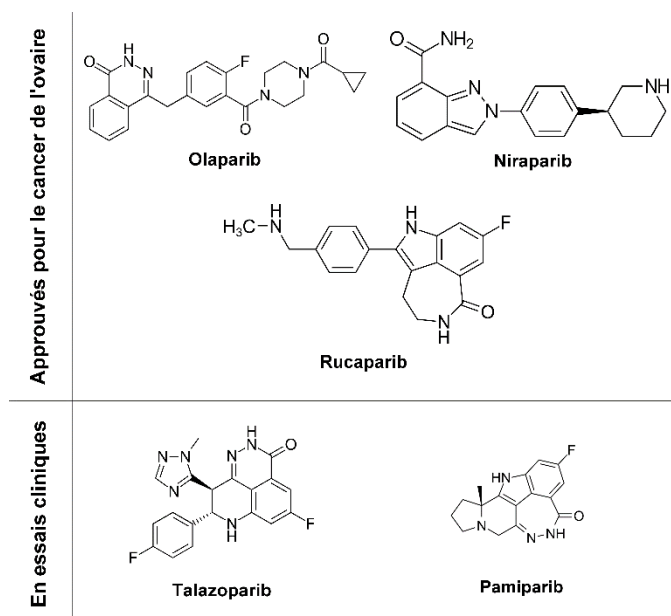
### 1.3.3.2 Évolution du traitement

Le traitement du cancer de l'ovaire a vu quelques changements au fil des ans. Avant les années 1950, seules la chirurgie et la radiothérapie étaient utilisées comme traitement de première ligne (144). L'avènement des agents cytotoxiques comme le melphalan en tant que traitement curatif plutôt que palliatif, dans les années 60, a induit un changement de paradigme pour la maladie (144, 145). Puis, le cisplatine a été rapporté comme efficace contre le cancer dans les années 60, et approuvé par le *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis en 1978 (146), marquant le début de l'utilisation d'agents à base de platine dans le traitement du cancer de l'ovaire (144). L'efficacité du paclitaxel (Taxol) a été évaluée pour la première fois dans le cancer de l'ovaire en 1989 (147), et un essai clinique de 1996 a montré que ce poison des microtubules était plus efficace en combinaison avec le cisplatine que le cyclophosphamide (148). Le carboplatine, un analogue du cisplatine, aura éventuellement remplacé ce dernier dû à sa toxicité réduite (149-151).

Les CSHG sont particulièrement sensibles aux effets cytotoxiques des agents à base de platine (152, 153), en partie dû aux défauts de la voie de réparation du HR, où les cellules ne peuvent pas réparer les dommages à l'ADN entraînés par ces agents cytotoxiques. Malgré une excellente réponse initiale, la majorité des patientes développent une maladie récurrente (20, 51, 154), d'où l'urgence de développer des stratégies pour contrer ou prévenir les récurrences. Dans les années 2010, il y a eu d'importants développements dans la recherche d'alternatives plus efficaces et moins toxiques. Deux types de thérapie ciblée ont été approuvés en cancer de l'ovaire, et plusieurs autres sont en essais cliniques. Le premier inhibiteur anti-angiogénique ciblant le *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A), bevacizumab, a été approuvé en Europe en 2011, puis aux États-Unis et au Canada, pour le traitement du cancer de l'ovaire, en combinaison avec la chimiothérapie de première ligne et comme traitement d'entretien de première ligne en monothérapie (155, 156). Parallèlement, olaparib est le premier inhibiteur de la polymérase de poly(ADP-ribose) (PARP) qui a initialement été approuvé par le FDA aux États-Unis en 2014, dans le contexte du traitement d'entretien après plusieurs lignes de chimiothérapie (157). Deux autres, rucaparib et niraparib, ont été approuvés depuis (158, 159) (Figure 3).

### 1.3.3.2.1 Thérapies en études cliniques

Plusieurs essais cliniques récents s'intéressent à l'efficacité de bevacizumab dans le cancer de l'ovaire, seul ou en combinaison avec d'autres traitements (160); d'autres traitements anti-angiogéniques sont aussi en évaluation, incluant cediranib et pazopanib (160). Deux autres inhibiteurs de PARP très prometteurs, talazoparib et pamiparib, sont également en essais cliniques pour le cancer de l'ovaire, talazoparib ayant déjà été approuvé pour le cancer du sein (27, 161-163) (Figure 3). En plus des anti-angiogéniques et des PARPi, d'autres classes de thérapie ciblée sont également en cours de développement et en essais cliniques dans le cancer de l'ovaire. En effet, ces voies de traitement incluent l'immunothérapie (164-167), les inhibiteurs du *folate receptor alpha* (168-170), les inhibiteurs des tyrosine kinases EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (171-173), les modulateurs du cycle cellulaire (via WEE1 et CHK1/2) (174-176), les régulateurs du destin cellulaire (apoptose, sénescence, nécroptose) (177-179), et diverses combinaisons de ces thérapies (168, 179-184).



**Figure 3 –** Inhibiteurs de PARP approuvés ou en études cliniques.

### **1.3.3.3 Traitement de première ligne**

La chirurgie de réduction tumorale avec comme objectif la cytoréduction complète sans maladie résiduelle (salpingo-ovariectomie, accompagnée d'une hystérectomie, résection intestinale, omentectomie, et autre, au besoin) et la chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante sont la pierre angulaire peu importe le sous-type histologique (185-187). La chimiothérapie administrée est, dans la majorité des cas, une combinaison de l'agent alkylant carboplatine et du paclitaxel (188-190). Depuis l'avènement des thérapies ciblées, le traitement de première ligne recommandé par le *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) inclut également ces thérapies émergentes : à la chimiothérapie de première ligne peut s'ajouter le bevacizumab pour la maladie de stade II et plus (191). Si la maladie est décelée à bas stade, on recommande la surveillance après traitement de première ligne; dans les cas plus avancés, un traitement d'entretien est par la suite administré à long terme afin de minimiser les chances d'une rechute (191); si la patiente a reçu du bevacizumab en première ligne et a bien répondu, le traitement d'entretien recommandé est une combinaison d'olaparib et de bevacizumab. En l'absence de bevacizumab en première ligne, le NCCN recommande un traitement d'entretien de niraparib en monothérapie, ou d'olaparib en monothérapie si la patiente porte une mutation BRCA (191).

### **1.3.3.4 Traitement des récives**

Chez la majorité des patientes, surtout celles dont la maladie a été diagnostiquée aux stades plus avancés, il y a rechute après le traitement initial, nécessitant un traitement de deuxième ligne (154). La chirurgie de cytoréduction secondaire n'est pas routinière mais peut être avantageuse dans certains cas (20, 192, 193); la chimiothérapie utilisée lors de la rechute dépend de la réponse initiale aux agents à base de platine (194). Un cancer sensible aux agents à base de platine est généralement traité de nouveau avec une combinaison de platine (194), puis un traitement d'entretien aux PARPi (191). Dans le cas contraire, d'autres agents cytotoxiques comme la gemcitabine (195), la doxorubicine liposomale pégylée (Caelyx) (196) ou le topotécan (197) peuvent être utilisés (51, 156). Si la patiente porte une mutation causant une instabilité génomique, les PARPi sont également recommandés dans ce contexte (191).

## 1.4 Les inhibiteurs de PARP

Tel que précédemment décrit, les PARPi sont une classe de thérapie ciblée approuvée pour le traitement du cancer de l'ovaire pour la première fois en Amérique du Nord en 2014 (157). Le tout premier inhibiteur de PARP, le 3-aminobenzamide, a été publié en 1980, suivant l'observation que cette molécule compétitionne avec le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) pour servir de substrat pour PARP (198, 199). Ce n'est qu'en 2005 qu'un premier lien a été établi entre les mutations BRCA1/2 et la sensibilité des cellules tumorales aux PARPi dû à une létalité synthétique (200), résultant en un grand intérêt pour ce type d'inhibiteur dans le contexte du cancer héréditaire du sein et de l'ovaire. Depuis, plusieurs PARPi ont été développés, testés et prouvés efficaces pour une large gamme de cancers, incluant le cancer de la prostate et du pancréas, et le carcinome pulmonaire à petites cellules (201-203).

### 1.4.1 Polymérase de poly(ADP-ribose) 1 (PARP1)

Les polymérase de poly(ADP-ribose), ou PARP, sont une famille de 17 enzymes ayant en commun un domaine catalytique ADP-ribosyl transférase (ART) hautement conservé (Figure 4) (204-207). L'ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle impliquant le transfert d'un ou de plusieurs groupes d'ADP-ribose à partir de molécules de NAD (208). Seulement quatre des PARP possèdent une réelle activité de poly ADP-ribosylation, pouvant synthétiser des chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR) : PARP1, PARP2, tankyrase (PARP5a) et tankyrase 2 (PARP5b) (209). La majorité des autres (11/13) possèdent une activité de mono-ADP-ribosyltransférase (MART), pouvant catalyser le transfert d'un seul ADP-ribose à leur cible (209). Les deux membres restants, PARP9 et ZC3HAV1 (PARP13), n'ont pas d'activité d'ADP-ribosylation détectable (209). La majorité des inhibiteurs de PARP ciblent principalement PARP1, mais ont également des cibles secondaires qui varient selon l'inhibiteur (210).

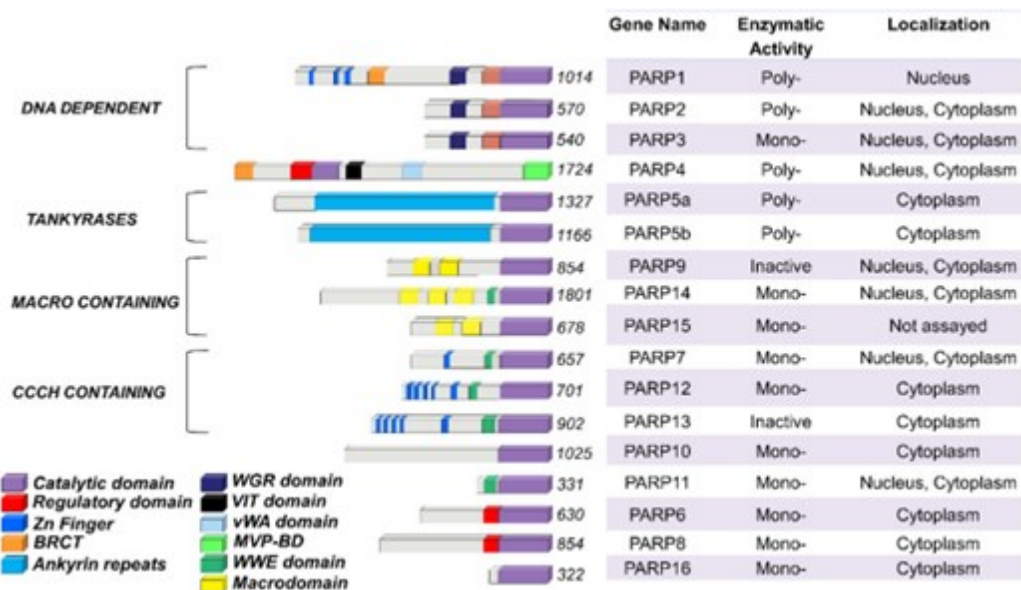


Figure 4 – Les dix-sept polymérase de poly(ADP-ribose)<sup>2</sup>.

#### 1.4.1.1 Structure

Le membre fondateur de la famille des PARP est PARP1, qui est aussi le membre le plus abondant et ubiquitaire (211), et le mieux caractérisé. En plus de son domaine catalytique actif ART, cette enzyme possède un domaine N-terminal de liaison à l'ADN constitué de deux domaines de doigt de zinc (ZnF) (212), un troisième doigt de zinc (ZnF3) servant à l'activation allostérique, un domaine central d'auto-modification (BRCT) (213), et un sous-domaine catalytique hélicoïdal (HD) d'auto-inhibition (214) (Figure 4), ce dernier étant parfois groupé avec le domaine catalytique (215). Le domaine WGR, quant à lui, contribue également à la liaison à l'ADN, et forme des contacts entre les domaines, nécessaires pour l'activation de PARP1 dépendante des dommages à l'ADN (214). PARP1 est une protéine nucléaire, possédant un signal de localisation au noyau (NLS) entre ses domaines ZnF2 et ZnF3 (215, 216) (Figure 5).

<sup>2</sup>Figure reproduite de sa publication originale en accord avec les termes de MDPI:

207. Ummarino S, Hausman C, Di Ruscio A. The PARP Way to Epigenetic Changes. *Genes* (Basel). 2021;12(3).  
 CCCH : motif cystéine-cystéine-cystéine-histidine; BRCT : domaine BRCA1 C-terminal; WGR : motif tryptophane-glycine-arginine; VIT : domaine *vault inter-alpha-trypsin*; vWA : domaine von Willebrand de type A; MVP-BD : *major vault protein binding domain*; WWE : motif tryptophane-tryptophane-glutamate.

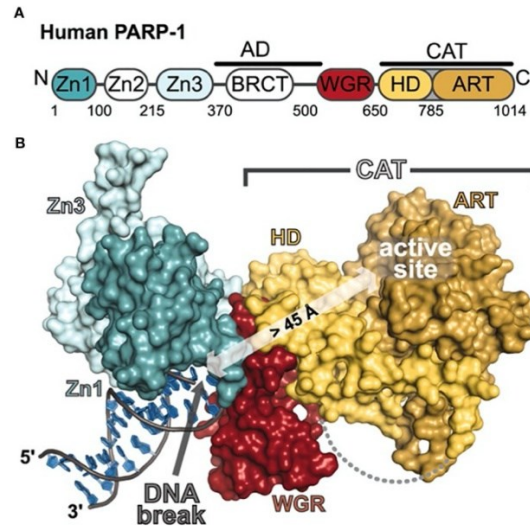


Figure 5 – Structure protéique de PARP1<sup>3</sup>.

#### 1.4.1.2 Activité catalytique

La protéine PARP1 est une enzyme de modification post-traductionnelle, catalysant le clivage de son substrat, le NAD, en nicotinamide (NAM) et ADP-ribose. Elle lie le NAD avec une forte efficacité; la constante de Michaelis ( $K_M$ ) de cette réaction a été rapportée entre 30 et 100  $\mu\text{M}$  (218-220). Suite au clivage de son substrat, l'enzyme catalyse la liaison de l'ADP-ribose résultant à sa cible, et répète ce processus plusieurs fois, synthétisant ainsi de longues chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR) avec embranchements (221). Notamment, la cible la plus importante de l'activité de PARylation de PARP1 est elle-même (222). Il a été suggéré que la longueur des chaînes et la fréquence des embranchements auraient une influence sur la fonction de la modification, affectant l'efficacité du recrutement de protéines reconnaissant les chaînes de PAR (223). Les chaînes de PAR sont éventuellement dégradées par une « efface » de PAR, soit notamment la glycohydrolase de poly(ADP-ribose) (PARG), ou d'autres enzymes telles les hydrolases d'ADP-ribose, les effaces d'ADP-ribose à macrodomaine, et les lyases d'ADP-ribosyl (224, 225).

<sup>3</sup> Figure reproduite de sa publication originale avec permission de l'AAAS (numéro de licence 5284400200412) : 217. Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science*. 2012;336(6082):728-32.

AD : domaine d'auto-modification; CAT : domaine catalytique; Zn1/2/3 : domaine de doigt de zinc 1/2/3; BRCT : domaine BRCA1 C-terminal; WGR : motif tryptophane-glycine-arginine; HD : domaine hélicoïdal; ART : domaine ADP-ribosyltransférase.

### 1.4.1.3 Rôles dans la réparation de l'ADN

Les rôles les mieux étudiés de PARP1 sont son implication dans les voies de réparation de l'ADN, dans le noyau (221, 226-230). Lorsque survient une cassure d'ADN, soit simple-brin ou double-brin, PARP1 est rapidement recrutée au site de la cassure et son activité catalytique est activée, menant à la PARylation d'elle-même et de protéines environnantes, incluant les histones (231). L'environnement créé par PARP1 permet le recrutement efficace de la machinerie de réparation de l'ADN au site de la cassure, dépendamment de la nature du dommage (229).

#### 1.4.1.3.1 Réparation des cassures simple-brin

Dans le cas de la réparation par excision de base (*base excision repair*, BER), suite à la PARylation de son environnement, PARP1 recrute XRCC1 au site de la cassure simple-brin (CSB), qui s'accumule et sert d'échafaudage protéique pour le recrutement de la machinerie de réparation, incluant PNKP, APTX et LIG3, et stimule l'activité de certains des facteurs de réparation, dont les endonucléases APE1 et FEN1 (229, 232-235). Dans la réparation par excision de nucléotide (*nucleotide excision repair*, NER), PARP1 recrute et PARyle les protéines de réparation DDB1 et DDB2, puis CHD1L, induisant une décondensation de la chromatine et le recrutement subséquent de XPC et de RAD23B, permettant la cascade de réparation par NER (229, 236).

Il est connu que la perte de PARP1 chez la souris induit une baisse significative de l'efficacité de réparation des cassures induites par agent alkylant ou irradiation gamma, menant à de l'instabilité génomique et de la mort cellulaire accrues (235). De plus, l'inhibition moléculaire ou par siRNA de PARP1 induit les cassures double-brin (CDB) associées à la réplication de l'ADN, en empêchant la réparation des CSB (237).

Il a également été démontré que PARP1 jouerait un rôle dans la voie du MMR via son interaction avec les protéines de cette voie, incluant MutS $\alpha$ , Exo1, RPA et RFC, notant que la déplétion de PARP1 induit une baisse des niveaux de MSH2 et MLH1, ainsi que de l'activité de cette voie de réparation (238).

#### 1.4.1.3.2 Réparation des cassures double-brin

Quoique moins exhaustivement démontré, PARP1 joue également un rôle dans la réparation des CDB. Dans la voie de la jonction d'extrémités non homologues (*non-homologous end joining*, NHEJ), PARP1 interagit directement avec les sous-unités Ku du complexe protéique DNA-PK, induisant des changements de conformation de ce complexe et permettant la réparation de CDB via cette voie (239).

Dans le cas du HR, plusieurs études ont suggéré que PARP1 était antagoniste à (ou non impliquée dans) cette voie (240-242); or, d'autres études ont suggéré des rôles agonistes pour PARP1 dans la voie du HR, incluant le recrutement des protéines UHRF1 et MRE11, et potentiellement BRCA1 via BARD1 (229, 243). Il a été proposé que PARP1 joue successivement un rôle activateur et suppresseur de la voie, en stabilisant BRCA1 au site de la cassure via l'interaction de BRCA1 avec RAP80 (229, 244).

#### 1.4.1.4 Autres rôles nucléaires

Tel que décrit dans la voie des CSB, PARP1 peut décondenser la chromatine via la PARylation des histones, afin de permettre la cascade de réparation (229). Il a été démontré que, dans certains contextes, cette décondensation corrèle avec une triméthylation de la lysine 3 des histones 4 (H3K4me3), un marqueur de transcription active, où PARP1 bloquerait l'activité de la déméthylase KDM5B (245), lui accordant un rôle épigénétique. Cette capacité à non seulement décondenser la chromatine, mais à promouvoir et activer l'expression génique, sert également dans la transcription de gènes pour divers processus, incluant certaines protéines de signalisation (246, 247). Notamment, PARP1 peut activer NF- $\kappa$ B, et ainsi induire l'expression de cytokines incluant TNF $\alpha$  et plusieurs interleukines, dans diverses cellules immunitaires (246, 248).

Dans d'autres contextes, PARP1 peut négativement moduler l'expression de certains gènes (245), en liant par exemple un élément répresseur d'une région promotrice, comme dans le cas de COX2 (249). En plus du noyau, il a été démontré que PARP1 est fortement exprimé dans le nucléole, et jouerait un rôle dans la transcription, la maturation et l'assemblage des ribosomes (250, 251), dans la translocation nucléoplasmique de certaines protéines (251, 252), et même dans la préservation de l'intégrité nucléolaire (250, 251).



#### **1.4.1.5 Rôles dans le cytoplasme**

Dans un contexte physiologique normal, PARP1 se retrouve rarement dans le cytoplasme, contrairement aux autres membres de la famille des PARP, qui eux ont des rôles cytoplasmiques variés incluant la régulation structurelle des membranes, la motilité cellulaire et la régulation du cytosquelette d'actine (253). Dans un contexte de mort cellulaire, PARP1 est transloquée au cytoplasme et clivée par les caspases 3 et 7, induisant la cascade apoptotique (254). Parallèlement, un excès de dommages oxydants à l'ADN peut également induire une mort cellulaire indépendante des caspases, distinctes de la nécrose et de l'apoptose, nommée parthanatos, où PARP1 est hyperactivée, synthétisant une grande quantité de PAR et induisant ainsi une cascade de mort cellulaire par la déplétion de NAD et d'ATP et par la dissipation de potentiel transmembranaire mitochondrial. PARP1 se lie au facteur mitochondrial AIFM1, induisant la translocation de ce dernier au noyau et déclenchant la lyse de la chromatine (255, 256).

#### **1.4.1.6 Rôles dans la mitochondrie**

Plusieurs études récentes ont observé la présence de PARP1 dans la mitochondrie, suggérant un rôle pour l'enzyme dans cette organelle (257). En effet, la liaison de PARP1 à l'ADN mitochondrial indiquerait un rôle pour la protéine dans l'entretien de l'ADN de ce compartiment cellulaire, comme dans le noyau et le nucléole (258). Cependant, une étude aurait démontré que PARP1 serait un répresseur de plusieurs processus mitochondriaux, incluant la réparation de son ADN (259). Somme toute, plusieurs groupes ont suggéré divers rôles pour PARP1 dans la mitochondrie (258-262), mais davantage de recherche sera nécessaire pour bien élucider cet aspect encore nébuleux de PARP1.

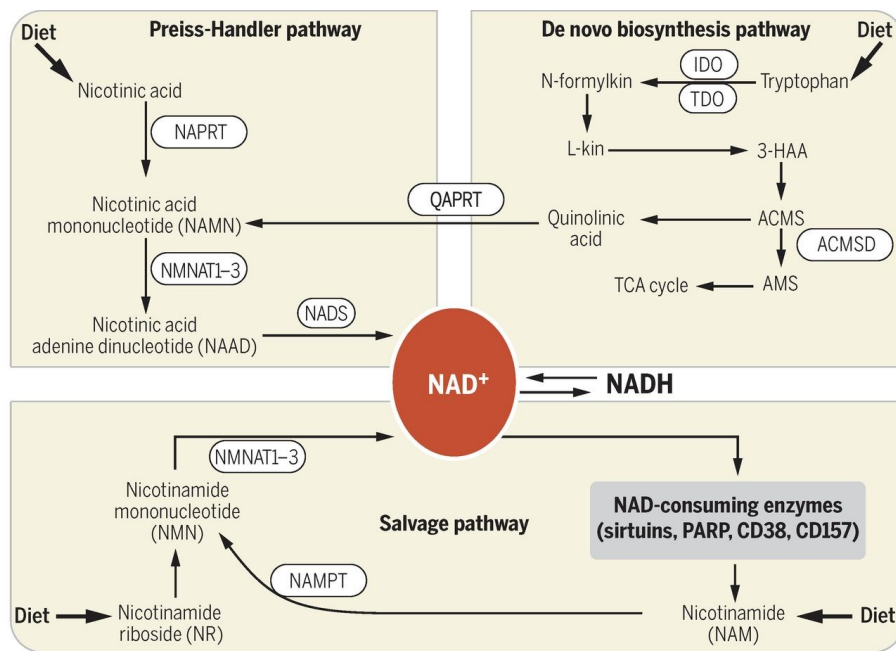
#### **1.4.1.7 Substrat**

Tel que décrit ci-haut, PARP1 utilise comme substrat la forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) pour synthétiser ses chaînes de poly(ADP-ribose), clivant cette coenzyme en un résidu de nicotinamide (NAM) et un résidu d'ADP-ribose (221). Mis à part son rôle comme substrat pour PARP, le NAD joue un rôle important dans la cellule, notamment un rôle énergétique.

#### 1.4.1.7.1 Biosynthèse du NAD

Les niveaux de NAD dans la cellule sont maintenus par trois voies de signalisation chez les mammifères (263, 264) (Figure 6). La première, la voie Preiss-Handler, permet la synthèse de NAD à partir d'acide nicotinique issu de la diète de l'organisme, via la conversion en acide nicotinique mononucléotide (NAMN) par la phosphoribosyltransférase d'acide nicotinique (NAPRT). Les nicotinamide mononucleotide adénylyltransférases (NMNAT1-3) convertissent ensuite le NAMN en acide nicotinique adénine dinucléotide (NAAD), à partir duquel la synthétase de NAD (NADS) synthétise le NAD (264). La voie *de novo* permet plutôt la synthèse d'acide quinoléique à partir de tryptophane issu de la diète, qui est ensuite converti en NAMN et intégré dans la voie Preiss-Handler (264).

Puis, la voie de récupération du NAD, la plus importante des trois dans le contexte du cancer (265), recycle plutôt le NAM produit par les enzymes qui consomment le NAD, le convertissant en nicotinamide mononucléotide (NMN) à l'aide de la phosphoribosyltransférase de nicotinamide (NAMPT). Le NMN est ensuite directement converti en NAD via les enzymes NMNAT (264). Les trois formes de l'enzyme NMNAT se retrouvent dans divers compartiments cellulaires; NMNAT1 est la forme nucléaire (266, 267), NMNAT2 est la forme cytoplasmique (267, 268), et NMNAT3 est la forme mitochondriale (267, 269). Les compartiments de NAD sont plutôt distincts (270), surtout celui de la mitochondrie, dont la membrane est imperméable au NAD (257, 271), et ont démontré des concentrations relatives variables selon plusieurs facteurs, dont le type cellulaire (270).



**Figure 6 –** Les trois voies de biosynthèse du NAD<sup>4</sup>.

#### 1.4.1.7.2 Rôles du NAD

Le NAD joue un rôle essentiel dans les réactions d'oxydoréduction de plusieurs voies métaboliques, où il est converti de sa forme oxydée (NAD<sup>+</sup>) à sa forme réduite (NADH), et vice versa (270, 272, 273). Ces voies incluent la glycolyse, l'oxydation des acides gras (272), la phosphorylation oxydative (274), la fermentation, et le cycle de Krebs (275). Dans le contexte

<sup>4</sup> Figure reproduite de sa publication originale avec permission de l'AAAS (numéro de licence 5284400686052) : 264. Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Ibid.* 2015;350(6265):1208-13.

**La voie Preiss-Handler** utilise l'acide nicotinique, qui est transformé en acide nicotinique mononucléotide (NAMN) par la nicotinate phosphoribosyltransférase (NAPRT), puis en acide nicotinique dinucléotide (NAAD) par l'une des trois nicotinamide mononucléotide adénylyltransférases (NMNAT1-3). Le NAAD est converti en nicotinamide dinucléotide (NAD) par la synthase de NAD (NADS). **La voie de biosynthèse de novo** débute plutôt à partir du tryptophane, converti en N-formylkin par soit l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). Ce métabolite est ensuite successivement transformé en L-kinurenine (L-kin), en acide 3-hydroxyanthranilique (3-HAA), en alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdéhyde (ACMS), puis en acide quinolinique. La voie Preiss-Handler peut alors être alimentée en synthétisant du NAMN à partir d'acide quinolinique résultant, à l'aide de la phosphoribosyltransférase d'acide quinolinique (QAPRT). Alternativement, l'ACMS peut être converti en alpha-aminomuconate semialdéhyde (AMS) par la décarboxylase d'ACMS (ACMSD), pour utilisation dans le cycle de l'acide carboxylique (TCA cycle). Puis, **la voie de récupération (salvage pathway)** sert à reformer du NAD à partir de nicotinamide (NAM), le métabolite résultant des enzymes consommant le NAD. Celui-ci est converti en nicotinamide mononucléotide (NMN) par la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT), puis en NAD par l'une des NMNAT. Le NMN peut notamment aussi être synthétisé à partir de nicotinamide riboside (NR).

d'oxydoréduction, le NAD sert donc d'accepteur, de donneur et de transporteur d'électron en passant de sa forme oxydée à sa forme réduite, et vice versa (276).

En plus de servir comme cofacteur métabolique, où le NAD ne fait que subir une modification réversible, il peut également être utilisé comme substrat et activement consommé par certaines enzymes, dont les polymérases de poly(ADP-ribose), les sirtuines et les synthases d'ADP-ribose cyclique, qui se servent du résidu d'ADP-ribose et produisent du NAM (274). Il a été démontré qu'une augmentation de la concentration de NAM dans la cellule réduit l'activité de PARP1 et de la sirtuine SIRT1 via une boucle de rétroaction, où le NAM lie le site catalytique de ces enzymes en compétition avec le NAD (277, 278); l'observation de ce phénomène a servi comme base pour le développement des inhibiteurs de PARP (199). En parallèle, l'inhibition des voies du NAD a été explorée pour le traitement de plusieurs maladies, incluant le cancer, dû à son implication dans la transition métabolique des cellules cancéreuses (279).

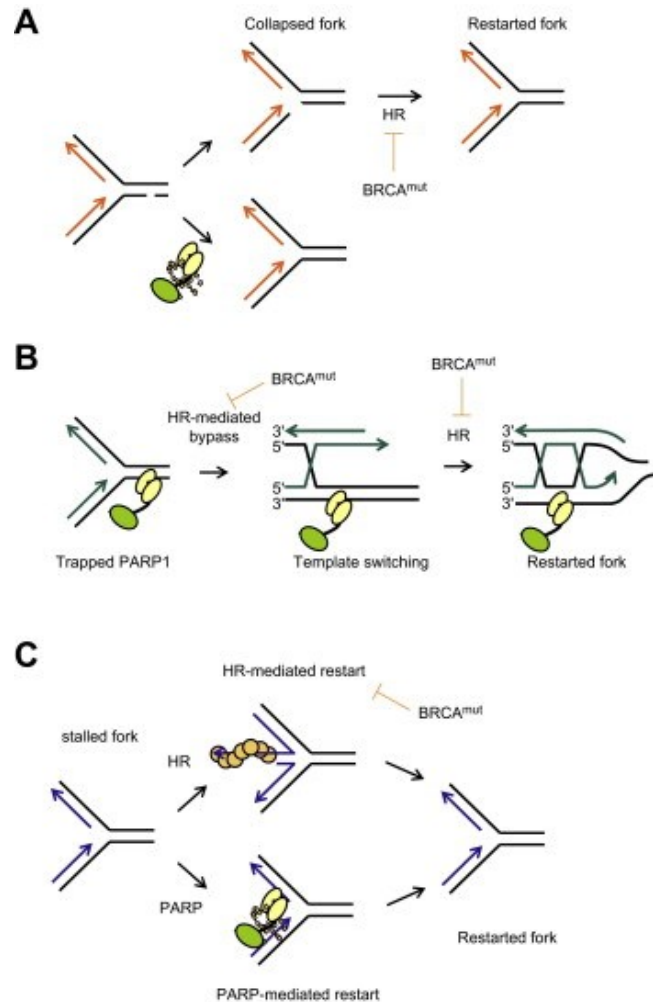
#### **1.4.2 Mutations BRCA**

Le gène de réparation de l'ADN *BRCA1* a été identifié et lié au cancer du sein par le laboratoire de Mary-Claire King en 1990 (280), et peu de temps après, ce gène a été cloné et séquencé, et un lien a été établi entre plusieurs mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* et l'historique familial de cas de cancer du sein et de l'ovaire (199). Il est estimé que ces mutations ont une fréquence d'environ 0.25% dans la population générale (281), à l'exception de certaines populations ayant des taux plus élevés dû à des mutations fondatrices, comme les Canadiens français (282) et les Juifs Ashkénazes (283). Le cancer de l'ovaire est une malignité peu fréquente (1.6%), mais la mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* augmente le risque de contracter cette maladie à 40% et 18%, respectivement (22). La découverte de cette relation importante a mené à la recherche d'options de traitement spécifiquement pour ces femmes beaucoup plus à risque. C'est dans ce contexte qu'en 2005, Helen E. Bryant et collègues ont proposé que l'inhibition de PARP1 tuerait spécifiquement les tumeurs déficientes en *BRCA2*, via un phénomène nommé létalité synthétique (284).

### 1.4.2.1 Létalité synthétique

Le rôle de PARP1 dans la réparation des CSB, tel que décrit ci-haut, est surtout de recruter la machinerie de réparation au site d'une cassure. En 2005, Bryant et collègues émettent qu'en l'absence de PARP1, les CSB non réparées induiraient l'effondrement des fourches de réplication et deviendraient des CDB, réparables par la voie de la recombinaison homologue; or, en l'absence de BRCA, cette voie serait déficiente, menant ainsi à l'accumulation de cassures et l'apoptose des cellules portant une mutation pour ces gènes (284). Plus récemment, il a été démontré que certains inhibiteurs de PARP ont également une activité de piégeage de PARP1 à l'ADN, menant à une hypothèse où ces adduits d'ADN bloqueraient la machinerie de réplication, et nécessitant la recombinaison homologue pour les contourner et poursuivre (285, 286) (Figure 7).

Ce phénomène de létalité synthétique a servi de base théorique pour le développement d'essais cliniques utilisant les PARPi comme traitement. Les premières études cliniques pour olaparib (AZD-2281), le premier PARPi à avoir été approuvé, n'ont inclus que des patientes portant une mutation germinale de BRCA1/2 (287-289). En 2014, olaparib a été approuvé par le FDA sous le nom Lynparza, pour le traitement d'entretien des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé, sensible à la chimiothérapie et portant une mutation BRCA (157, 290). Rucaparib (Rubraca) a été approuvé deux ans plus tard en 2016, avec une indication similaire (291). Les inhibiteurs de PARP ont depuis été approuvés et recommandés en traitement d'entretien de première ligne (191). Une étude récente a observé une corrélation significative entre le traitement aux inhibiteurs de PARP et deux événements indésirables : le syndrome myélodysplasique et la leucémie myéloïde aiguë (292). Notamment, les patientes traitées avec des PARPi en traitement d'entretien de deuxième ligne auraient un risque de 8% pour ce type d'événement, comparé à moins de 2% en première ligne (293), soulignant la pertinence d'administrer les PARPi en première ligne.



**Figure 7 –** Hypothèses sur la létalité synthétique entre PARPi et mutation BRCA<sup>5</sup>

Des études cliniques depuis 2014 ont inclus des patientes ne portant pas de mutation BRCA, et les résultats ont indiqué que même certaines de ces patientes pouvaient bénéficier d'un traitement à olaparib (294, 295). Depuis, plusieurs groupes ont démontré que les mutations BRCA

<sup>5</sup> Figure reproduite de sa publication originale en accord avec les termes de John Wiley & Sons :  
285. Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol.* 2011;5(4):387-93.

(A) Sachant que PARP1 est impliquée dans la réparation des cassures d'ADN simple-brin (CSB), ce modèle postule que les CSB persisteraient en présence des PARPi, et qu'un effondrement de la fourche de réplication mènerait à une cassure double brin, sélectivement létale dans les cellules déficiente en recombinaison homologue (HR). (B) Lors de la réparation des CSB, PARP1 serait piégée au site de la cassure par les PARPi, formant ainsi un obstacle à la réplication qui nécessiterait la voie du HR pour être contournée. (C) Naturellement dans les cellules, il arrive que la fourche de réplication s'arrête, soit à cause d'une absence de facteurs de transcription, ou par la présence d'obstacles. Ces interruptions pourraient être remédiées autant par PARP1 que par la voie du HR, mais pas en l'absence des deux, c'est-à-dire dans les cellules déficientes en HR traitées aux PARPi.

n'étaient pas suffisantes pour prédire la réponse aux inhibiteurs de PARP. Notamment, le phénomène de « BRCAness », où des mutations autres que BRCA induiraient le phénotype de déficience en recombinaison homologue, récapituleraient la létalité synthétique observée avec BRCA (296, 297). D'autres ont démontré que les déficiences en réparation d'ADN plus générales seraient également indicatrices de la réponse aux PARPi (298, 299).

Plusieurs gènes non liés à la réparation ont aussi été identifiés comme biomarqueurs prédictifs de la réponse (300). Ces données, en plus de celles collectées lors des essais cliniques subséquents, ont mené à l'approbation de niraparib, sous le nom Zejula, pour le traitement d'entretien des patientes avec un cancer de l'ovaire avancé, indépendamment de leur statut BRCA (158). L'indication de rucaparib a suivi peu de temps après, son usage étendu aux patientes sans mutation également, en 2018 (301). Malgré que l'usage d'olaparib soit toujours restreint, il est maintenant bien accepté que la réponse aux PARPi va au-delà des mutations BRCA, et plusieurs groupes sont à la recherche de facteurs de résistance et de moyens de contourner ces derniers.

### **1.4.3 Résistance**

La résistance au traitement est un obstacle majeur au rétablissement des patients atteints du cancer, et les PARPi ne sont pas une exception. En effet, malgré que ces inhibiteurs soient prometteurs pour prolonger la vie des patientes atteintes du CEO, il demeure qu'une portion significative des patientes ne répond pas au traitement, tel que démontré dans les essais cliniques (302, 303). De plus, de par la durée indéfinie du traitement d'entretien, une majorité des patientes qui répondaient initialement cessent éventuellement de répondre au traitement, et rechutent avec une maladie résistante (304).

#### **1.4.3.1 Résistance intrinsèque**

La résistance intrinsèque est définie ici comme l'absence initiale de réponse au traitement. Dans le cas des inhibiteurs de PARP, les résultats des études cliniques sont variables, rapportant un taux de résistance intrinsèque de 20 à 50% (302, 303).

#### *1.4.3.1.1 Facteurs de résistance intrinsèque*

Tel que décrit ci-haut, plusieurs gènes ont été associés à la résistance intrinsèque, incluant notamment les gènes BRCA. Or, des études génétiques et d'expression approfondies ont montré une association entre la résistance intrinsèque et un grand nombre de gènes impliqués dans diverses voies, autres que celles de la réparation de l'ADN. Des facteurs plus généraux de résistance aux drogues, comme la pompe à efflux ATP-dépendante ABCB1, peuvent conférer une résistance aux PARPi, dans ce cas-ci en évacuant l'inhibiteur de la cellule (305, 306). La protéine CHD1L a été associée à la résistance aux PARPi, sans doute via sa capacité à déloger PARP1 de l'ADN en remodelant la chromatine, contournant ainsi la toxicité des PARPi due au piégeage (307, 308). La faible expression de la protéine SLFN11, quant à elle, a été associée par plusieurs groupes à une résistance intrinsèque aux inhibiteurs de PARP dans des modèles cellulaires (306, 309), potentiellement dû à son implication dans le contrôle du cycle cellulaire en état de stress (310).

#### *1.4.3.1.2 Solutions*

Plusieurs mécanismes spécifiques expliquant en partie la résistance intrinsèque ont été soulevés par divers groupes, et pour chaque mécanisme, des solutions ont été proposées pour le contourner, notamment en combinant un PARPi avec une autre drogue (308, 310, 311). Ce genre d'approche serait idéal dans un contexte de médecine de précision, mais à moins d'avoir une méthode fiable pour tester, déterminer le facteur de résistance précis affligant chaque patiente est difficilement envisageable; le développement de solutions plus généralement applicables serait de mise. Récemment, par exemple, il a été démontré que les PARPi peuvent induire un phénotype de sénescence réversible dans plusieurs modèles de cancer de l'ovaire. Ceci induirait un arrêt cellulaire temporaire et permettrait aux cellules de survivre au traitement. Suivant cette découverte, la combinaison d'un PARPi avec un agent sénolytique permettrait de contourner ce facteur de résistance plus général (179). D'autres drogues antitumorales à plus large spectre sont également testées en combinaison avec les PARPi dans le cancer de l'ovaire pour augmenter leur efficacité dans un contexte plus général, tel les agents anti-angiogéniques bevacizumab (312) et cediranib (313), ou l'agent immunothérapeutique anti-PD-L1 durvalumab (314).



### 1.4.3.2 Résistance acquise

La résistance acquise est définie ici comme une cessation de la réponse après une certaine durée de traitement efficace. Ce phénomène a été observé pour une vaste gamme de traitements, incluant la chimiothérapie (315, 316), l'immunothérapie (317, 318) et la thérapie ciblée (319-322); les inhibiteurs de PARP ne sont pas une exception (323-326). En effet, plusieurs mécanismes de résistance acquise aux PARPi ont été découverts et décrits depuis le début de leur utilisation, et des solutions ont été proposées pour contrer ces mécanismes dans plusieurs cas.

#### 1.4.3.2.1 Facteurs de résistance acquise

Le facteur de résistance le mieux étudié, dû à la recommandation thérapeutique initiale d'olaparib, est la réversion somatique de BRCA (327). Dans la circonstance où les PARPi sont prescrits suivant la logique de létalité synthétique avec les mutations BRCA, il a été démontré qu'une mutation rétablissant la fonctionnalité de ces protéines, ou bien plus généralement de la voie de HR, induirait la résistance aux PARPi (323, 325); un grand nombre de ce type de mutations ont été identifiées et étudiées (325, 327, 328).

Depuis, plusieurs autres mécanismes ont été élucidés. Mise à part la réversion BRCA, la suppression de la voie du NHEJ via la perte de 53BP1 induirait une réactivation de la voie du HR de façon plus générale dans les cellules BRCA1-mutées, conférant une résistance acquise aux PARPi par l'ablation de la létalité synthétique (304). Encore en absence de BRCA1/2, une inhibition de l'activité ou de l'expression d'EZH2, PTIP, SMARCA1, ZRANB3 et/ou HTLF peut réduire la dégradation de fourches de réplifications par les nucléases MRE11 et MUS81, stabilisant celles-ci et induisant une résistance acquise (329). Alternativement, l'augmentation indirecte de la PARylation par la perte de PARG, qui médierait la déPARylation, a été démontrée comme facteur de résistance acquise (330). Plus directement, une altération de PARP1 elle-même qui réduirait sa vulnérabilité à l'activité de piégeage des PARPi conférerait également une résistance acquise (331). Puis, de façon plus générale, une surexpression acquise de pompes à efflux comme ABCB1 induirait une résistance à plusieurs drogues, incluant les PARPi, en réduisant la concentration intracellulaire de celles-ci (305). Un groupe a également identifié la voie NF- $\kappa$ B comme facteur de résistance aux PARPi dans des modèles cellulaires, mais sans avoir élucidé les mécanismes sous-jacents (332).

Somme toute, un grand nombre de mécanismes ont été décrits et qui expliqueraient, au cas par cas, l'acquisition de résistance aux PARPi; cette approche pourrait servir pour le traitement de chaque patiente selon sa tumeur dans l'optique d'une médecine personnalisée.

#### 1.4.3.2.2 *Traitements*

Un nombre de solutions ont été investiguées et proposées, généralement en combinant les PARPi à un autre inhibiteur moléculaire afin de re-sensibiliser les cellules en contournant le mécanisme de résistance identifié. Par exemple, pour contrer les pompes à efflux, le traitement de cellules surexprimant ABCB1 avec des inhibiteurs de cette protéine rétablirait une sensibilité à plusieurs drogues, incluant les PARPi (305). Similairement, l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B sensibiliserait les cellules résistantes démontrant une augmentation de l'activité de cette voie suite à l'acquisition de résistance (332).

Certaines études postulent que de simuler une létalité synthétique suivant la réversion pourrait contrer la résistance acquise. Des inhibiteurs de la protéine de réparation d'ADN ATR, par exemple, sont sous investigation en combinaison avec les PARPi pour tenter de contrer la résistance acquise (304, 324). Notamment, une étude clinique cherche actuellement à établir l'efficacité de la combinaison entre olaparib et l'inhibiteur d'ATR ceralasertib chez les patientes BRCA-mutées atteintes du cancer de l'ovaire ayant acquis une résistance aux PARPi (NCT02264678).

Parallèlement, d'autres études ont démontré une synergie entre les PARPi et l'inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire. L'inhibiteur de CHK1/2 prexasertib, par exemple, induirait une catastrophe mitotique et synergiserait avec l'inhibition de PARP1 dans les cellules ayant acquis une résistance, même suivant une réversion BRCA (175).

Comme pour la résistance intrinsèque, il est difficile d'envisager une solution basée sur les changements somatiques individuels de la tumeur de chaque patiente, et une solution plus générale pour contrer la résistance acquise serait davantage réalisable en clinique.

## 1.5 Projet de thèse

Ce projet de thèse intitulé Caractérisation moléculaire de la résistance aux inhibiteurs de PARP dans le cancer épithélial de l’ovaire par le biais de modèles cellulaires diversifiés vise à fournir des réponses afin d’améliorer le sort des patientes atteintes du CSHG avancé pour qui il ne reste plus de solutions efficaces, mais également afin de maximiser l’efficacité de réponse initiale aux PARPi.

### 1.5.1 Contexte et problématique

Tel que décrit, le cancer de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus létal, notamment dû à son hétérogénéité et sa résistance au traitement. Dans un premier temps, l’étude approfondie de cette maladie requiert un grand nombre de modèles diversifiés, notamment des sous-types moins communs que le CSHG. Puis, à l’aide de ces modèles, il est possible d’étudier l’étendue des caractéristiques de la maladie, incluant de nouvelles options de prise en charge et de voies thérapeutiques.

Le traitement aux inhibiteurs de PARP s’est montré prometteur, mais comme pour toute thérapie, le problème de la résistance porte entrave à la guérison d’un grand nombre de patientes, soit par l’absence de réponse initiale, ou par la cessation de réponse et la rechute éventuelle. Plusieurs groupes ont proposé des mécanismes et solutions, certaines d’entre ces dernières s’étant rendues en essais cliniques ou ayant récemment été approuvées (333), mais l’efficacité s’est montrée variable (313, 334-336), soulignant l’importance de pousser davantage les recherches à ce sujet.

### 1.5.2 Hypothèses de recherche

À l’aide d’un nombre suffisant de modèles d’étude diversifiés, nous croyons que nous pourrions dresser un portrait adéquatement représentatif de l’hétérogénéité du CEO.

Suivant la nature de l’activité antitumorale des inhibiteurs de PARP, nous postulons que de cibler la biosynthèse de la molécule à laquelle font compétition les PARPi, soit le substrat duquel dépend l’activité de PARP1, pourrait sensibiliser une tumeur résistante à ces inhibiteurs, que la résistance soit acquise ou intrinsèque. Nous émettons que la chute des concentrations de

NAD intracellulaires potentialiserait l'effet apoptotique induit par les PARPi dans les cellules tumorales de cancer de l'ovaire, rendant ainsi les PARPi plus efficaces à de plus faibles doses. Ce type de synergie a par ailleurs été démontrée dans d'autres cancers, supportant notre hypothèse (337, 338).

Plus généralement, nous émettons que l'étude différentielle de l'activité de voies de signalisation et de l'expression de gènes clés pourrait aiguiller sur la nature de la sensibilité ou de la résistance aux PARPi, et que certaines cibles d'intérêt pourraient être découvertes de cette façon. Nous estimons par ailleurs que les informations obtenues sur un PARPi pourraient être au moins partiellement applicables aux autres inhibiteurs de la même famille.

### **1.5.3 Objectifs de recherche**

Ce projet de thèse visera d'abord la caractérisation d'un nombre de lignées cellulaires pour ajouter à notre banque déjà établie et, de ce fait, compenser certaines lacunes en termes de diversité de sous-types.

Ensuite, nous développerons des modèles cellulaires pouvant servir à l'étude de la résistance acquise aux inhibiteurs de PARP. À l'aide de ces modèles, nous chercherons à évaluer l'efficacité de notre approche pour contrer la résistance — acquise at innée — aux inhibiteurs de PARP via l'inhibition de la voie de synthèse du NAD principale. Cette approche a notamment été prouvée efficace dans le cancer du sein triple négatif intrinsèquement résistant aux PARPi (337).

Finalement, nous chercherons à identifier d'autres pistes de solutions pour mieux comprendre la résistance acquise et intrinsèque aux inhibiteurs de PARP, et ainsi fournir de potentielles voies de traitement pour la contrer.

## Chapitre 2 – Résultats

### 2.1 Article 1 — Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease

#### 2.1.1 Article 1 — Résumé en français

**Titre en français :** Modéliser la diversité du cancer épithélial de l’ovaire à l’aide de dix nouvelles lignées cellulaires bien caractérisées couvrant plusieurs sous-types de la maladie

Les lignées cellulaires cancéreuses sont parmi les modèles précliniques les plus importants. Dans le contexte du cancer épithélial de l’ovaire, une maladie hautement hétérogène avec divers sous-types, il est primordial d’étudier un large spectre de modèles afin de dresser un portrait représentatif de la maladie. Comme cette malignité gynécologique n’a vu que peu de progrès en survie globale dans la dernière décennie, il est d’autant plus pressant de supporter la recherche future avec des modèles d’étude robustes et diversifiés. Ici, nous décrivons dix nouvelles lignées cellulaires de cancer de l’ovaire dérivées de patientes et spontanément immortalisées, détaillant leur profil de mutations et d’expression de gènes/biomarqueurs, ainsi que leurs caractéristiques de croissance *in vitro* et *in vivo*. Huit des lignées cellulaires ont été classées comme séreuses de haut grade, alors que deux ont été déterminées comme appartenant aux sous-types plus rares, mucineux et à cellulaires claires, respectivement. Chacune des dix lignées cellulaires présente une gamme de caractéristiques reflétant divers phénomènes cliniques, incluant la résistance chimiothérapeutique, le potentiel métastatique, et des profils de mutations et d’expression de gènes/protéines associés aux sous-types. Surtout, quatre des lignées ont pu former des tumeurs sous-cutanées en souris, une caractéristique clé pour les essais de drogues pré-cliniques. Notre travail contribue significativement aux modèles disponibles pour l’étude du cancer ovarien, fournissant davantage d’outils pour mieux comprendre cette maladie complexe.

## 2.1.2 Article 1 — Version originale soumise à Cancers

**Cancers (Basel). 2020 Aug; 12(8): 2222.**

### **Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease**

Skye A. Sauriol,<sup>1,2,†</sup> Kayla Simeone,<sup>1,2,†</sup> Lise Portelance,<sup>1,2</sup> Liliane Meunier,<sup>1,2</sup> Kim Leclerc-Desaulniers,<sup>1,2</sup> Manon de Ladurantaye,<sup>1,2</sup> Meriem Chergui,<sup>1,2</sup> Jennifer Kendall-Dupont,<sup>1,2</sup> Kurosh Rahimi,<sup>3</sup> Euridice Carmona,<sup>1,2</sup> Diane M. Provencher,<sup>1,2,4</sup> and Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada. <sup>2</sup> Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada. <sup>3</sup> Department of Pathology, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, QC H2X 3E4, Canada. <sup>4</sup> Division of Gynecologic Oncology, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada. <sup>5</sup> Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

<sup>†</sup>These authors contributed equally to the work.

\*Correspondence: [anne-marie.mes-masson@umontreal.ca](mailto:anne-marie.mes-masson@umontreal.ca); Tel.: +514-890-8000 (ext. 25496)

#### **2.1.2.1 Abstract**

Cancer cell lines are amongst the most important pre-clinical models. In the context of epithelial ovarian cancer, a highly heterogeneous disease with diverse subtypes, it is paramount to study a wide panel of models in order to draw a representative picture of the disease. As this lethal gynaecological malignancy has seen little improvement in overall survival in the last decade, it is all the more pressing to support future research with robust and diverse study models. Here, we describe ten novel spontaneously immortalized patient-derived ovarian cancer cell lines, detailing their respective mutational profiles and gene/biomarker expression patterns, as well as their in vitro and in vivo growth characteristics. Eight of the cell lines were classified as high-grade serous, while two were determined to be of the rarer mucinous and clear cell subtypes, respectively. Each

of the ten cell lines presents a panel of characteristics reflective of diverse clinically relevant phenomena, including chemotherapeutic resistance, metastatic potential, and subtype-associated mutations and gene/protein expression profiles. Importantly, four cell lines formed subcutaneous tumors in mice, a key characteristic for pre-clinical drug testing. Our work thus contributes significantly to the available models for the study of ovarian cancer, supplying additional tools to better understand this complex disease.

**Keywords:** biomarkers; carboplatin; cell lines; clear cell; epithelial ovarian cancer; gene expression; high-grade serous; mucinous; mutation profile; xenograft.

#### **2.1.2.2 Introduction**

Ovarian cancer is the most lethal gynaecological cancer, and fifth leading cause of malignancy-related deaths in North American women [1]. Ovarian cancer is most often detected at a later stage, when the patient shows distant metastases, largely owing to the asymptomatic nature of early disease, followed by lack of specific symptoms at later stages [2,3]. The 5-year survival rate of ovarian cancer at its late stage is 29% [2,3]. Moreover, ovarian cancer is a heterogeneous group of diseases, which can be classified based on various factors including site of origin, genomic stability, and prognosis, with the most common form being epithelial ovarian cancer (EOC), representing 90% of all cases [4]. EOC is further classified into subtypes with differences in morphology, etiology, pathogenesis, pathology, molecular biology, and prognosis. High-grade serous carcinoma (HGSC) is diagnosed in 70% of the cases. Less common subtypes include mucinous carcinomas (MCs), low-grade serous carcinomas (LGSCs), clear-cell carcinomas (CCCs), and endometrioid carcinomas (ECs), accounting for 2–3%, <5%, 5–10%, and 10% of cases of EOC, respectively [5,6].

The most common risk factor for EOC is a family history of ovarian cancer. An estimated 25% of all ovarian cancer cases could be due to inherited genetic mutations, the most frequent being a germline BRCA1 or BRCA2 mutation but also, to a lesser degree, germline mutations in RAD51C, RAD51D, PALB2, and FANCI, with a higher incidence in the HGSC subtype [7,8,9,10,11]. It has also been shown that germline mutations in the DNA mismatch repair genes, known as Lynch syndrome, are an important risk factor for the EC and CCC subtypes of EOC [12].

Furthermore, EOC tumors usually present somatic mutational profiles that are characteristic to each subtype. Notably, in addition to a high proportion of germline BRCA1/2 mutations, HGSC tumors harbor a virtually ubiquitous somatic TP53 mutation (>95%), as well as less commonly mutated genes, including CSMD3, NF1, CDK12, and FAT3 [13,14]. LGSCs, on the other hand, are almost never TP53-mutated, and instead show high-frequency mutually exclusive mutations in KRAS, BRAF, NRAS, or ERBB2 [15,16,17]. CCC tumors often harbor PIK3CA, ARID1A, and KRAS mutations, amongst others, as well as a frequent loss of PTEN expression [15,16,18,19]. MC tumors are characterized by a high frequency of KRAS mutation, in addition to TP53, BRAF, and CDKN2A alterations [15,16,20]. EC tumors have a high frequency of ARID1A mutations, as well as moderately frequent mutations of PIK3CA, CTNNB1, and PTEN, usually presented as loss of expression or loss of heterozygosity, with some tumors rarely harboring a TP53 mutation [15,16,21]. Despite being different diseases, the multiple subtypes of EOC are treated with the same standard front-line therapy: primary debulking surgery, and chemotherapy as an adjuvant or neo-adjuvant setting. Standard chemotherapy for front-line therapy in EOC is a combination of the DNA cross-linking compound carboplatin and the microtubule-stabilizing drug paclitaxel [2,3,22,23,24]. Although initial response rates are high (80%), the disease eventually recurs in 4 out of 5 patients, who then develop chemoresistance [25,26]. Over the past 30 years, advances in surgery, chemotherapy, targeted therapy agents (such as bevacizumab and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors) and other evolving therapies (such as immunotherapy) have improved the 5-year progression-free survival rate but have had little impact on overall patient survival [2,3,4,27,28,29,30,31], underscoring the need for the development of new clinical tools for the management of EOC patients. Therefore, reliable and specific pre-clinical models are needed for the emergence of significant novel EOC drugs in clinical trials.

In this context, patient tumor-derived cell lines are efficient, inexpensive, and easy to maintain, and thus make for an attractive human pre-clinical cancer model [32,33]. Ovarian cancer being highly heterogeneous, a larger number of models need to be studied to cover the heterogeneity seen in the clinic, and a wide variety of cell lines is necessary to get a representative and accurate picture of the disease. Currently, available EOC cell lines are limited in number and characterization, especially when it comes to less common subtypes [15]. In addition, the



relevance of the most commonly used cell lines as HGSC models has been called into question, suggesting that these might not be representative of the disease that they model [34,35], highlighting the need for more diversity of HGSC cell lines. We previously derived and characterized 22 EOC cell lines (from 16 patients) [36,37,38,39], with 19 being HGSC, as well as one of each LGSC, EC, and CCC, which were used to better understand the biology of ovarian cancer.

Here, we present 10 novel patient-derived EOC cell lines (from 10 different patients) and their generation, and describe their in vitro and in vivo growth characteristics, molecular biology, genetic mutation profiles, and histopathology. Eight of these cell lines were identified as HGSC cells, and two were found to be of the MC and CCC subtypes, respectively. All of the HGSC cell lines were TP53-mutated, whereas the MC and CCC cell lines were TP53 wild-type but harbored KRAS mutations specific to their respective subtypes. Importantly, four of these cell lines form xenograft tumors in mice, a key characteristic for pre-clinical drug testing. These 10 new cell lines contribute significantly to the EOC cell lines available for research by their diversity and molecular characteristics.

### **2.1.2.3 Results**

#### *Patient Tumor-Derived EOC Cell Lines*

The cell lines were derived from the samples of 10 patients (2085, 2414, 2835, 2881, 2929, 2978, 3121, 3291, 3331, and 3392) treated between 2001 and 2010, whose clinical characteristics are described in Table 1; Table 2 (and Table S1 and Figure S1). Of note, all patients were diagnosed with late stage (IIIC) disease between 42 and 77 years of age and died of disease progression between 2 to 86 months after diagnosis. They were treated with platinum-based chemotherapy, in combination with paclitaxel (or cyclophosphamide, in the case of 2414). Most patients (6/10) showed complete initial response to chemotherapy for at least one month after the end of the last cycle, as defined by the Gynecological Cancer Intergroup (CGIC) [40,41]. However, when platinum sensitivity was evaluated based on previously described consensus [2,3,40,42], the majority of patients (7/10) were categorized as resistant (recurrence at <6 months from the end of first-line treatment) or refractory (recurrence during first-line treatment) (Table 2). Patients

2881 and 3121 received neo-adjuvant chemotherapy, whereas patient 3331 did not undergo cytoreductive surgery. More than half (5/9) of the patients who did receive cytoreductive surgery were free of residual disease (Table 2). Because all patients were treated prior to 2010, none of them received PARP inhibitors, which have recently become part of the therapeutic armamentarium for this disease [43].

None of the patients harbored a somatic BRCA mutation. Patients 2085 and 2881 had a family history of breast cancer and malignant neoplasm of the urinary tract, respectively, whereas patients 2929 and 3392 had a previous personal history of colorectal cancer of the sigmoid junction and breast cancer, respectively. Histopathology indicated that 7 of the 10 primary tumors were of the HGSC subtype, one was of the MC subtype (2414), and one was of the CCC subtype (3392). As patient 3331 did not undergo surgery, histopathology was not possible, but cytology confirmed that the patient's tumor was an adenocarcinoma (AC).

Sampling that resulted in the described cell lines for each of the 10 patients was done between 2004 and 2007. This sampling coincided with initial debulking surgery in the case of 6 of the patients (2929, 2978, 3121, 3291, 2414, 3392) or was done at a later point during laparotomy (2835, 2881) or ascites collection (2085, 3331) (Table 2 and Figure S1). Four of the patients (2929, 2978, 3291, 2414) were chemo-naïve at the time of sampling. Patient 3392 was naïve to ovarian cancer treatment but received prior chemotherapy for breast cancer. The samples that served to derive the cell lines were either ascites (OV\_) or solid tumor tissue of the ovary (TOV\_). TOV cell lines were derived from samples of the right ovary (\_D) or an unspecified ovary (TOV2414), or from metastases at the omentum (\_EP) (Table 2).

Nine of the ten cell lines displayed homogenous morphology after 60 passages, whereas one of the cell lines, OV3291, exhibited slowed growth after 50 passages and reached growth arrest before reaching 60 passages. This cell line was thus tested after reaching 30 passages, but before reaching passage 45. For the most part, the morphology of the cell lines exhibited the characteristic flattened cobblestone-like appearance of epithelial cells (Figure 1). Two of the cell lines, OV3291 and TOV2414, showed a more stretched spindle-like morphology, whereas OV2085 displayed small clusters of loosely attached round cells, which grew perpendicularly to the culture

plate. TOV3392D, which had a characteristic flat epithelial morphology, grew in very dense clusters, gaining little confluence despite the increase in cell count (Figure 1).

#### *Characteristic Subtype-Specific EOC Mutation and Gene Expression Profiles*

Subtypes of EOC are known to harbor certain specific high-frequency mutations [13,15,16,18,20,21,44]. Using whole exome sequencing (WES) and selective mutation analyses, we surveyed the various subtype-specific recurrent mutations described by TCGA (for HGSC) and by various reports (for EC, MC, and CCC) [13,15,16,18,20,21]. All analyzed cell lines that were described as HGSC, as well as OV3331, harbored a TP53 mutation; most (5/8) were missense mutations with amino acid substitutions (Table 3). The remaining TP53 mutations are two frameshift mutations due to a nucleotide deletion (TOV3121EP, OV3331) and a splicing variant mutation (OV2978). All of these TP53 mutations are described in the IARC TP53 database [45] and code for non-functional variants. The two non-HGSC cell lines TOV2414 and TOV3392D, on the other hand, did not harbour any TP53 mutations (Table 3). These results correspond to what is expected of the analyzed subtypes [13,46,47,48].

Of the other described rare but recurrent mutations in HGSC [13], we identified a splicing mutation of CDK12 in OV3291, a missense mutation of FAT3 in TOV2881EP, and a missense mutation of CSMD3 in TOV3121EP. Both missense mutations lead to amino acid substitutions. No mutations were detected in any other recurrent mutated genes in HGSC, including BRCA1, BRCA2, NF1, GABRA6, and RB1 (Table 3). We identified recurrent mutations in KRAS in both the MC (TOV2414) and CCC (TOV3392D) cell lines analyzed but did not detect mutations in any of the other prevalently mutated genes in these subtypes, including PIK3CA, ARID1A, BRAF, PTEN, CTNNB1, PPP2R1A, and NRAS (Table 3) [16,19,49,50,51,52]. Of note, mutations identified in the OV2978 (TP53) and OV3291 (TP53 and CDK12) cell lines (Table 3) are identical to their matched tumor cell lines (TOV2978G and TOV3291G), described in our previous publication [39].

Cell lines were also characterized at the transcriptome level by gene expression microarray. Non-supervised hierarchical clustering demonstrated that seven of the eight HGSC cell lines clustered together (the exception being OV3291) and that the MC and CCC cell lines grouped in a separate cluster, confirming the distinct molecular identity of the derived cell lines

(Figure 2a). Cell lines OV2978 and OV3291 clustered together with their matched cell lines, TOV2978G and TOV3291G. Additional clustering information was obtained by principal component analysis (PCA) (Figure 2b), which illustrates separation of the non-HGSC cell lines from the rest.

To further demonstrate the clinical relevance of our established cell lines, we compared the gene expression profiles of our eight HGSC cell lines, as well as the two matched TOV2978G and TOV3291G cell lines, with that of 593 HGSC tumors from the TCGA dataset publicly available at the UCSC Xena platform [53]. We selected the top 1000 up- or downregulated genes in the TCGA tumor samples and verified their expression in our HGSC cell lines. Our results (Figure 2c) show a striking similarity in the expression of these genes between our cell lines and the tumor samples. Then, following a previously described procedure [54], we selected the 1000 most variably expressed genes in the TCGA dataset and obtained a significant positive correlation (Pearson correlation analysis) with our cell lines ( $r = 0.4148$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 2d). These results, together with our mutational profiling data, strongly suggest that our cell lines retain the molecular characteristics of the ovarian cancer disease.

#### *Comparison of Subtype-Specific Biomarkers in Tumor Tissue and Cell Lines*

Due to the selection pressure inherent in establishing immortalized cell lines, it is important to verify that the cell line obtained reflects the EOC subtype of the original tumor. Therefore, we performed specific protein biomarker analyses of tumor tissue samples and cell lines by immunohistochemistry (IHC) and Western blot (WB), respectively. The tumor tissue of origin of the corresponding patient was subjected to a hematoxylin and eosin (H&E) staining, followed by IHC stains for various described epithelial ovarian cancer biomarkers [55] (Figure 3 and Figures S2 and S3). The representative epithelial malignant region characteristic of each EOC subtype [56,57] was selected based on morphology by H&E stain by a gynaecologic-oncology pathologist (KR), and the same region was used for each biomarker tested by IHC.

Previous work has shown the H&E and IHC staining of the tumor of origin for patients 3291 and 2978 [39], and an extract of this published data is shown in Figure S3. Patient 3331, on the

other hand, did not receive surgery, thus preventing us from testing the tumor of origin of its corresponding cell line.

Expression of cytokeratins (CK7, CK8, CK18, and CK19) confirmed the epithelial origin of the patient tumors (Figure 3, Figures S2 and S3a) and associated cell lines (Figure 4, Figures S3b and S4). The expression of specific biomarkers was then investigated to confirm the subtype of each patient tumor and derived cell line. In the case of HGSC tumors, TP53 is mutated in more than 95% of cases, which is reflected at the expression level either by robust overexpression (missense mutation) or complete absence (null mutation) of the p53 protein [55,56,58]. As expected, p53 is strongly overexpressed in all HGSC tumors and cell lines harboring missense TP53 mutations (Figure 3; Figure 4, Table 3), but is absent in 3121 and 3331 that harbor frameshift null mutations, as well as in 2978 that harbors a splicing variant mutation. On the other hand, tissue from patients 2414 and 3392 showed intermediate levels of p53, typical of the wild-type TP53 genotype observed in their corresponding cell lines (Figure 3 and Figure 4, Table 3). To confirm that the frameshift and splice TP53 mutations identified in our cell lines would not code for a truncated p53 protein that would not be recognized by the antibody used, we verified the TP53 mRNA expression of our cell lines using our microarray data. Our results showed that the three cell lines harboring frameshift or splice mutations have absent to very low mRNA levels of TP53, corroborating the absence of protein expression on the Western blot (Figure S5a). On the other hand, wild-type TP53 or missense mutations showed high levels of mRNA expression. Furthermore, we confirmed that in all the TP53 mutated cell lines, p53 is not functional, as evidenced by absent or very low mRNA levels of CDKN1A (p21), a known p53 target [59,60], as opposed to high levels of CDKN1A in the wild-type TP53 cell lines (Figure S5b).

Amongst the other markers for HGSC, PAX8 is expressed across all EOC tumors, whereas Wilms tumor 1 (WT1) is solely expressed in the HGSC tumors (Figure 3 Figure S3). However, the ascites-derived cell line OV3291 did not express WT1 (Figure 4), despite its associated tumor of origin and corresponding tumor cell line TOV3921G expressing this protein (Figure S5) [39]. A common origin for these two matched cell lines was demonstrated by the presence of identical TP53 and CDK12 mutations, as well as by their proximal gene expression clustering (Table 3, Figure 5a). Intriguingly, OV3291 cells expressed WT1 mRNA, and the expression of the WT1

protein was not increased by inhibition of the proteasome (Figure S6), ruling out stability as the mechanism of regulation responsible for the absence of WT1 expression. Further investigation is warranted to fully understand this phenomenon.

The Western blot analysis of the TOV2414 cell line, on the other hand, showed a lack of PAX8 expression (Figure 4). This discrepancy between tissue and cell line can be explained by the focal localization of this protein in the tumor tissue, which would have been lost by random selection during the establishment of the TOV2414 cell line.

Primary ovarian MC and colorectal metastases to the ovary overlap on many commonalities, making them difficult to differentiate [57,61]. Most notably, absence of SATB2 expression, focal expression of PAX-8, positive expression of MUC5AC and MUC2, and to a lesser extent, positive expression of CK20, strongly suggest that the tumor from patient 2414 is of the mucinous subtype of ovarian origin, rather than a metastasis from the colon, the appendix or the endometrium (Figure 3 and Figure S2) [62,63,64]. This is in spite of positive expression of CDX2 (Figure S2), which is more frequently positive in colorectal MC than ovarian MC (50% versus 38.3%, respectively) [65].

Ovarian CCC, on the other hand, is often confused with metastatic endometrial or renal clear cell carcinoma (RCCC), due to overlapping characteristics [66,67,68,69]. The tumor of origin of patient 3392 tests positive for Napsin A, and tests negative for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), WT1, and ARID1A (Figure 3 and Figure 4), suggesting that the tumor was not of endometrial origin [55,66,67]. In addition, positive staining for CK7 and p16 (focal and patchy), as well as negative staining for CK20 (Figure 3 and Figure 4 and Figure S2), set 3392 apart from RCCC [68,69,70]. Taken together, these results are strong evidence suggesting that the 3392 tumor and its corresponding cell line are of the CCC subtype and of ovarian origin.

In addition, we showed that all HGSC cell lines, but not the MC or CCC, express high levels of the CDKN2A mRNA (p16 protein) (Figure S5c), which is a distinct feature of HGSC tumors [71,72].

Tumor expression of ER and PR was shown to help distinguish the different subtypes of EOC [55,73]. Our results show that most analyzed HGSC tumors (2085, 2835, 2929, 3121)

presented high levels of ER expression and absent or patchy expression of PR, whereas expression of both ER and PR in the MC (2414) and CCC (3392) tumors was absent (Figure 2 and Figure S3), as expected for these subtypes [55,73]. Expression of ER in each tumor's corresponding cell line was confirmed by WB, which correlated with expression in the tumor of origin (Figure 3). Protein expression of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) is associated with malignant transformation and is overexpressed in serous EOC subtypes in 10–20% of cases [74,75]. HER2 was shown to be expressed in the tumor of origin of patient 3291 (Figure S3a) [39], but we did not detect expression of this protein in any of the other solid tumors tested (Figure S2).

Collectively, our protein biomarker analysis together with our gene expression and mutational profiling demonstrate the suitability of our cell lines as pre-clinical models to specific EOC subtypes.

#### *Diverse in Vitro Growth Characteristics*

Growth characteristics were assessed by measuring doubling times (Table 4) and by live cell imaging (Figure 5 and Figure S7) with confluence-based quantification fitted onto a curve, as described in Methods. Average time to saturation was determined based on live cell imaging data and reported as the number of days required to reach >95% confluence from a starting confluence of 5–10% (Table 4).

Average doubling time varied greatly from one cell line to the next, ranging from 1.3 to 6.2 days (Table 4). Of note, the two non-HGSC cell lines TOV2414 and TOV3392D showed significantly lower doubling time than the rest of the cell lines tested (Student's t-test,  $p = 0.0013$ ) but were not significantly different when compared to each other (Student's t-test,  $p = 0.12$ ). The confluence-based proliferation curves show that TOV2414 was the fastest-growing cell line, whereas OV2085 was the slowest (Figure 5 and Figure S7). For the majority of cell lines, the confluence-based proliferation curves showed similar results to doubling time (i.e., high proliferation rate, low doubling time value), except for OV2085 and TOV3392D, whose confluence curves indicate a slower growth than their doubling time values when compared to other cell lines (Figure 5 and Figure S7, Table 4). This discrepancy can be explained by the unique growth phenotype of these two cell lines, which causes dissociation between changes in confluence and

cell number. TOV3392D has a low doubling time (2.1 days) but grows very compactly and thus takes longer to achieve confluence (26.0 days) despite the increase in cell number. OV2085, on the other hand, grows upward rather than along the bottom of the culture dish, thus proliferating without accurately reflecting this change on confluence (Figure 5 and Figure S7, Table 4). Saturation density ranged from  $1.3 \times 10^6$  cells for the OV3291 cell line, whose cells are morphologically large, to  $15.2\text{--}17.8 \times 10^6$  cells for the OV2085 and TOV3392D cell line, which have a very small and compact morphology at saturation (Table 4).

As previously tested with the other EOC cell lines derived in our laboratory [39,76,77], the ability of the cell lines to form spheroids was determined using the hanging droplet method, evaluating shape, compactness, aggregation, and consistency of the spheroids formed (Figure 5, Table 4). Out of the ten cell lines tested, only TOV3392D consistently formed compact spheroids. TOV3121EP and OV3291 formed spheroids with small, compact cores surrounded by loosely aggregated cells with an irregular margin. TOV2835EP, OV2978, and OV3331 formed loose aggregates rather than solid spheroids, and TOV2929D consistently formed compact flat discs rather than spherical. OV2085, TOV2414, and TOV2881EP did not form spheroids using this method (Figure 6).

The migration potential of each cell line was evaluated by wound-healing migration assay using live cell imaging (Figure 6). Migration velocity was calculated based on wound surface closure as a function of time, as described in Methods (Table 4). TOV2414 showed the highest migration velocity ( $103.0 \mu\text{m/h}$ ), closing the wound entirely in less than 12 h (Student's t-test,  $p = 2.79 \times 10^{-12}$ ), whereas TOV3392D and TOV2929D had the slowest migration velocity ( $0.9 \mu\text{m/h}$  and  $3.8 \mu\text{m/h}$ , respectively), showing little to no ability to migrate (Student's t-test,  $p = 1.64 \times 10^{-30}$ ). OV3331 migrated visibly with low velocity ( $9.7 \mu\text{m/h}$ ), whereas TOV2835EP, TOV2881EP, OV2978, TOV3121EP, and OV3291 demonstrated similar intermediate wound-healing efficacy ( $32.4\text{--}42.9 \mu\text{m/h}$ ) (Table 4). The migration potential of OV2085 could not be determined by this assay, as this cell line could not be seeded at confluence prior to scratching, precluding the generation of a clean wound.

#### *Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy*



The carboplatin sensitivity of the cell lines was evaluated by clonogenic survival assays. Among all the cell lines tested, TOV3392D and TOV2414 were the most strongly resistant to carboplatin, with a half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of 18.4 and 11.2  $\mu$ M respectively, significantly higher than all the HGSC cell lines (Student's t-test,  $p = 8.31 \times 10^{-10}$ ). This chemoresistance cannot be attributed to an inherent low growth characteristic of these cell lines, since they were found to have the fastest doubling time (Table 4). However, our results are coherent with the current knowledge of CCC and MC, which are usually intrinsically refractory to platinum-based chemotherapy [78,79,80,81]. In line with these results, patient 2414 did not respond very strongly to chemotherapy (Table 2, Figure S1). However, as opposed to what was shown in vitro, patient 3392 was surprisingly the most sensitive to chemotherapy (Table 2). This could possibly be explained by the increased efficacy of a carboplatin/paclitaxel combination, which was not tested in vitro, compared to carboplatin alone [82].

Of the other cell lines tested, OV2978 and TOV2881EP exhibited strong sensitivity to carboplatin ( $IC_{50} < 1 \mu$ M), significantly more sensitive than the other HGSC cell lines tested (Student's t-test,  $p = 0.00054$ ). On the other hand, TOV2835EP, TOV2929D, TOV3121EP, OV3291, and OV3331 exhibited intermediate sensitivity to carboplatin ( $IC_{50}$  between 1 and 5  $\mu$ M) (Table 4). The sensitivity of OV2085 could not be determined with this assay, as this cell line did not form clones.

#### *In Vivo Growth Characteristics*

To evaluate growth potential in vivo, each cell line was injected subcutaneously (SC) or intraperitoneally (IP) in NOD rag gamma (NRG) mice ( $n = 5$  mice per injection site for each cell line) (Figure 7 and Figure S8). Four of the cell lines, OV2085, OV3331, TOV2414, and TOV3392D, produced tumors in mice upon SC injection. TOV3392D produced the most rapidly growing tumors of the four cell lines, reaching 500  $mm^3$  after an average of 35 days post-SC injection, but this cell line also induced severe cachexia in all mice injected SC ( $n = 10$  mice over 2 experiments), forcing ethical interruption of the experiment and sacrifice of the mice between 53 and 68 days post-injection. Of the other tumor-forming cell lines, OV2085 grew the fastest, followed by TOV2414 and OV3331, which reached a tumor volume of 500  $mm^3$  after an average 65, 125, and

170 days, respectively (Figure 7). None of the other cell lines could form tumors in this mouse model (Table S2, Figure S8).

Cell lines injected IP were tested for formation of ascites, tumors at site of injection, and metastases at abdominal organs. Only TOV2414 and TOV3392D formed peritoneal tumors at the site of injection. OV3331, OV2085, and TOV2929D formed medium to large metastases in most cases, whereas TOV2414, TOV2881EP, and TOV3392D formed very small metastases. OV3331, OV2085, TOV2881EP, and TOV2929D all formed large volumes of ascites, between 2 and 8.5 mL per mouse (Figure 7, Table S3).

#### **2.1.2.4 Discussion**

Epithelial ovarian cancer is a highly heterogeneous disease that poses critical challenges when choosing appropriate pre-clinical models relevant in translational science. On one hand, EOC is classified into five main subtypes (HGSC, LGSC, EC, CCC, and MC) with differences in morphology, etiology, pathogenesis, pathology, molecular biology, and prognosis [5,6,13,15,16,18,20,21,44]. On the other hand, the most frequent EOC subtype (HGSC) has a high rate of genomic instability, thus rendering it highly heterogeneous even within its own subtype [44,83,84,85]. Therefore, it is important to have reliable pre-clinical models for the rare EOC subtypes, but it is imperative to have a multitude of HGSC models to cover the different facets of this common but variable subtype.

Despite their limitations, tumor-derived cell lines remain one of the most versatile pre-clinical models; they can be cultured two-dimensionally, as three-dimensional spheroids, and even in vivo as xenografts. However, concerns exist on the process of adaptation to in vitro cell culture conditions, which can be reflected on the success rate of cell line generation. The 10 novel EOC cell lines described in this publication were derived in the same time frame (2004–2011) as 16 others from our laboratory [37,38,39], with a success rate of 13%, or slightly higher than what was recorded in the literature available at the time (0–10%, [86,87,88,89]). However, a recent publication demonstrated a 77% success rate of the establishment of ovarian cancer cell lines [90] through the use of a combination of new enriched culture medium and plates with positively and negatively charged plastic. The authors showed that their established cell lines retained the

genomic landscape, histopathology, and molecular features of the original tumors. Results from the present work, together with those from our previous publication [39], also show that our cell lines retain the histological, genomic, and molecular characteristics of the original tumors. Therefore, albeit with a lower success rate, our established EOC cell lines have the potential to be used as reliable pre-clinical models for future investigations concerning new treatment modalities for the different EOC subtypes.

From the 10 novel patient-derived EOC cell lines described here, eight were identified as HGSC, one as MC, and one as CCC. Each cell line was successfully characterized as belonging to the subtype of the original patient sample by detailed protein biomarker (Figure 3 and Figure 4, Figures S2–S4) and mutational and gene expression landscapes (Figure 2, Table 3) analyses. Notably, all cell lines determined to be of the HGSC subtype harbored an annotated TP53 mutation, and the two non-HGSC cell lines TOV2414 and TOV3392D did not. These data were confirmed by WB of whole cell lysates and IHC staining of the tumor of origin for each cell line, where cell lines with missense TP53 mutations had a robust p53 overexpression, and those with frameshift/splice TP53 mutations (null) did not express the p53 protein or mRNA. The two non-mutated cell lines, on the other hand, showed low or focal expression of p53 in IHC and moderate expression of the protein in WB. These are expected p53 phenotypes, as previously described [55]. Concordantly, p53 was shown to be functional only in the two non-HGSC cell lines.

Further confirmation of the HGSC subtype involved the protein expression profiles of WT1, PAX8, and ER, [55]; the mRNA expression of the CDKN2A gene (p16 protein) [71,72]; and sporadic mutations in the FAT3, CDK12, and CSMD3 genes [13]. Most importantly, we demonstrated the clinical relevance of our HGSC cell lines, as their gene expression landscape was very similar to that of HGSC tumors from 593 patients from the TCGA cohort. Moreover, each of the eight HGSC cell lines described present distinct growth and tumorigenic properties relevant for pre-clinical models. In the past, our group has described and characterized 19 HGSC cell lines derived from patients' ascites or ovarian tumor tissue [36,37,38,39]. In the present work, we describe three HGSC cell lines derived from omentum tissue (EP) that could prove relevant for studying the spread of the ovarian disease to the omentum, as this is an International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) characteristic for stage IIIC [91], the stage in which all patients

in this study were classified (Table 1). Of these cell lines, TOV2835EP and TOV3121EP did not form SC or IP tumors in NRG mice, and demonstrated strong and intermediate in vitro sensitivity to carboplatin treatment, respectively. However, the TOV2881EP cell line, which also demonstrated intermediate in vitro sensitivity to carboplatin treatment (Table 4), formed in vivo metastases and ascites when injected IP, though it did not form SC tumors (Figure 7). Interestingly, the time of sampling for this latter cell line coincided with a recurrent peak of CA125 levels in the patient of origin (Figure S1), which was not the case for the two former cell lines. Therefore, TOV2881EP might be an interesting model to study disease spread at recurrence. In this study, we also described a cell line derived from ovarian tissue, TOV2929D, with intermediate in vitro carboplatin sensitivity (Table 4), and the ability to form in vivo metastases and ascites when injected IP, but without forming tumors when injected SC (Figure 7). The time of sampling for this cell line also coincided with a CA125 peak in the patient of origin but not at a point of recurrence (Figure S1). Although the sensitivity of our cell lines to carboplatin was assessed by clonogenic survival, i.e., a single cell assay, we do not rule out the possibility that their sensitivity might differ if a cell population-based assay, such as proliferation, was to be used. This will be important to take into consideration in future drug sensitivity studies involving these novel cell lines.

Of the other HGSC cell lines, OV2085 and OV3331 are attractive pre-clinical models, in that they respectively show fast and slow in vivo growth when injected SC, and they both form IP tumors (Figure 7). These could serve as clinically relevant models to evaluate drug efficacy for treating tumors with distinct growth characteristics. The OV3331 cell line showed intermediate carboplatin sensitivity in vitro, but that of the OV2085 cell line could not be determined by clonogenic assay (Table 4). It would be interesting to evaluate carboplatin sensitivity using an in vivo model.

Cell lines OV2978 and OV3291 are derived from ascites, and are matched to their ovarian tumor cell lines derived from samples collected at the same time point for their corresponding patients [39]. For the majority of analyses, the matched HGSC cell lines behave similarly, notably in in vitro cell growth and carboplatin sensitivity, as well as the inability to form SC or IP tumors in mice. However, cell line OV3291 could not be immortalized after multiple attempts to reach cell passages higher than 55, similarly to one of our previously published cell lines, TOV-81D [36].

Upon reaching passage 50, cell proliferation is slowed, and from passage 53, cell morphology changes and cells become enlarged and non-proliferative. However, our laboratory had previously described a tumor-derived cell line from the same patient, TOV3291G. This cell line was shown to persist at least until passage 100 [39], making this pair of cell lines an interesting model to study cancer cell line immortalization. Another key difference between these two matched cell lines is the expression of WT1, an important marker of HGSC [92]. While the ascites-derived OV3291 cell line does not express WT1 in Western blot, its matched tumor-derived cell line TOV3291G, as well as its tumor of origin, does express the WT1 protein [39]. Nevertheless, the molecular identity of the OV3291 cell line in relation to TOV3291 was confirmed both at the DNA (mutational profile) and RNA (gene expression clustering) levels.

As for the MC cell line TOV2414, strong indicators for its ovarian mucinous subtype, aside from wild-type p53 and absence of WT1 expression, include the observed KRAS mutation, absence of SATB2 and focal expression of PAX8 [52,55,62]. This cell line is particularly interesting with respect to its very fast in vitro growth, strong migratory capacity, chemoresistance to carboplatin, and ability for form both SC and IP tumors. This model reflects the outcome of the patient who had the shortest overall survival of all patients in this study (Table 1). Our ovarian CCC cell line TOV3392D, also TP53 wild-type, harbours an uncommon but recurrent KRAS mutation, in addition to its cell population phenotype of clear cells and hobnail nuclei, as well as expression of Napsin A and absence of ER and PR, strongly confirming its CCC subtype rather than metastatic endometrial carcinoma [56,66,93,94]. ARID1A and PIK3CA mutations are often immediately associated with the CCC subtype [19,50,51,95]. These genes are amongst the most recurrently mutated in this subtype; however, these mutations are estimated to have a frequency of 46–57% and 28–40%, respectively; thus, the absence of mutations of these genes in our TOV3392D cell line does not negate it as a CCC cell line. This cell line produced the most rapidly growing SC tumors in NRG mice and was the most resistant to carboplatin in vitro of all cell lines studied. It also formed IP tumors and metastasis, and mice injected with TOV3392D presented with severe cachexia, a clinically relevant ovarian cancer symptom.

Although several EOC cell lines were reported in the literature, a large number of these were insufficiently characterized, lacking important histological and molecular information. These

include recently characterized ovarian cancer cell lines, where information regarding the tumor of origin, i.e., histology and protein biomarker analysis is not available for all the patients from which the cell lines were derived [54,90,96]. Moreover, systematic genomic and morphological analyses of a panel of the most often used ovarian cancer cell lines suggested that most of these cell lines were unlikely to originate from HGSC [34,35,97] and, thus, are inadequate models for studying this disease. Similarly, several non-HGSC cell lines failed to represent the EOC subtype as classified [15,34]. Our present work, which makes available 10 novel, diverse, and representative EOC cell lines, significantly improves the representation of EOC by its cell line models. Although eight of the ten cell lines presented here are of the same subtype, each presents a unique combination of individual characteristics, making them valuable models that can be combined with some of our previous well-characterized cell lines [36,37,38,39] to study a vast array of phenomena, in order to better understand this heterogeneous disease.

#### **2.1.2.5 Materials and Methods**

##### *Patient and Sample Data*

Tumor and ascites samples were obtained from patients from the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Division of Gynaecologic Oncology, following informed consent. The stage was determined at the time of surgery by an on-site gynaecologic oncologist following the FIGO classification criteria [91]. Histology and tumor grade were evaluated by a gynaecologic-oncology pathologist according to FIGO recommendations [91]. The study was approved by the relevant institutional ethics committee, the Comité d'éthique de la recherche du CHUM (#2005-1893, BD 04.002–BSP).

##### *Cell Line Establishment and Culture Conditions*

Ten cell lines were established from samples originating from ten patients: 2085, 2414, 2835, 2881, 2929, 2978, 3121, 3291, 3331, and 3392. All cell lines were kept in low oxygen conditions at 37 °C, 7% O<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub> throughout the derivation process, following a previously established protocol [39]. Briefly, in the case of ovarian tumor (TOV) tissue-derived cell lines, tissue was scraped into a 100 mm plate with complete OSE medium (see below) and maintained for 40 days with weekly culture medium replacement. In the case of ovarian ascites (OV)-derived

cell lines, patient ascites were centrifuged, where the cellular fraction was collected and seeded into a 100 mm plate, maintained by the same protocol as TOV cell lines. Cells were passaged at near-confluence and were considered immortal upon reaching 50 passages. Cells were maintained at 37 °C in low oxygen conditions (7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) and grown in complete OSE medium, consisting of OSE medium (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada), 10% fetal bovine serum (Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 0.5 µg/mL amphotericin B (WISSENT Inc.), and 50 µg/mL gentamycin sulfate (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) (normal culture conditions; NCC). Cells were passaged by trypsin 0.05% (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) digestion before reaching confluence, and culture medium was replaced weekly if cells were not passaged for more than seven days. All assays on these cell lines were conducted between passages 60 and 80, except in the case of OV3291, a non-immortalized cell line, which were conducted between passages 30 and 45.

### *Mutational Profiling*

Libraries for whole exome sequencing (WES) were prepared from 500 ng of DNA using the NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 kit (Roche NimbleGen, Inc., Madison, WI, USA), followed by paired-end sequencing on the HiSeq 4000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), according to recommended protocols, at the Centre d'expertise et de services (CES) Génome Québec (<https://cesgq.com/>). Alignment to the human genome NCBI37/hg19 was also performed by this facility to obtain BAM files of each of the 10 cell lines. BAM files were then uploaded into the public European Galaxy Network [98]. Variant calling in selected subtype-specific genes (TP53, BRCA1, BRCA2, NF1, GABRA6, RB1, CSMD3, CDK12, FAT3, ARID1A, BRAF, PTEN, PIK3CA, CTNNB1, PPP2R1A, NRAS, KRAS) was achieved using freebayes [99], SamTools & Bcftools [100], and reads were trimmed with a minimum Phred score of 30. Annotations were then added using SnpEff [101], dbNFSP [102] and Variant Effect Predictor [103]. From the annotated list of variant calls, only those referred as missense, splice variant, or frameshift with deleterious or damaging mutations were selected. Finally, the reads matched to variants in candidate genes were verified manually through Integrative Genomics Viewer (IGV) [104], and only variants with more than 80% of reads were accepted as homozygous somatic mutations presented in Table 4.

### *Gene Expression Microarray*

RNA from 32 EOC cell lines, which includes 10 from this study and 22 previously characterized by our group [36,37,38,39], was extracted from cells when cell confluence reached 50–70%, using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), according to the recommended protocol. Microarray experiments were performed at the McGill University and the CES Génome Québec. Briefly, total RNA was quantified using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), and its integrity was confirmed to have an RNA Integrity Number (RIN) of >9.0. using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Sense-strand cDNA (ss-cDNA) was synthesized from 100 ng of total RNA, and fragmentation and labeling were performed to produce ss-cDNA with the GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Then 2.8 µg of DNA target was hybridized on Clariom™ S Assay HT, human (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and processed on the GeneTitan® Instrument (Thermo Fisher Scientific, Inc.) using the instrument's Hyb-Wash-Scan automated workflow. Obtained CEL files were extracted and normalized using the Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 software (Affymetrix). In this study, we performed subsequent gene expression analyses on the 10 cell lines described herein, as well as the matched TOV2978G and TOV3291G cell lines. For these 12 cell lines, unsupervised hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) were performed using the TM4 MultiExperiment Viewer v3 software (MeV), a free, open-source tool for analyzing microarray data [105].

To demonstrate that the eight HGSC cell lines described here were clinically relevant, their microarray data (plus those from the two matched TOV2978G and TOV3291G cell lines) were compared to that of the publicly available Affymetrix U133a gene expression microarray data from 593 HGSC tumors from the TCGA cohort. The whole Affymetrix dataset was downloaded using the UCSC Xena Functional Genomics Explorer platform [53]. To harmonize our data with that of TCGA, the expression values of our microarray were converted to base 2 log. For both datasets, the mean values and their standard error of the mean (SEM) were calculated for each gene. We selected the 1000 most upregulated genes and the 1000 most downregulated genes from the TCGA dataset based on the average values and verified their expression in our



microarray dataset. Following a previously described procedure [54], we then selected the 1000 most variably expressed genes in the TCGA dataset based on the highest SEM values. This list of genes was verified in our microarray dataset, and a Pearson correlation analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### *Immunohistochemistry*

Tissue sections (4  $\mu\text{m}$  thick) were entirely stained with automated stain kit (Table S4) (Ventana Medical Systems Inc., Oro Valley, AZ, USA). Slides were heated to 95  $^{\circ}\text{C}$ , and cell conditioning solutions (Ventana Medical Systems Inc.) #1 (cc1, cat.#950-124) or #2 (cc2, cat.#950-123) were added for set lengths of time for antigen retrieval (refer to Table S4 for cell conditioning solution and antigen retrieval time). Pre-diluted antibodies (Table S5) were added manually. All slides were incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Antigen-antibody reaction was revealed using Universal DAB detection kits (Ventana Medical System Inc.) (refer to Table S4). At the end of the experiment, counterstaining was achieved with hematoxylin and bluing reagent (Ventana Medical System Inc.). H&E staining was performed using the Varistain XY model of the Shandon Multi-Program Robotic Slide Stainer (Thermo Fisher Scientific Inc.) and following a standard H&E protocol. Tissue slide sections were scanned with a VS-110 microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) with a 20X objective. The OlyVIA v2.9 software (Olympus) was used for image analysis.

### *Western Blot*

Cells were scraped from a petri dish with PBS at around 60–70% confluence, pelleted, and lysed with mammalian protein extraction reagent (Triton X-100 1%, Glycerol 10%, Tris-Base pH 4.7 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) on ice for three times 5 min, vortexing between each incubation. Protein concentration was measured by Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using the GENESYS 10S US-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then 30  $\mu\text{g}$  of total protein extract were loaded and migrated at 100V in Mini PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup>. Stain-Free 4–15% gradient Tris-glycine SDS-polyacrylamide 15-well gels (Bio-Rad Laboratories) and transferred onto 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membranes with the Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad Laboratories) using the mixed

molecular weight program. Membranes were blocked with a PBS-Tween-milk solution (Tween 20 0.1%, milk 5%) and incubated with primary antibodies (Table S5) overnight at 4°C. Bound primary antibody was detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and Amersham™ ECL Prime Western Blotting detection reagents (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Chemiluminescence was imaged using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### *Cell Growth Rates and Saturation Density*

Growth rates were determined by measuring doubling time, as previously described [36,37,39], as well as by following changes in cell confluence through live cell imaging. For determining the doubling time, cells were seeded in parallel in distinct plates of the same size with identical densities. After two to five days incubation in NCC, cells were detached with trypsin, resuspended in culture medium and counted using a hemocytometer. Cell counts at two different time points (final count and initial count) were compared, and doubling time was calculated using the following simplified version of an established formula [106]:

$$\text{Doubling time} = \frac{\Delta t}{\log_2\left(\frac{C_2}{C_1}\right)}$$

where  $C_2$  and  $C_1$  respectively represent the later and earlier cell counts at two distinct time points, and  $\Delta t$  represents the elapsed time between cell counts  $C_2$  and  $C_1$ . Cell confluence was followed by live cell imaging using the IncuCyte® ZOOM System (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI, USA) and calculated using the IncuCyte® ZOOM 2016B software (Essen BioScience Inc.), where specific confluence masks were created for each individual cell line based on their morphologies (Table S6). Estimated time to saturation (Table 4) was expressed as the average time required to reach saturation (>95%) from initial confluence (5–10%). Saturation density was defined as the mean number of cells on a 100 mm petri dish (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at confluence (>95%).

#### *Spheroid Formation Assay*

A spheroid assay was performed to determine which cell lines could form three-dimensional aggregating structures using a previously described method [39,76,77]. In 16  $\mu\text{L}$  of

complete OSE medium, 2000 cells were suspended and placed on the cover of a non-coated plastic petri dish, which was subsequently inverted. Sterile PBS was added to the bottom of the plate to prevent evaporation of the hanging droplets. Droplets were incubated in NCC for 6 to 10 days, and spheroid formation ability was classified based on shape and compactness of the three-dimensional structures.

#### *Wound-Healing Assay*

Cells were seeded at confluence in a 96-well plate and incubated in NCC for 24 h. Wells were subsequently scratched using the IncuCyte® WoundMaker (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI, USA), washed with PBS, and incubated in NCC. Scratches were monitored by live cell imaging using the IncuCyte® ZOOM System (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI, USA), and images were analyzed using the publicly available MRI Wound Healing Tool macro on ImageJ [107,108]. Residual scratch width was calculated by dividing the calculated area by image length, and velocity was expressed as  $\mu\text{m}/\text{h}$ .

#### *Carboplatin Sensitivity Assay*

Carboplatin sensitivity was determined by clonogenic survival assays, as previously described [38,109]. Cells were seeded in a series of 6-well plates at a cell-line dependent density which allowed the formation of isolated clones: 750 cells/well (TOV2414; OV3331), 1500 cells/well (TOV2835EP; OV3291), 2000 cells/well (TOV3121EP), or 4000 cells/well (TOV2881EP; TOV2929D; OV2978; TOV3392D). Cells were incubated in NCC for 24 h, after which the culture medium was replaced with complete OSE medium containing carboplatin (Accord Healthcare Inc., Kirkland, QC, Canada) at varying concentrations (0–100  $\mu\text{M}$ ). Cells were incubated with carboplatin for 24 h, after which the treatment medium was replaced by fresh complete OSE medium, and cells were then incubated until colonies were visible at a 2 $\times$  magnification (6–21 days). Plates were then fixed for ten minutes with cold methanol (Chaptec Inc., Montréal, QC, Canada) and colored for ten minutes with a solution of 50% v/v methanol and 0.5% m/v methylene blue (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA). Colonies were counted using a stereomicroscope, and the count for each concentration of treatment was reported as mean percent of control wells. Half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values

were calculated using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Each individual experiment was performed in duplicate and repeated three times.

## Mouse Experiments

All animal studies were approved by the Institutional Committee on Animal Protection (Comité institutionnel de protection des animaux-CIPA) protocol according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC) (protocols C14008AMMs and C18010AMMs). Tumorigenic potential was assayed by injection of cells in NOD.Cg-Rag1tm1Mom IL2rgtm1Wjl/SzJ (NOD rag gamma; NRG) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) at subcutaneous left gluteal injection (SC) or intraperitoneal (IP) sites, as previously described [39]. A total volume of 200  $\mu\text{L}$  was injected in each mouse, consisting of a suspension of  $5 \times 10^6$  cells in 100  $\mu\text{L}$  of cold Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) and 100  $\mu\text{L}$  of either Matrigel<sup>®</sup> Matrix (Corning Inc., Corning, NY, USA) for SC injections or D-PBS for IP injections. The mice were housed under sterile conditions in a laminar flow environment with unrestricted access to food and water. Formation of tumors, ascites, and metastases was evaluated twice a week for over 200 days. Animals were sacrificed before the mice reached certain limit points established by CIPA in accordance with guidelines by CCAC.

### **2.1.2.6 Conclusions**

Our work reports ten novel immortalized EOC cell lines, providing well-characterized pre-clinical models for the benefit of the research, medical, and pharmaceutical communities, in order to advance therapeutic strategies for this deadly disease. Thorough analyses of protein biomarkers, somatic mutations, and gene expression demonstrate that each cell line represents critical aspects of the histological subtypes from which they were derived. These cell lines have diverse in vitro growth characteristics critical to cover the individual differences of EOC patients. Furthermore, some of the cell lines have the ability to grow as xenografts in mice, making pre-clinical in vivo experiments possible. These reliable and versatile models offer valuable tools for the study of ovarian cancer.

### **2.1.2.7 Acknowledgments**

We would like to thank the gynecologic oncologists of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) for their collaboration in biobanking. We thank the animal facility of the Centre de recherche du CHUM (CRCHUM) animal facility for performing all animal experiments, and the molecular pathology core facility, as well as the ICM imaging/live imaging platform, for performing IHC staining and scans respectively. A.-M.M.-M. and D.M.P. are researchers of the CRCHUM/ICM, which receives support from the FRQS. A.S. was supported by an FRQS doctoral scholarship, as well as studentships from the Canderel Fund and the Michèle St-Pierre Scholarship of the ICM. K.S. was funded by the TransMedTech Institute and its main funding partner, the Canada First Excellence Fund, as well as by a studentship from the Canderel Fund of the ICM.

### **2.1.2.8 Supplementary Materials**

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2222/s1>, Figure S1: Patient progression and therapy graphs, Figure S2: Additional IHC stainings, Figure S3: H&E and IHC stainings of ovarian tumors from patients 2978 and 3291, and corresponding WB of the TOV2978 and TOV3291 cell lines, Figure S4: Whole Western blots of protein expression of markers in tumor cell lines, Figure S5: Gene expression of TP53, CDKN1A and CDKN2A. Figure S6: Characterization of WT1 expression in the OV3291 cell line, Figure S7: Confluence-based proliferation curves by live cell imaging fitted into a single graph, Figure S8: Supplementary in vivo growth characteristics, Table S1: Additional notes on patients from whom tumors were collected, Table S2: Additional observations in in vivo growth experiments (SC injections), Table S3: Additional observations in in vivo growth experiments (IP injections), Table S4: IHC conditions for staining whole ovarian tissue, Table S5: Antibodies used for IHC and Western blot, Table S6: IncuCyte ZOOM 2016B cell line-specific confluence mask parameters.

### **2.1.2.9 Author Contributions**

Conceptualization, A.-M.M.-M., D.M.P. and E.C.; data curation, L.P., M.d.L.; methodology, A.S., L.P., L.M. and K.R.; formal analysis, A.S., M.C. and E.C.; investigation, A.S., E.C., K.S., K.L.-D., J.K.-D., L.M., M.C. and M.d.L.; resources, D.M.P.; writing—original draft preparation, A.S.;

writing—review and editing, A.S., K.S., E.C., D.M.P., K.R. and A.-M.M.-M.; visualization, A.S., K.S. and E.C.; supervision, E.C., K.R., D.M.P. and A.-M.M.-M.; project administration, E.C. and A.-M.M.-M.; validation, A.S., K.R., K.S., J.K.-D. and K.L.-D.; funding acquisition, A.-M.M.-M. and D.M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### **2.1.2.10 Funding**

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR MOP142724) and the ICM (Fonds Défi Spyder and Anne-Marie Chagnon). Ovarian tumor banking was supported by Ovarian Cancer Canada (OCC) and by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) affiliated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet).

#### **2.1.2.11 Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

### 2.1.2.12 Figures and Tables

**Table 1** — Clinical characteristics of patients from whom cell lines were derived.

Patient ID	Age at Diagnosis	Survival (Months)	Disease Stage	CA125 at Presentation (U/mL)	Histo-Pathology Subtype	Somatic BRCA Status	Prior Cancer History	Prior Oncologic Treatment	Progression as Cause of Death
2085	63	28	IIIC	818	HGSC	Wild-type	None	None	Yes
2835	62	22		1126			None		
2881	56	50		1260			None		
2929	77	86		74			CR		
2978	63	28		2397			None		
3121	62	47		42	None				
3291	59	12		1631	None				
3331	72	13		3347	AC		None		
2414	63	4		1332	MC		None		
3392	42	29		275	CCC		Breast		

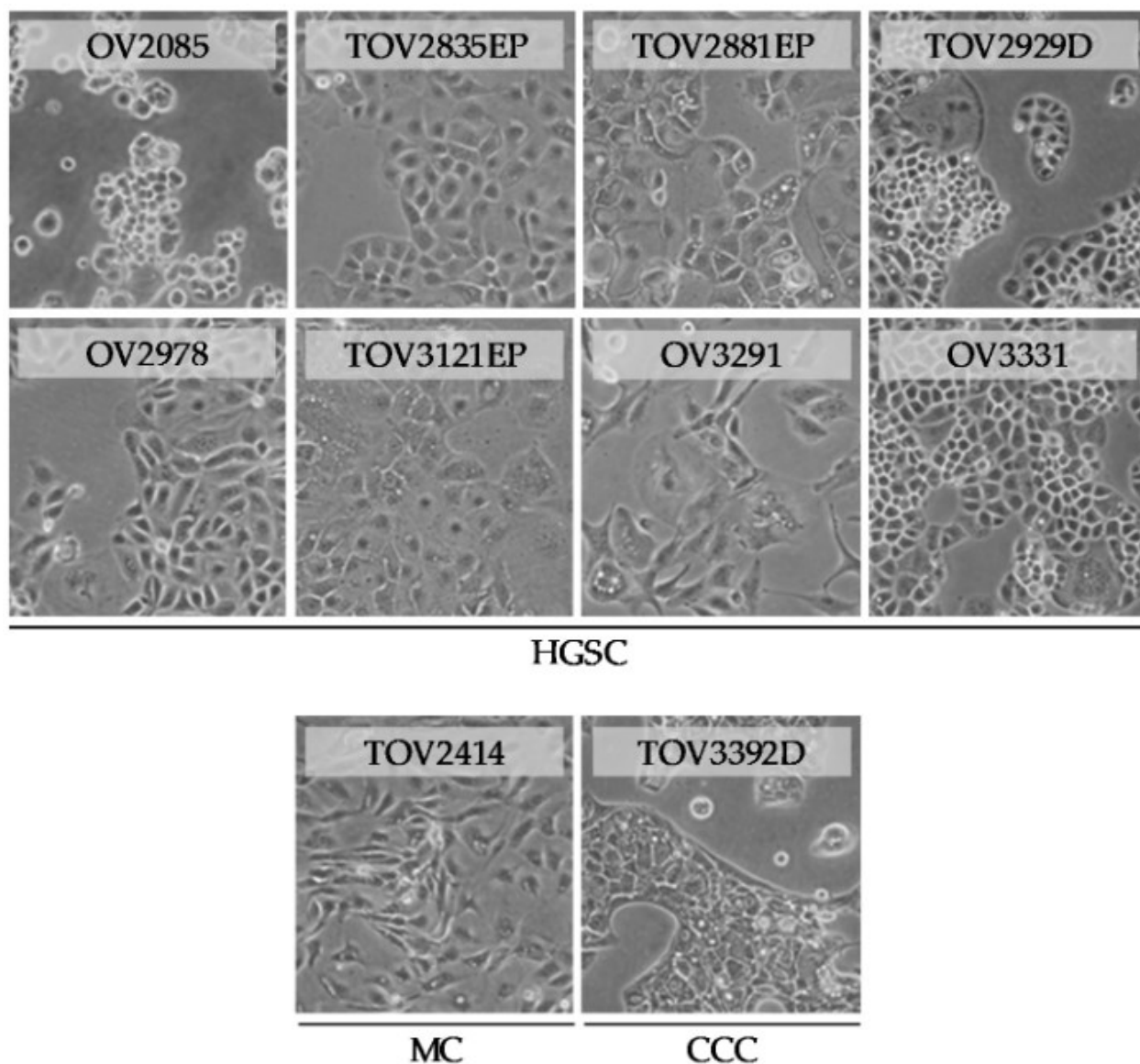
HGSC: high grade serous carcinoma; AC: adenocarcinoma; MC: mucinous carcinoma; CCC: clear cell carcinoma; CR: colorectal, FEC: 5-fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide; RT: radiotherapy; TzM: trastuzumab. The dashed lines indicate that the value applies to all lines.

**Table 2** — Treatment and sampling information for samples from which cell lines were derived.

Patient ID	Cancer of Origin	Cyto-Reductive Surgery, Residual Disease †	Initial Platinum Response (6 Months After First-Line) ‡	Oncologic Treatment Received Prior to Sampling	Platinum Sensitivity at Time of Sampling	Year at Sampling	Site of Sampling	Cell Line Designation
2085	Ovaries	Primary, Optimal	Sensitive	Carboplatin, Paclitaxel	Refractory	2004	Ascites	OV2085
2835	Peritoneal	Primary, Optimal	Resistant	Carboplatin, Paclitaxel	Resistant	2006	Omentum	TOV2835EP
2881	Ovary (L)	Secondary, Complete	Resistant	Carboplatin, paclitaxel, tamoxifen	Refractory	2006	Omentum	TOV2881EP
2929	Ovary (R)	Primary, Complete	Resistant	Chemonaïve	Resistant	2006	Ovary	TOV2929D
2978	Ovaries	Primary, Complete	Resistant	Chemonaïve	Resistant	2006	Ascites	OV2978
3121	Fallopian tubes	Interval, Optimal	Sensitive	Carboplatin, Paclitaxel	Refractory	2006	Omentum	TOV3121EP
3291	Ovaries	Primary, Complete	Resistant	Chemonaïve	Resistant	2007	Ascites	OV3291
3331	Ovaries	None	Refractory	Carboplatin, paclitaxel, epothilone B	Refractory	2007	Ascites	OV3331
2414	Ovaries	Primary, sub-optimal	Resistant	Chemonaïve	Resistant	2005	Ovary	TOV2414
3392	Ovary (R)	Primary, Complete	Sensitive	5-fluorouracil*, epirubicin*, cyclo-phosphamide*, radiotherapy*, trastuzumab*	Sensitive	2007	Ovary	TOV3392D

L: left; R: right; OV: ascites; TOV: solid tumor tissue; EP: omentum; D: right ovary; †: optimal if  $\leq 1$  cm, sub-optimal if  $\geq 1.0$  cm, complete if none, ‡: As defined by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG), \*: Received no ovarian cancer treatment prior to sampling, but had previously received oncologic treatment for breast cancer.



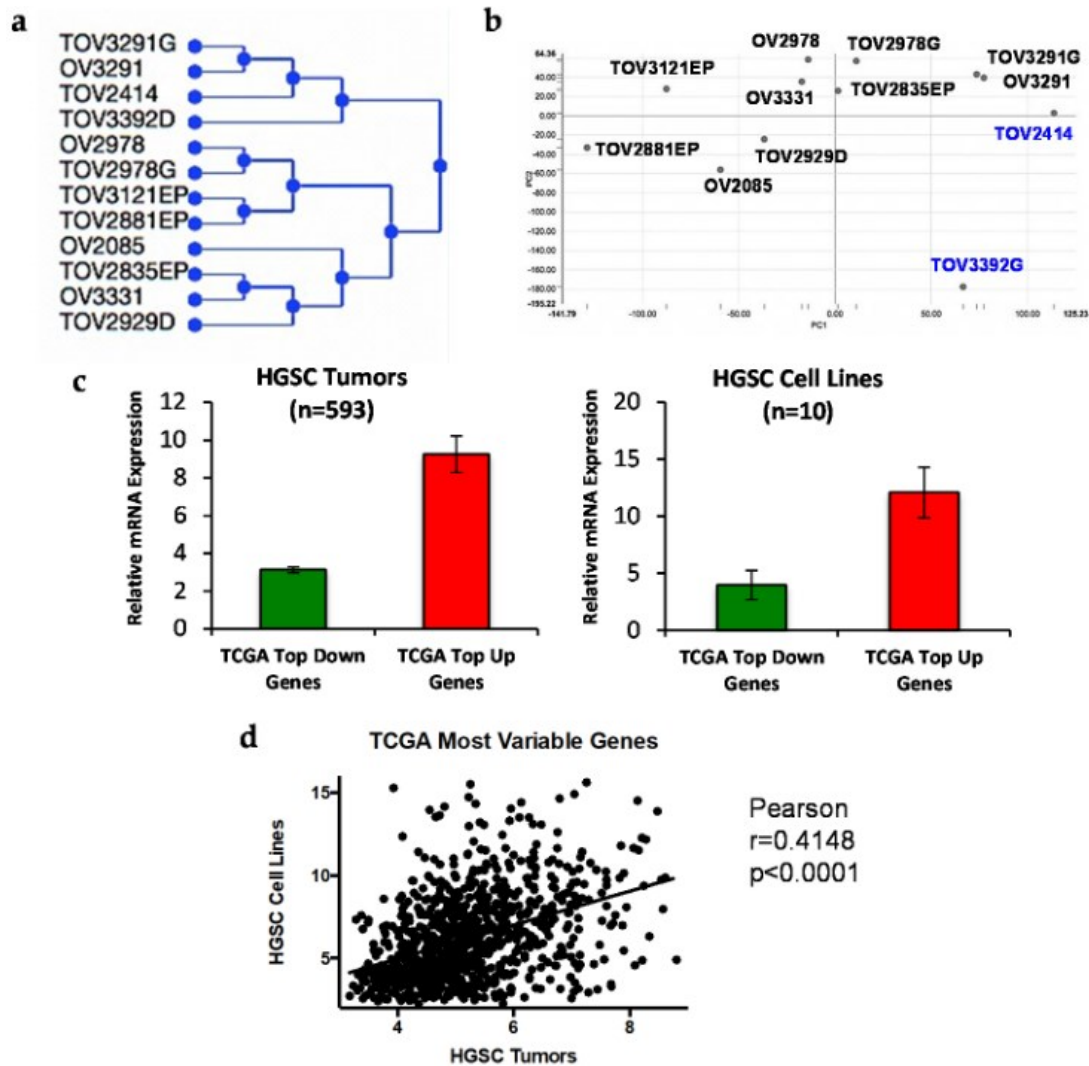


**Figure 1 — Morphology of 10 new patient-derived epithelial ovarian cancer (EOC) cell lines.** Shown are brightfield microscopy pictures of each cell line, between passages 60 and 75, except in the case of OV3291, represented at passage 33. At these passages, cells exhibited uniform morphology, and cell lines were devoid of fibroblast-shaped cells. All pictures were taken at a magnification of 100x.

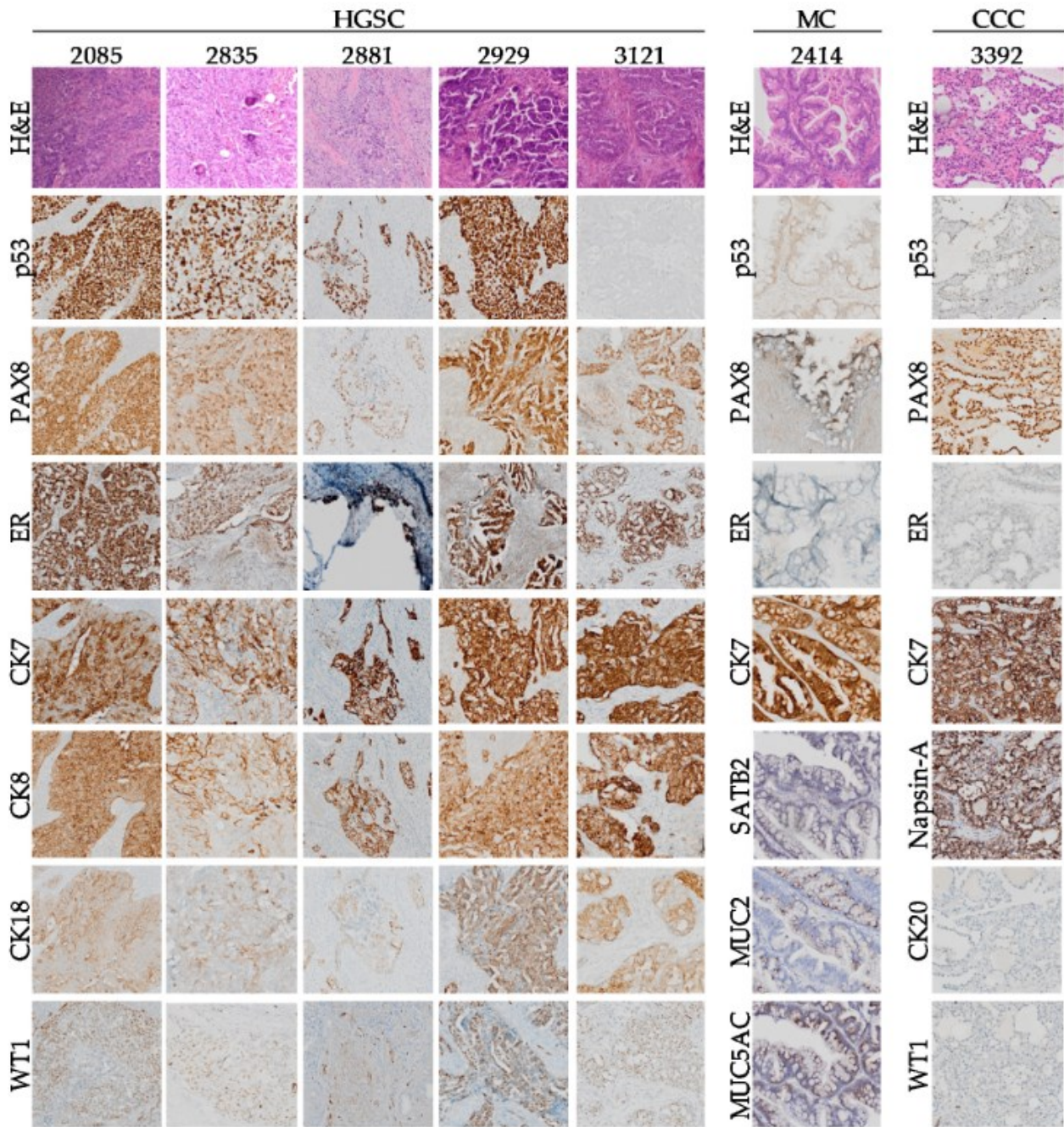
**Table 3** — Profiling of deleterious homozygous mutations by whole exome sequencing and mutation analysis of EOC subtype-specific candidate genes in the derived EOC cell lines.

Cell lines	Genes					
	<i>TP53</i>	<i>CDK12</i>	<i>FAT3</i>	<i>CSMD3</i>	<i>KRAS</i>	<i>BRCA1, BRCA2, NF1, GABRA6, RB1, ARID1A, BRAF, PTEN, PIK3CA, CTNNB1, PPP2R1A, NRAS</i>
OV2085	c.395A > G (missense, p.K132R)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
TOV2835EP	c.841G > T (missense, p.D281Y)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
TOV2881EP	c.467G > C (missense, p.R156P)	N.I.	c.286G > C (missense, p.G90A)	N.I.	N.I.	N.I.
TOV2929D	c.725G > A (missense, p.C242Y)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
OV2978	c.920-2 A > G (splice)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
TOV3121EP	c.641del (frameshift, p.H214fs)	N.I.	N.I.	c.1688A > G (missense, p.N563S)	N.I.	N.I.
OV3291	c.745A > T (missense, p.R249W)	c.3095 + 1 G > A (splice)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
OV3331	c.630del (frameshift, p.N210fs)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
TOV2414	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	c.35G > C (missense, p.G12A)	N.I.
TOV3392D	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	c.34G > A (missense, p.G12S)	N.I.

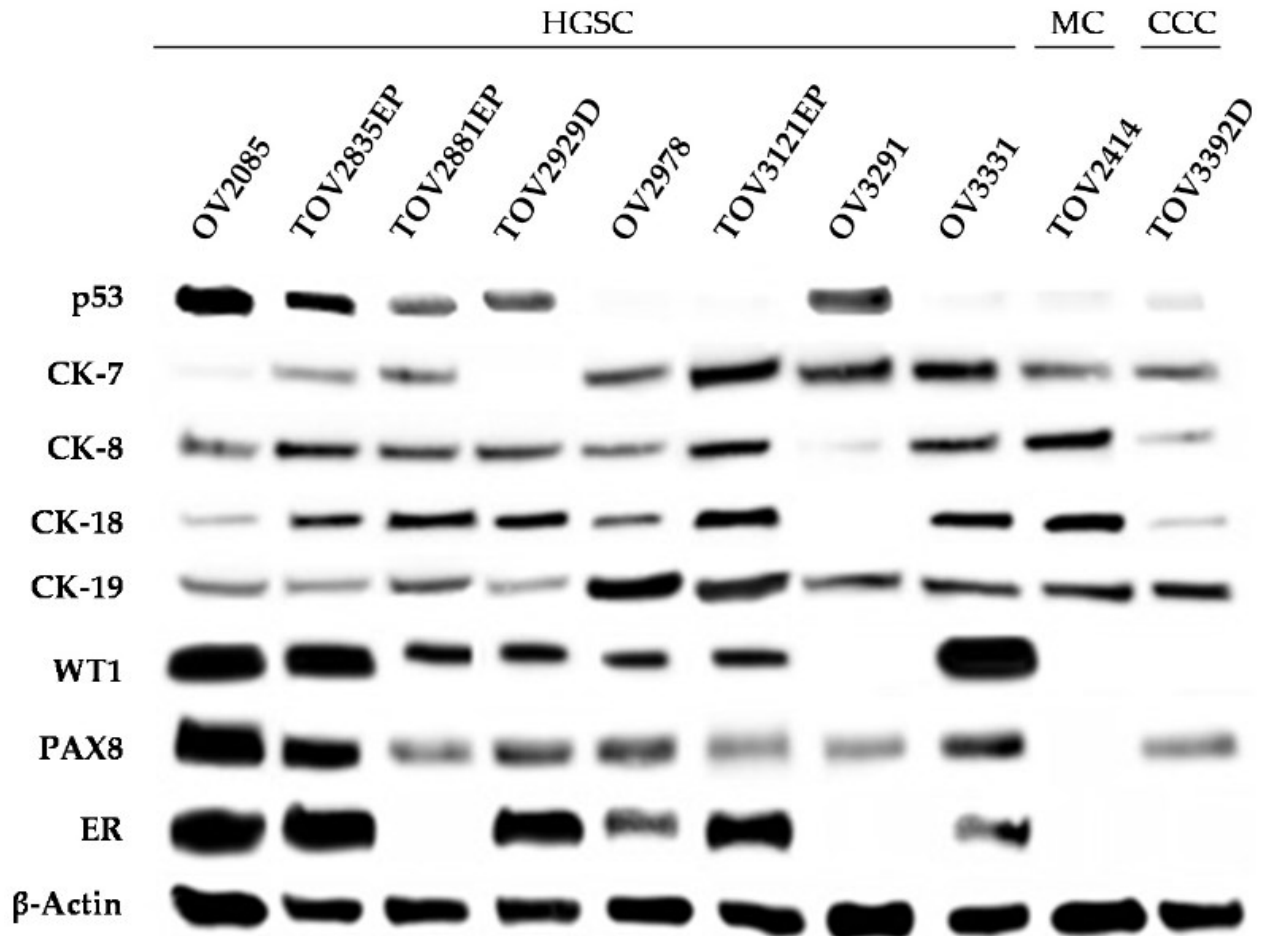
N.I.: none identified.



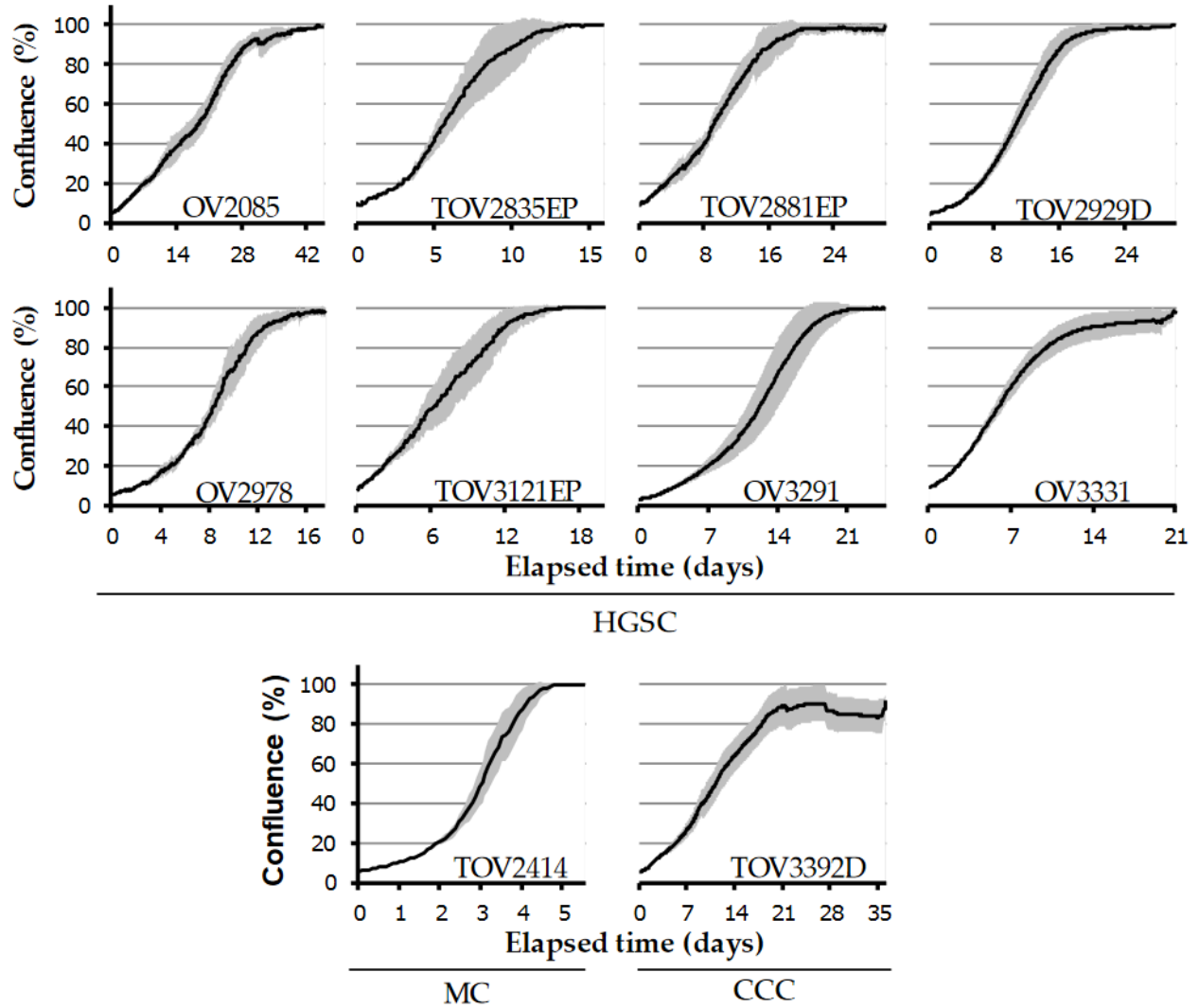
**Figure 2 — Gene expression analysis of our EOC cell lines, and comparison to tumor samples from the TCGA high-grade serous carcinoma (HGSC) dataset.** (a,b) The complete normalized gene expression data for each of the 12 analyzed cell lines (10 from this work plus the two matched tumor cell lines from patients 2978 and 3291) was subjected to (a) unsupervised hierarchical clustering and (b) principal component analysis (PCA) using the TM4 MeV software. (c) Expression of the 1000 most up- or downregulated genes in HGSC tumors from the TCGA cohort (left) was verified in 10 of our HGSC cell lines (8 from this work plus the two matched TOV2978G and TOV3291G cell lines) (right) and plotted as bar graphs (mean  $\pm$  SEM). (d) Expression of the 1000 most variably expressed genes in the TCGA HGSC cohort was verified in the 10 HGSC cell lines mentioned in (c), and Pearson correlation analysis was performed.



**Figure 3 — Immunohistochemistry staining for ovarian cancer markers.** Shown are immunohistochemistry (IHC) staining of the tumor of origin from which each cell line was derived, separated by subtype. Each tumor was tested for relevant biomarkers for its respective subtype.



**Figure 4 — Protein expression of EOC subtype-specific markers in tumor cell lines.** Detection of characteristic subtype-specific EOC markers (p53; cytokeratins 7, 8, 18, and 19; WT1; PAX8; and ER) of whole cell lysates of each cell line.  $\beta$ -Actin was used as control (n = 3).

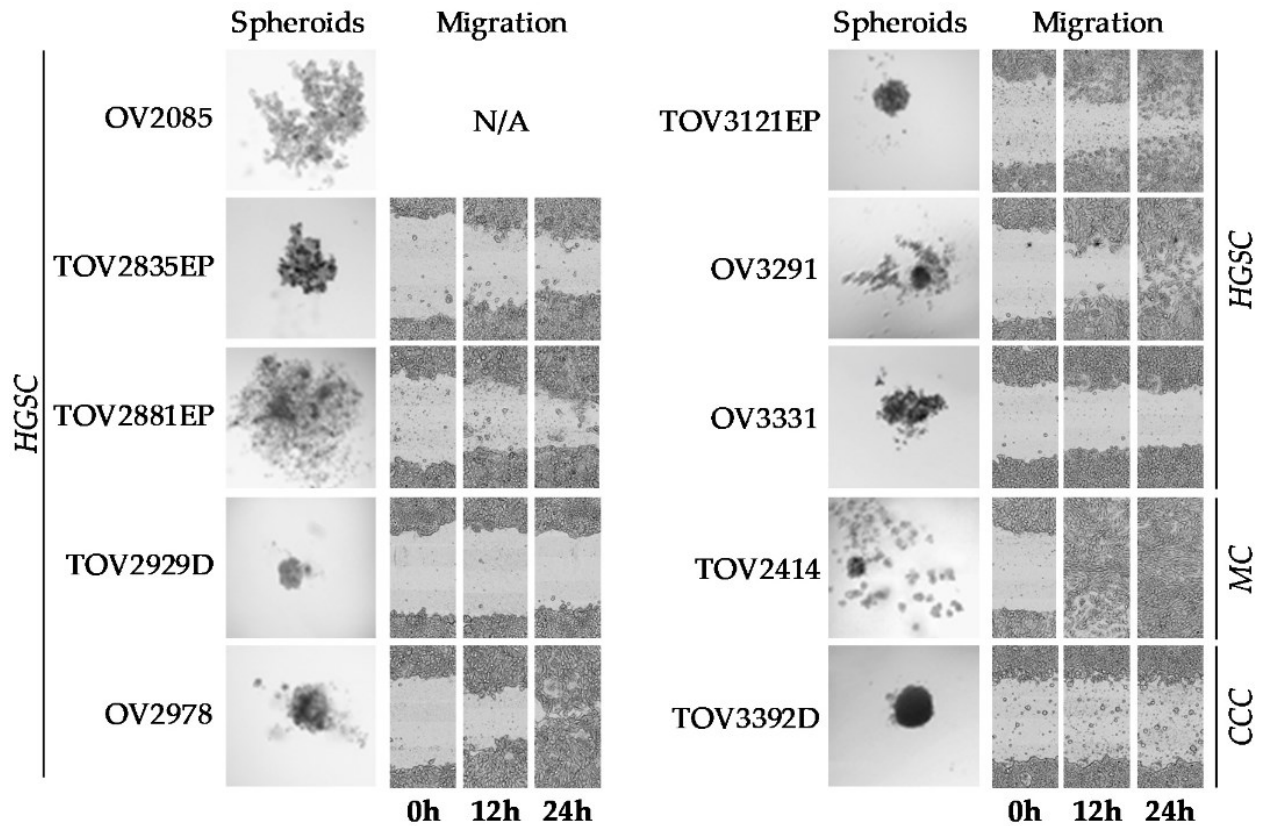


**Figure 5 — Confluence-based proliferation curves by live cell imaging.** Cell proliferation of each cell line was determined by measuring confluence every 2 h. Initial values of confluence were between 5 and 10%, and cells were left to proliferate until confluence reached approximately 100%. Grey zones represent SEM (n = 3).

**Table 4** — In vitro growth characteristics of the cell lines.

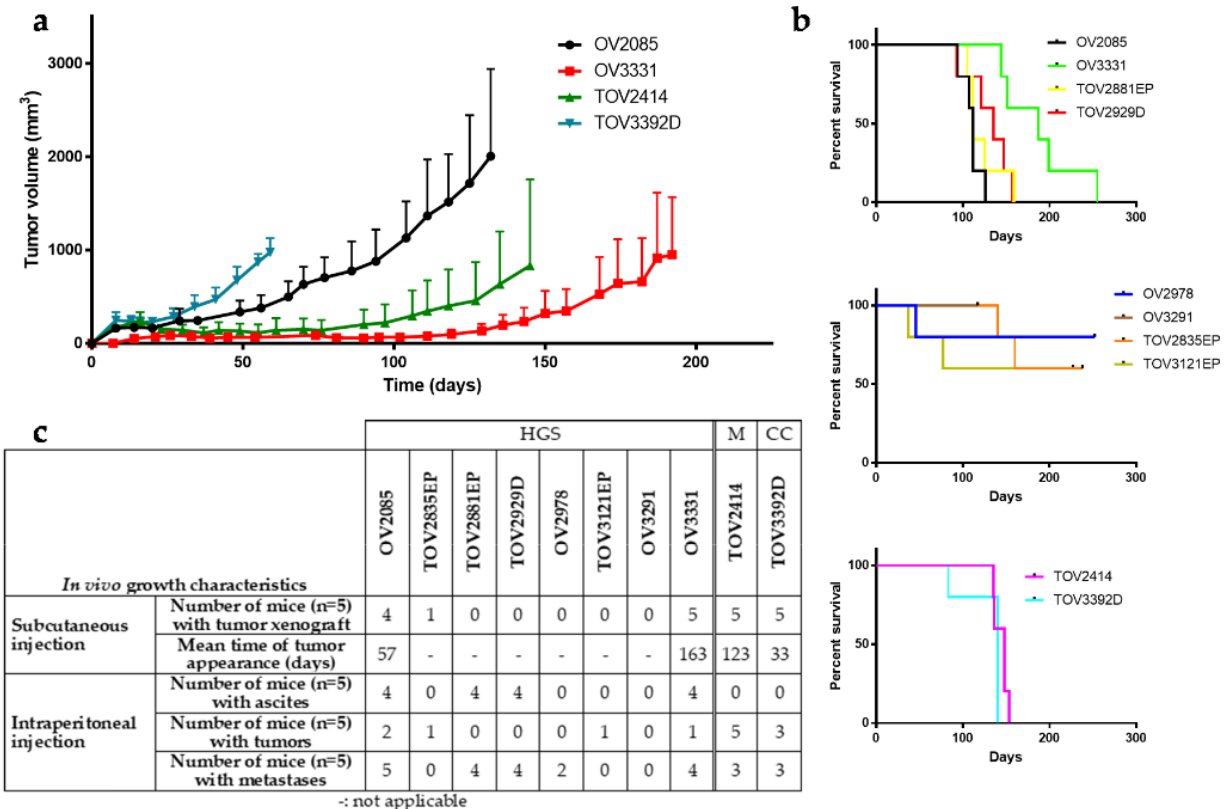
Cell Lines	Cell Line Growth Characteristics				Spheroid Formation	Migration Velocity ( $\mu\text{m/h}$ ) AVG $\pm$ SEM	Carboplatin IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) AVG $\pm$ SEM	
	Doubling Time (Days) AVG $\pm$ SEM	Time to Saturation * (Days) AVG $\pm$ SEM	Saturation Density ( $\times 10^6$ Cells) AVG $\pm$ SEM	Number of Passages to Date				
HGSC	OV2085	6.2 $\pm$ 2.2	36.2 $\pm$ 3.6	15.2 $\pm$ 4.0	>100	No	N/A	N/A
	TOV2835EP	2.4 $\pm$ 0.3	10.3 $\pm$ 1.7	6.4 $\pm$ 0.7	>100	Aggregate	35.9 $\pm$ 4.7	1.1 $\pm$ 0.5
	TOV2881EP	6.1 $\pm$ 1.7	17.6 $\pm$ 2.4	3.5 $\pm$ 0.2	80	No	32.4 $\pm$ 4.2	0.8 $\pm$ 0.1
	TOV2929D	6.0 $\pm$ 1.1	17.9 $\pm$ 2.4	9.3 $\pm$ 2.0	>100	Flat †	3.8 $\pm$ 1.3	4.0 $\pm$ 0.8
	OV2978	3.8 $\pm$ 0.03	13.3 $\pm$ 1.7	3.7 $\pm$ 0.9	>100	Aggregate	42.9 $\pm$ 4.9	0.5 $\pm$ 0.2
	TOV3121EP	3.0 $\pm$ 0.5	12.5 $\pm$ 2.1	2.8 $\pm$ 0.1	>100	Compact core	32.6 $\pm$ 11.7	4.3 $\pm$ 0.3
	OV3291	4.4 $\pm$ 0.6	16.9 $\pm$ 1.8	1.3 $\pm$ 0.3	55	Compact core	39.2 $\pm$ 5.7	5.0 $\pm$ 1.2
	OV3331	2.7 $\pm$ 0.3	16.7 $\pm$ 3.5	9.3 $\pm$ 1.9	80	Aggregate	9.7 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 0.8
MC	TOV2414	1.3 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.3	>100	No	103.0 $\pm$ 9.5	11.2 $\pm$ 3.0
CCC	TOV3392D	2.1 $\pm$ 0.4	26.0 $\pm$ 7.1	17.8 $\pm$ 2.7	80	Compact	0.9 $\pm$ 0.4	18.4 $\pm$ 3.8

IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration; N/A: data not available; \*: 95% confluence, from 5–10% starting confluence, as measured by live-cell imaging and cell line-specific confluence masks; †: spheroids were flat discs.



**Figure 6 — In vitro culture phenotypes.** Spheroid formation of cell lines after 5–8 days using the hanging droplet technique with 2000 cells seeded, and migration evaluated by wound-healing scratch assay. Photos for migration were taken 0, 12, and 24 h after the plate was scratched. All photos are representative of three independent experiments.





**Figure 7 — In vivo growth characteristics.** (a) Evolution of tumor volume after SC injection in NRG mice, for cell lines that induced observable tumor growth (n = 5). Points represent average  $\pm$  SEM, and curves were plotted when end points were attained per group, when the first animal was sacrificed. (b) Kaplan–Meyer survival curves of NRG mice after IP injection with each of the cell lines (n = 5). For clarity, cell lines were separated and grouped by HGSC that formed (top) or did not form (middle) tumors, ascites, and/or metastases in at least 3/5 mice, and non-HGSC cell lines (bottom). Censored data points represent mice that had reached end points. (c) Summarizing table of in vivo growth characteristics.

### 2.1.2.13 References

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 2019;69:7–34. doi: 10.3322/caac.21551.
2. Lheureux S., Braunstein M., Oza A.M. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J. Clin.* 2019;69:280–304. doi: 10.3322/caac.21559.
3. Lheureux S., Gourley C., Vergote I., Oza A.M. Epithelial ovarian cancer. *Lancet.* 2019;393:1240–1253. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32552-2.
4. Torre L.A., Trabert B., DeSantis C.E., Miller K.D., Samimi G., Runowicz C.D., Gaudet M.M., Jemal A., Siegel R.L. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* 2018;68:284–296. doi: 10.3322/caac.21456.
5. Kossai M., Leary A., Scoazec J.Y., Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology.* 2018;85:41–49. doi: 10.1159/000479006.
6. Meinhold-Heerlein I., Fotopoulou C., Harter P., Kurzeder C., Mustea A., Wimberger P., Hauptmann S., Sehoul J. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2016;293:695–700. doi: 10.1007/s00404-016-4035-8.
7. Norquist B.M., Harrell M.I., Brady M.F., Walsh T., Lee M.K., Gulsuner S., Bernard S.S., Casadei S., Yi Q., Burger R.A., et al. Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2016;2:482–490. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5495.
8. Wu X., Wu L., Kong B., Liu J., Yin R., Wen H., Li N., Bu H., Feng Y., Li Q., et al. The First Nationwide Multicenter Prevalence Study of Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations in Chinese Ovarian Cancer Patients. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2017;27:1650–1657. doi: 10.1097/IGC.0000000000001065.
9. Chao A., Chang T.C., Lapke N., Jung S.M., Chi P., Chen C.H., Yang L.Y., Lin C.T., Huang H.J., Chou H.H., et al. Prevalence and clinical significance of BRCA1/2 germline and somatic mutations in Taiwanese patients with ovarian cancer. *Oncotarget.* 2016;7:85529–85541. doi: 10.18632/oncotarget.13456.
10. Yang X., Song H., Leslie G., Engel C., Hahnen E., Auber B., Horvath J., Kast K., Niederacher D., Turnbull C., et al. Ovarian and breast cancer risks associated with pathogenic variants in RAD51C and RAD51D. *J. Natl. Cancer Inst.* 2020 doi: 10.1093/jnci/djaa030.
11. Tischkowitz M., Sabbaghian N., Hamel N., Pouchet C., Foulkes W.D., Mes-Masson A.M., Provencher D.M., Tonin P.N. Contribution of the PALB2 c.2323C>T [p.Q775X] founder mutation in well-defined breast and/or ovarian cancer families and unselected ovarian cancer cases of French Canadian descent. *BMC Med. Genet.* 2013;14:5. doi: 10.1186/1471-2350-14-5.
12. Fadare O., Parkash V. Pathology of Endometrioid and Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Surg. Pathol. Clin.* 2019;12:529–564. doi: 10.1016/j.path.2019.01.009.

13. Cancer Genome Atlas Research Network Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474:609–615. doi: 10.1038/nature10166.
14. Mitterperger L. Genomic Characterization of High-Grade Serous Ovarian Cancer: Dissecting Its Molecular Heterogeneity as a Road Towards Effective Therapeutic Strategies. *Curr. Oncol. Rep*. 2016;18:44. doi: 10.1007/s11912-016-0526-9.
15. Anglesio M.S., Wiegand K.C., Melnyk N., Chow C., Salamanca C., Prentice L.M., Senz J., Yang W., Spillman M.A., Cochrane D.R., et al. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PLoS ONE*. 2013;8:e72162. doi: 10.1371/annotation/856f0890-9d85-4719-8e54-c27530ac94f4.
16. Teer J.K., Yoder S., Gjyshi A., Nicosia S.V., Zhang C., Monteiro A.N.A. Mutational heterogeneity in non-serous ovarian cancers. *Sci. Rep*. 2017;7:9728. doi: 10.1038/s41598-017-10432-9.
17. Slomovitz B., Gourley C., Carey M.S., Malpica A., Shih I.M., Huntsman D., Fader A.N., Grisham R.N., Schlumbrecht M., Sun C.C., et al. Low-grade serous ovarian cancer: State of the science. *Gynecol. Oncol*. 2020;156:715–725. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.12.033.
18. Murakami R., Matsumura N., Brown J.B., Higasa K., Tsutsumi T., Kamada M., Abou-Taleb H., Hosoe Y., Kitamura S., Yamaguchi K., et al. Exome Sequencing Landscape Analysis in Ovarian Clear Cell Carcinoma Shed Light on Key Chromosomal Regions and Mutation Gene Networks. *Am. J. Pathol*. 2017;187:2246–2258. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.06.012.
19. Wiegand K.C., Shah S.P., Al-Agha O.M., Zhao Y., Tse K., Zeng T., Senz J., McConechy M.K., Anglesio M.S., Kalloger S.E., et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med*. 2010;363:1532–1543. doi: 10.1056/NEJMoa1008433.
20. Ryland G.L., Hunter S.M., Doyle M.A., Caramia F., Li J., Rowley S.M., Christie M., Allan P.E., Stephens A.N., Bowtell D.D., et al. Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors. *Genome Med*. 2015;7:87. doi: 10.1186/s13073-015-0210-y.
21. Cybulska P., Paula A.D.C., Tseng J., Leitao M.M., Jr., Bashashati A., Huntsman D.G., Nazeran T.M., Aghajanian C., Abu-Rustum N.R., DeLair D.F., et al. Molecular profiling and molecular classification of endometrioid ovarian carcinomas. *Gynecol. Oncol*. 2019;154:516–523. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.07.012.
22. Marth C., Reimer D., Zeimet A.G. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: Standard treatment. *Ann. Oncol*. 2017;28:viii36–viii39. doi: 10.1093/annonc/mdx450.
23. Lazarevic T., Rilak A., Bugarcic Z.D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur. J. Med. Chem*. 2017;142:8–31. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.007.
24. Weaver B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell*. 2014;25:2677–2681. doi: 10.1091/mbc.e14-04-0916.
25. Volpe J., Filipi J.G., Cooper O.R., Penson R.T. Frontline therapy of ovarian cancer: Trials and tribulations. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 2018;30:1–6. doi: 10.1097/GCO.0000000000000434.

26. Luvero D., Plotti F., Aloisia A., Montera R., Terranova C., Carlo De Cicco N., Scaletta G., Lopez S., Miranda A., Capriglione S., et al. Ovarian cancer relapse: From the latest scientific evidence to the best practice. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2019;140:28–38. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.05.014.
27. de Bono J., Ramanathan R.K., Mina L., Chugh R., Glaspy J., Rafii S., Kaye S., Sachdev J., Heymach J., Smith D.C., et al. Phase I, Dose-Escalation, Two-Part Trial of the PARP Inhibitor Talazoparib in Patients with Advanced Germline BRCA1/2 Mutations and Selected Sporadic Cancers. *Cancer Discov.* 2017;7:620–629. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1250.
28. Ledermann J., Harter P., Gourley C., Friedlander M., Vergote I., Rustin G., Scott C.L., Meier W., Shapira-Frommer R., Safra T., et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: A preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15:852–861. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70228-1.
29. Mirza M.R., Monk B.J., Herrstedt J., Oza A.M., Mahner S., Redondo A., Fabbro M., Ledermann J.A., Lorusso D., Vergote I., et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016;375:2154–2164. doi: 10.1056/NEJMoa1611310.
30. Guan L.Y., Lu Y. New developments in molecular targeted therapy of ovarian cancer. *Discov. Med.* 2018;26:219–229.
31. Tsibulak I., Zeimet A.G., Marth C. Hopes and failures in front-line ovarian cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2019;143:14–19. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.08.002.
32. Goodspeed A., Heiser L.M., Gray J.W., Costello J.C. Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Mol. Cancer Res.* 2016;14:3–13. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0189.
33. Hynds R.E., Vladimirov E., Janes S.M. The secret lives of cancer cell lines. *Dis. Model. Mech.* 2018;11:dmm037366. doi: 10.1242/dmm.037366.
34. Maru Y., Hippo Y. Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models. *Cells.* 2019;8:505. doi: 10.3390/cells8050505.
35. Domcke S., Sinha R., Levine D.A., Sander C., Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat. Commun.* 2013;4:2126. doi: 10.1038/ncomms3126.
36. Provencher D.M., Lounis H., Champoux L., Tetrault M., Manderson E.N., Wang J.C., Eydoux P., Savoie R., Tonin P.N., Mes-Masson A.M. Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2000;36:357–361. doi: 10.1290/1071-2690(2000)036<0357:COFNEO>2.0.CO;2.
37. Ouellet V., Zietarska M., Portelance L., Lafontaine J., Madore J., Puiffe M.L., Arcand S.L., Shen Z., Hebert J., Tonin P.N., et al. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2008;8:152. doi: 10.1186/1471-2407-8-152.

38. Letourneau I.J., Quinn M.C., Wang L.L., Portelance L., Caceres K.Y., Cyr L., Delvoye N., Meunier L., de Ladurantaye M., Shen Z., et al. Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:379. doi: 10.1186/1471-2407-12-379.
39. Fleury H., Communal L., Carmona E., Portelance L., Arcand S.L., Rahimi K., Tonin P.N., Provencher D., Mes-Masson A.M. Novel high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines that reflect the molecular diversity of both the sporadic and hereditary disease. *Genes Cancer*. 2015;6:378–398. doi: 10.18632/genesandcancer.76.
40. Rustin G.J., Vergote I., Eisenhauer E., Pujade-Lauraine E., Quinn M., Thigpen T., du Bois A., Kristensen G., Jakobsen A., Sagae S., et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg) Int. J. Gynecol. Cancer. 2011;21:419–423. doi: 10.1097/IGC.0b013e3182070f17.
41. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J., Schwartz L.H., Sargent D., Ford R., Dancey J., Arbuck S., Gwyther S., Mooney M., et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) *Eur. J. Cancer*. 2009;45:228–247. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
42. Luvero D., Milani A., Ledermann J.A. Treatment options in recurrent ovarian cancer: Latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2014;6:229–239. doi: 10.1177/1758834014544121.
43. Cortez A.J., Tudrej P., Kujawa K.A., Lisowska K.M. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2018;81:17–38. doi: 10.1007/s00280-017-3501-8.
44. Previs R.A., Sood A.K., Mills G.B., Westin S.N. The rise of genomic profiling in ovarian cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2016;16:1337–1351. doi: 10.1080/14737159.2016.1259069.
45. Bouaoun L., Sonkin D., Ardin M., Hollstein M., Byrnes G., Zavadil J., Olivier M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.* 2016;37:865–876. doi: 10.1002/humu.23035.
46. Zhang Y., Cao L., Nguyen D., Lu H. TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl. Cancer Res.* 2016;5:650–663. doi: 10.21037/tcr.2016.08.40.
47. Hess V., A'Hern R., Nasiri N., King D.M., Blake P.R., Barton D.P., Shepherd J.H., Ind T., Bridges J., Harrington K., et al. Mucinous epithelial ovarian cancer: A separate entity requiring specific treatment. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:1040–1044. doi: 10.1200/JCO.2004.08.078.
48. Ho E.S., Lai C.R., Hsieh Y.T., Chen J.T., Lin A.J., Hung M.H., Liu F.S. p53 mutation is infrequent in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol. Oncol.* 2001;80:189–193. doi: 10.1006/gyno.2000.6025.
49. Zannoni G.F., Improta G., Chiarello G., Pettinato A., Petrillo M., Scollo P., Scambia G., Frassetta F. Mutational status of KRAS, NRAS, and BRAF in primary clear cell ovarian carcinoma. *Virchows Arch.* 2014;465:193–198. doi: 10.1007/s00428-014-1599-1.

50. Kuo K.T., Mao T.L., Jones S., Veras E., Ayhan A., Wang T.L., Glas R., Slamon D., Velculescu V.E., Kuman R.J., et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2009;174:1597–1601. doi: 10.2353/ajpath.2009.081000.
51. Samartzis E.P., Noske A., Dedes K.J., Fink D., Imesch P. ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:18824–18849. doi: 10.3390/ijms140918824.
52. Cuatrecasas M., Villanueva A., Matias-Guiu X., Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: A clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer.* 1997;79:1581–1586. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19970415)79:8<1581::AID-CNCR21>3.0.CO;2-T.
53. Goldman M.J., Craft B., Hastie M., Repecka K., McDade F., Kamath A., Banerjee A., Luo Y., Rogers D., Brooks A.N., et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* 2020;38:675–678. doi: 10.1038/s41587-020-0546-8.
54. Thu K.L., Papari-Zareei M., Stastny V., Song K., Peyton M., Martinez V.D., Zhang Y.A., Castro I.B., Varella-Garcia M., Liang H., et al. A comprehensively characterized cell line panel highly representative of clinical ovarian high-grade serous carcinomas. *Oncotarget.* 2017;8:50489–50499. doi: 10.18632/oncotarget.9929.
55. Kobel M., Rahimi K., Rambau P.F., Naugler C., Le Page C., Meunier L., de Ladurantaye M., Lee S., Leung S., Goode E.L., et al. An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2016;35:430–441. doi: 10.1097/PGP.0000000000000274.
56. Ramalingam P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology.* 2016;30:166–176.
57. Ricci F., Affatato R., Carrassa L., Damia G. Recent Insights into Mucinous Ovarian Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:1569. doi: 10.3390/ijms19061569.
58. Silwal-Pandit L., Langerod A., Borresen-Dale A.L. TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017;7:a026252. doi: 10.1101/cshperspect.a026252.
59. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene.* 2017;36:3943–3956. doi: 10.1038/onc.2016.502.
60. Lee M.K., Teoh W.W., Phang B.H., Tong W.M., Wang Z.Q., Sabapathy K. Cell-type, dose, and mutation-type specificity dictate mutant p53 functions in vivo. *Cancer Cell.* 2012;22:751–764. doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.022.
61. Kelemen L.E., Kobel M. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: Different organ, same dilemma. *Lancet Oncol.* 2011;12:1071–1080. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70058-4.
62. Strickland S., Wasserman J.K., Giassi A., Djordjevic B., Parra-Herran C. Immunohistochemistry in the Diagnosis of Mucinous Neoplasms Involving the Ovary: The Added Value of SATB2 and Biomarker Discovery Through Protein Expression Database Mining. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2016;35:191–208. doi: 10.1097/PGP.0000000000000238.

63. Li Z., Roth R., Rock J.B., Lehman A., Marsh W.L., Suarez A., Frankel W.L. Dual Immunostain With SATB2 and CK20 Differentiates Appendiceal Mucinous Neoplasms From Ovarian Mucinous Neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.* 2017;147:484–491. doi: 10.1093/ajcp/aqx023.
64. Albarracin C.T., Jafri J., Montag A.G., Hart J., Kuan S.F. Differential expression of MUC2 and MUC5AC mucin genes in primary ovarian and metastatic colonic carcinoma. *Hum. Pathol.* 2000;31:672–677. doi: 10.1053/hupa.2000.6799.
65. Brettfeld S.M., Ramos B.D., Berry R.S., Martin D.R., Hanson J.A. SATB2 Versus CDX2: A Battle Royale for Diagnostic Supremacy in Mucinous Tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019;143:1119–1125. doi: 10.5858/arpa.2018-0337-OA.
66. Murali R., Davidson B., Fadare O., Carlson J.A., Crum C.P., Gilks C.B., Irving J.A., Malpica A., Matias-Guiu X., McCluggage W.G., et al. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2019;38(Suppl. 1):S40–S63. doi: 10.1097/PGP.0000000000000491.
67. Bartosch C., Manuel Lopes J., Oliva E. Endometrial carcinomas: A review emphasizing overlapping and distinctive morphological and immunohistochemical features. *Adv. Anat. Pathol.* 2011;18:415–437. doi: 10.1097/PAP.0b013e318234ab18.
68. Ohta Y., Suzuki T., Shiokawa A., Mitsuya T., Ota H. Expression of CD10 and cytokeratins in ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2005;24:239–245. doi: 10.1097/01.pgp.0000158533.28866.45.
69. Cameron R.I., Ashe P., O'Rourke D.M., Foster H., McCluggage W.G. A panel of immunohistochemical stains assists in the distinction between ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2003;22:272–276. doi: 10.1097/01.PGP.0000071044.12278.43.
70. Ricketts C.J., De Cubas A.A., Fan H., Smith C.C., Lang M., Reznik E., Bowlby R., Gibb E.A., Akbani R., Beroukhim R., et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.* 2018;23:313–326. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.075.
71. Rambau P.F., Vierkant R.A., Intermaggio M.P., Kelemen L.E., Goodman M.T., Herpel E., Pharoah P.D., Kommos S., Jimenez-Linan M., Karlan B.Y., et al. Association of p16 expression with prognosis varies across ovarian carcinoma histotypes: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *J. Pathol. Clin. Res.* 2018;4:250–261. doi: 10.1002/cjp2.109.
72. Sallum L.F., Andrade L., Ramalho S., Ferracini A.C., de Andrade Natal R., Brito A.B.C., Sarian L.O., Derchain S. WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis. *Oncotarget.* 2018;9:15818–15827. doi: 10.18632/oncotarget.24530.
73. Sieh W., Kobel M., Longacre T.A., Bowtell D.D., deFazio A., Goodman M.T., Hogdall E., Deen S., Wentzensen N., Moysich K.B., et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol.* 2013;14:853–862. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70253-5.

74. Meden H., Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: A new prognostic factor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1997;71:173–179. doi: 10.1016/S0301-2115(96)02630-9.
75. Serrano-Olvera A., Duenas-Gonzalez A., Gallardo-Rincon D., Candelaria M., De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2006;32:180–190. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.01.001.
76. Zietarska M., Maugard C.M., Filali-Mouhim A., Alam-Fahmy M., Tonin P.N., Provencher D.M., Mes-Masson A.M. Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC) *Mol. Carcinog.* 2007;46:872–885. doi: 10.1002/mc.20315.
77. Puiffe M.L., Le Page C., Filali-Mouhim A., Zietarska M., Ouellet V., Tonin P.N., Chevrette M., Provencher D.M., Mes-Masson A.M. 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;9:820–829. doi: 10.1593/neo.07472.
78. Fujiwara K., Shintani D., Nishikawa T. Clear-cell carcinoma of the ovary. *Ann. Oncol.* 2016;27(Suppl. 1):i50–i52. doi: 10.1093/annonc/mdw086.
79. Lee M.X., Tan D.S. Weekly versus 3-weekly paclitaxel in combination with carboplatin in advanced ovarian cancer: Which is the optimal adjuvant chemotherapy regimen? *J. Gynecol. Oncol.* 2018;29:e96. doi: 10.3802/jgo.2018.29.e96.
80. Pectasides D., Pectasides E., Psyrris A., Economopoulos T. Treatment issues in clear cell carcinoma of the ovary: A different entity? *Oncologist.* 2006;11:1089–1094. doi: 10.1634/theoncologist.11-10-1089.
81. Kim S., Han Y., Kim S.I., Kim H.S., Kim S.J., Song Y.S. Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer. *NPJ Precis. Oncol.* 2018;2:20. doi: 10.1038/s41698-018-0063-0.
82. Gonzalez-Martin A.J., Calvo E., Bover I., Rubio M.J., Arcusa A., Casado A., Ojeda B., Balana C., Martinez E., Herrero A., et al. Randomized phase II trial of carboplatin versus paclitaxel and carboplatin in platinum-sensitive recurrent advanced ovarian carcinoma: A GEICO (Grupo Espanol de Investigacion en Cancer de Ovario) study. *Ann. Oncol.* 2005;16:749–755. doi: 10.1093/annonc/mdi147.
83. Garziera M., Roncato R., Montico M., De Mattia E., Gagno S., Poletto E., Scalone S., Canzonieri V., Giorda G., Sorio R., et al. New Challenges in Tumor Mutation Heterogeneity in Advanced Ovarian Cancer by a Targeted Next-Generation Sequencing (NGS) Approach. *Cells.* 2019;8:584. doi: 10.3390/cells8060584.
84. Wang Z.C., Birkbak N.J., Culhane A.C., Drapkin R., Fatima A., Tian R., Schwede M., Alsop K., Daniels K.E., Piao H., et al. Profiles of genomic instability in high-grade serous ovarian cancer predict treatment outcome. *Clin. Cancer Res.* 2012;18:5806–5815. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0857.
85. Yang S.Y.C., Lheureux S., Karakasis K., Burnier J.V., Bruce J.P., Clouthier D.L., Danesh A., Quevedo R., Dowar M., Hanna Y., et al. Landscape of genomic alterations in high-grade serous



ovarian cancer from exceptional long- and short-term survivors. *Genome Med.* 2018;10:81. doi: 10.1186/s13073-018-0590-x.

86. Amadori D., Bertoni L., Flamigni A., Savini S., De Giovanni C., Casanova S., De Paola F., Amadori A., Giulotto E., Zoli W. Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 1993;28:251–260. doi: 10.1007/BF00666586.

87. Gazdar A.F., Kurvari V., Virmani A., Gollahon L., Sakaguchi M., Westerfield M., Kodagoda D., Stasny V., Cunningham H.T., Wistuba I.I., et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer.* 1998;78:766–774. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19981209)78:6<766::AID-IJC15>3.0.CO;2-L.

88. McCallum H.M., Lowther G.W. Long-term culture of primary breast cancer in defined medium. *Breast Cancer Res. Treat.* 1996;39:247–259. doi: 10.1007/BF01806153.

89. Verschraegen C.F., Hu W., Du Y., Mendoza J., Early J., Deavers M., Freedman R.S., Bast R.C., Jr., Kudelka A.P., Kavanagh J.J., et al. Establishment and characterization of cancer cell cultures and xenografts derived from primary or metastatic Mullerian cancers. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:845–852.

90. Ince T.A., Sousa A.D., Jones M.A., Harrell J.C., Agoston E.S., Krohn M., Selfors L.M., Liu W., Chen K., Yong M., et al. Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nat. Commun.* 2015;6:7419. doi: 10.1038/ncomms8419.

91. Prat J., FIGO Committee on Gynecologic Oncology Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2014;124:1–5. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.10.001.

92. Taube E.T., Denkert C., Sehouli J., Kunze C.A., Dietel M., Braicu I., Letsch A., Darb-Esfahani S. Wilms tumor protein 1 (WT1)—Not only a diagnostic but also a prognostic marker in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2016;140:494–502. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.12.018.

93. DeLair D., Oliva E., Kobel M., Macias A., Gilks C.B., Soslow R.A. Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: A study of 155 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 2011;35:36–44. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181ff400e.

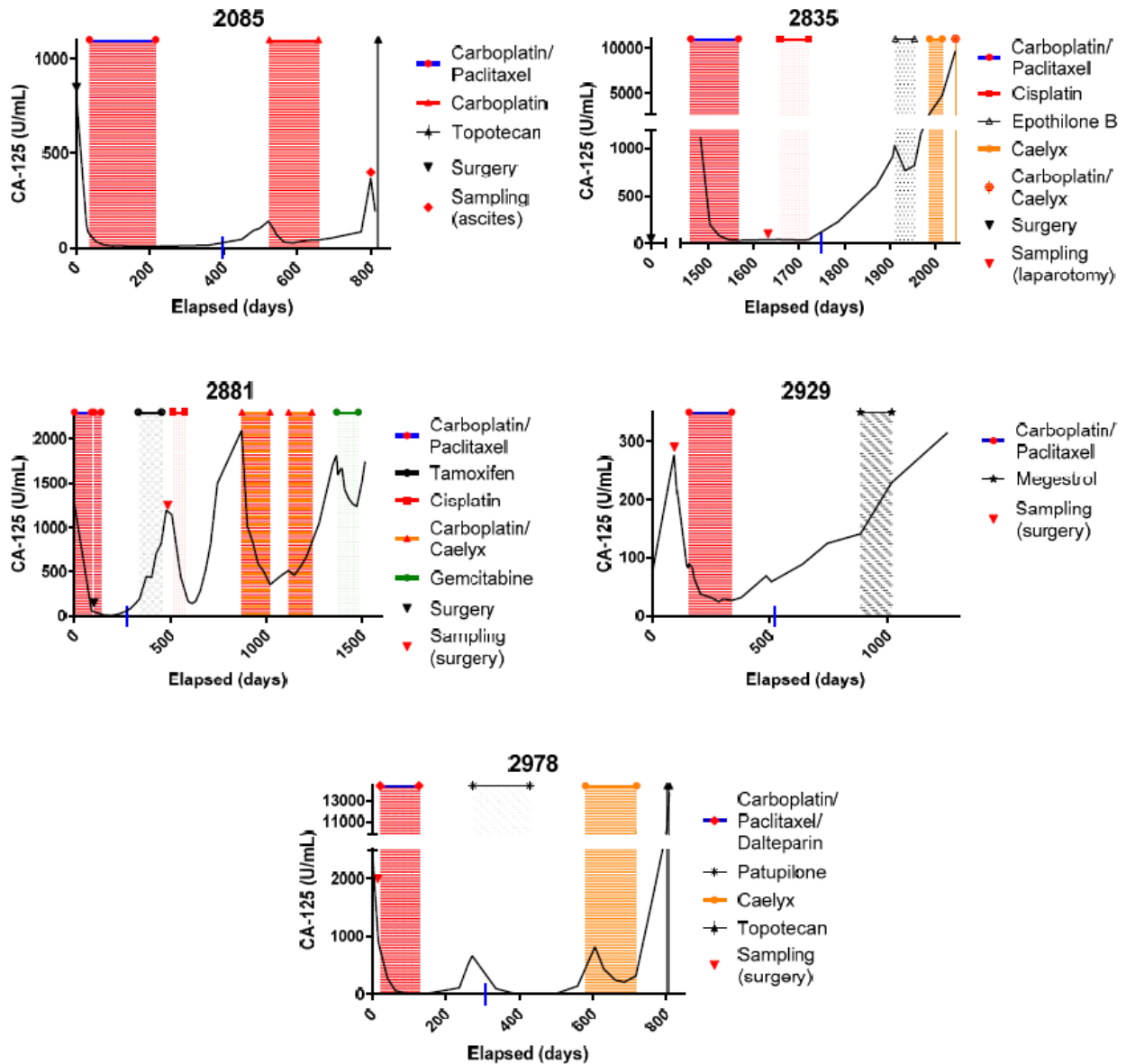
94. Sangoi A.R., Soslow R.A., Teng N.N., Longacre T.A. Ovarian clear cell carcinoma with papillary features: A potential mimic of serous tumor of low malignant potential. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008;32:269–274. doi: 10.1097/PAS.0b013e31814fa9b0.

95. Caumanns J.J., Wisman G.B.A., Berns K., van der Zee A.G.J., de Jong S. ARID1A mutant ovarian clear cell carcinoma: A clear target for synthetic lethal strategies. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2018;1870:176–184. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.07.005.

96. Kreuzinger C., von der Decken I., Wolf A., Gamperl M., Koller J., Karacs J., Pfaffinger S., Bartl T., Reinthaller A., Grimm C., et al. Patient-derived cell line models revealed therapeutic targets and molecular mechanisms underlying disease progression of high grade serous ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2019;459:1–12. doi: 10.1016/j.canlet.2019.05.032.

97. Beaufort C.M., Helmijr J.C., Piskorz A.M., Hoogstraat M., Ruigrok-Ritstier K., Besselink N., Murtaza M., van I.W.F., Heine A.A., Smid M., et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): Clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS ONE*. 2014;9:e103988. doi: 10.1371/journal.pone.0103988.
98. Afgan E., Baker D., van den Beek M., Blankenberg D., Bouvier D., Cech M., Chilton J., Clements D., Coraor N., Eberhard C., et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W3–W10. doi: 10.1093/nar/gkw343.
99. Garrison E., Marth G. Freebayes, a Haplotype-Based Variant Detector. [(accessed on 1 September 2019)]; Available online: <https://github.com/ekg/freebayes>.
100. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25:2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
101. Cingolani P., Platts A., Wang le L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012;6:80–92. doi: 10.4161/fly.19695.
102. Liu X., Wu C., Li C., Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum. Mutat*. 2016;37:235–241. doi: 10.1002/humu.22932.
103. McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*. 2016;17:122. doi: 10.1186/s13059-016-0974-4.
104. Robinson J.T., Thorvaldsdottir H., Wenger A.M., Zehir A., Mesirov J.P. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res*. 2017;77:e31–e34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0337.
105. Saeed A.I., Bhagabati N.K., Braisted J.C., Liang W., Sharov V., Howe E.A., Li J., Thiagarajan M., White J.A., Quackenbush J. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol*. 2006;411:134–193. doi: 10.1016/S0076-6879(06)11009-5.
106. Roth V. Doubling Time Calculator. [(accessed on 12 July 2020)];2006 Available online: <https://doubling-time.com/compute.php>.
107. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 2012;9:671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089.
108. MRI Redmine. Lang J.P. MRI Wound Healing Tool. 2014.
109. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc*. 2006;1:2315–2319. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

### 2.1.2.14 Supplementary Figures and Tables



**Figure S1 — Patient progression and therapy graphs.** Graphical representation of CA-125 levels over time. Treatment regimens are represented by highlighted zones overlapping CA-125 curves, and by color-coded symbols at the top of each graph as per graph legends. Arrowheads on the CA-125 curve indicate surgeries. The red symbol on each curve represents the sample that resulted in the patient's corresponding cell line, either arrowheads for surgeries, or diamond shapes for ascites collection. The vertical blue line on the x-axis indicates 6 months after the end of the patient's first treatment regimen.

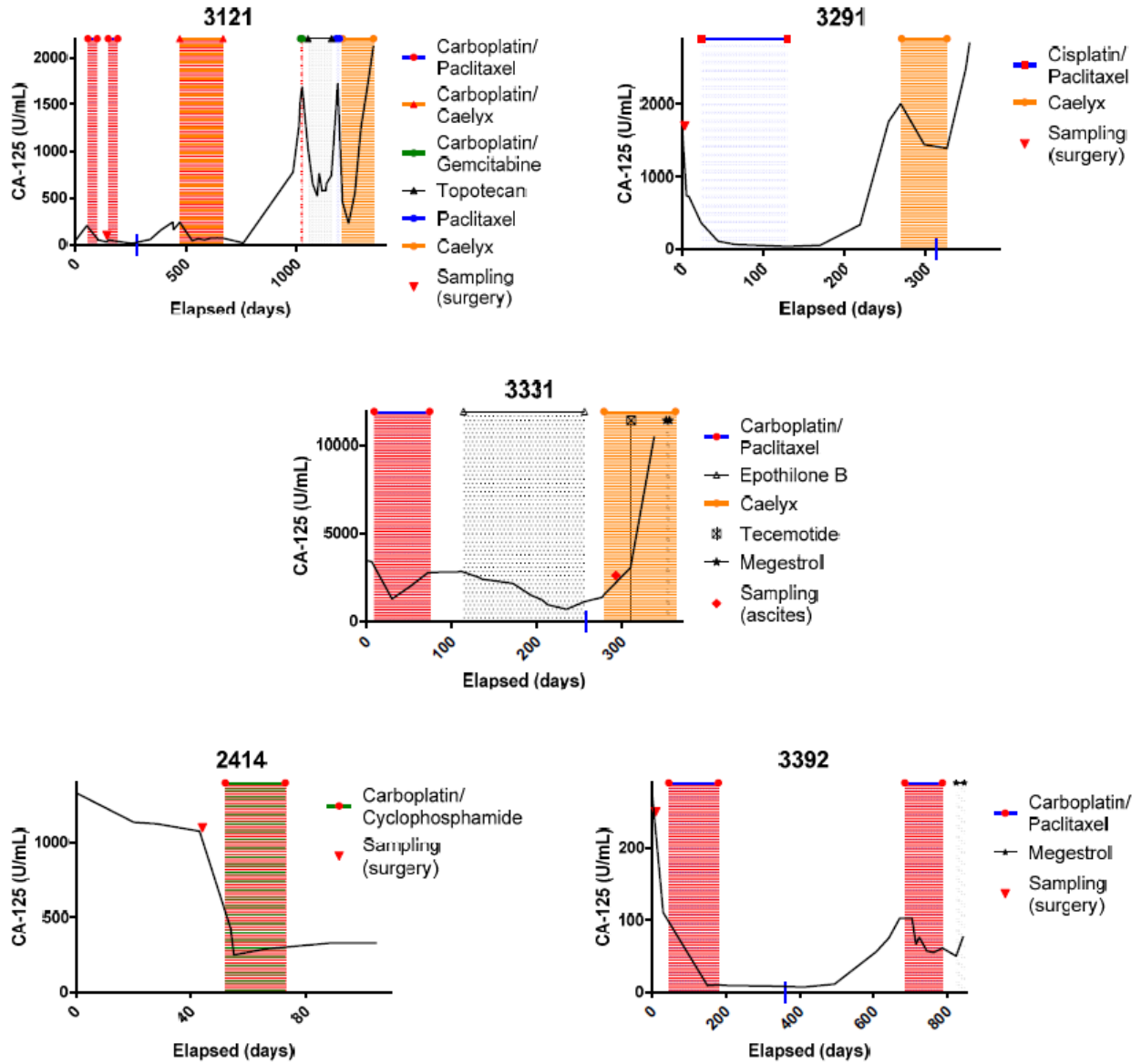
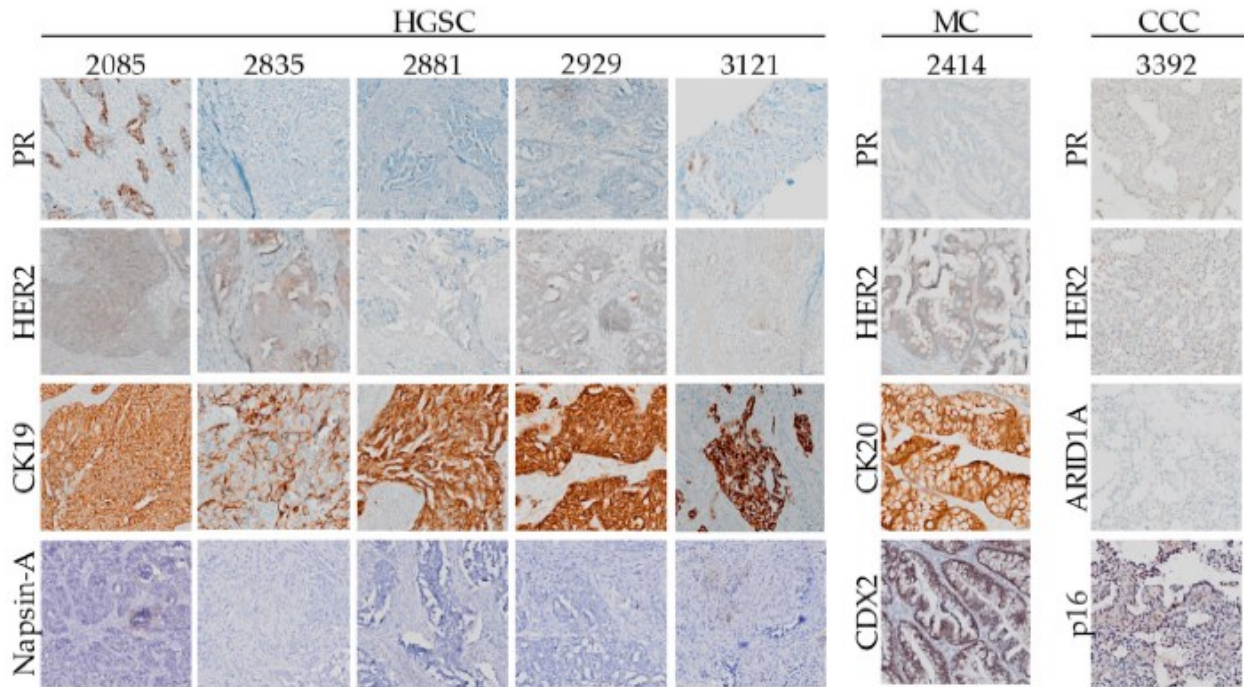
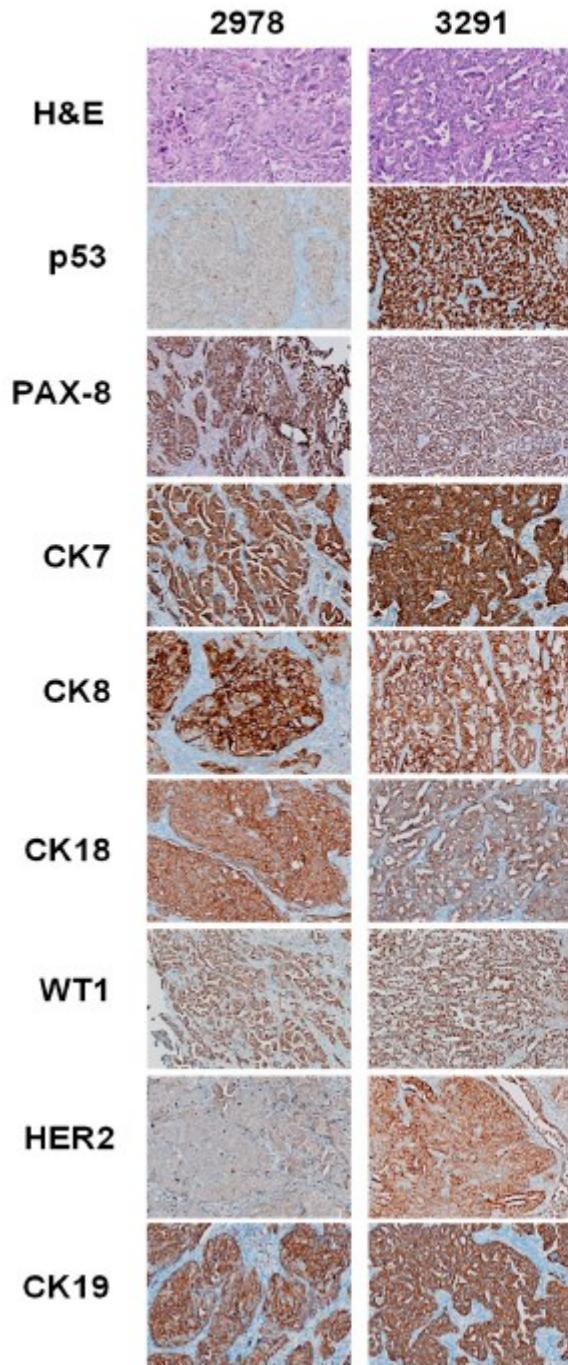


Figure S1 — continued.



**Figure S2 — Additional IHC stainings.** Shown are supplementary IHC staining of the tumor of origin from which each cell line was derived, separated by subtype. Each tumor was tested for relevant biomarkers for its respective subtype.

### A) Tumor of origin



### B) Cell Lines

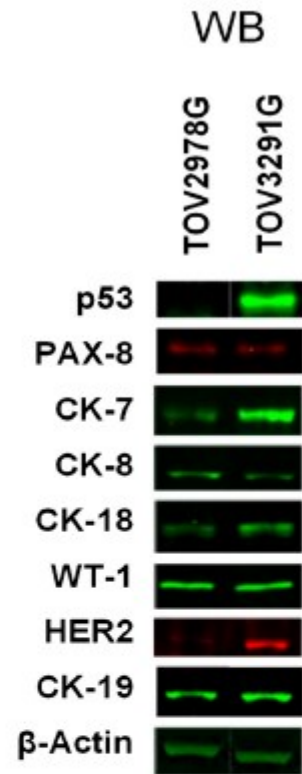
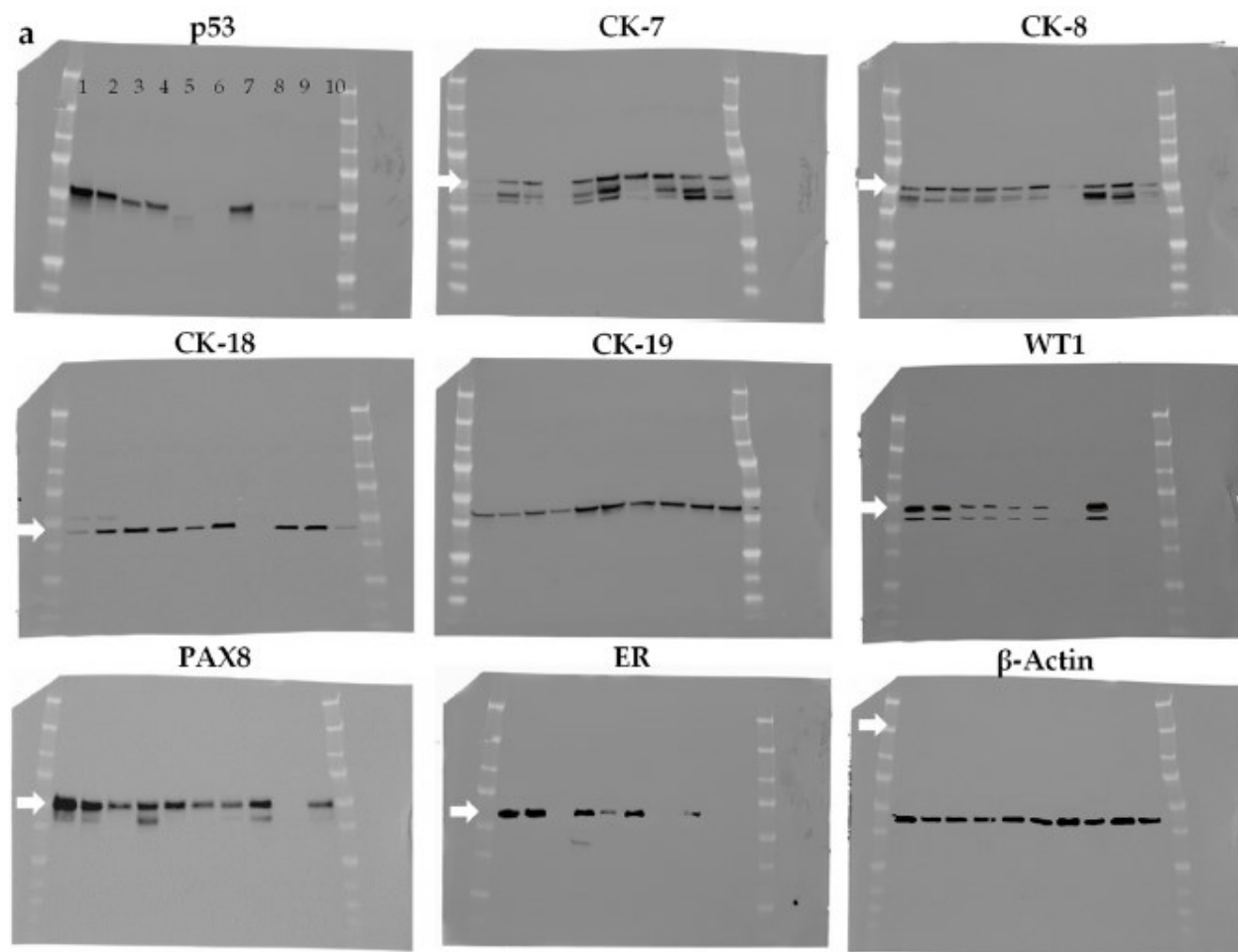


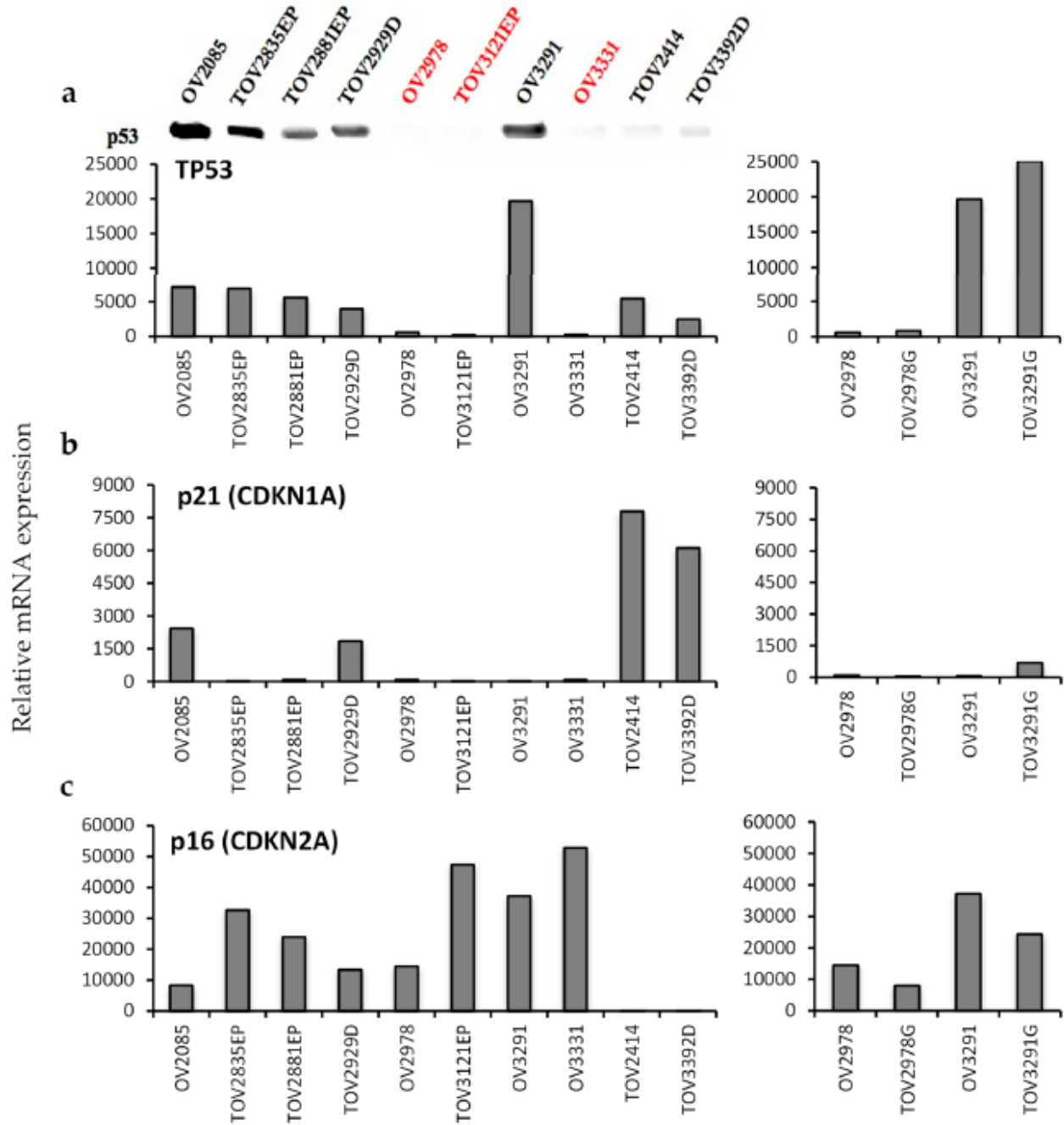
Figure S3 — H&E and IHC stainings of ovarian tumors from patients 2978 and 3291, and corresponding WB of the TOV2978 and TOV3291 cell lines. Data is reproduced, with modifications, from Figure 4 of our previous publication [1] with permission from the publisher.



**b**

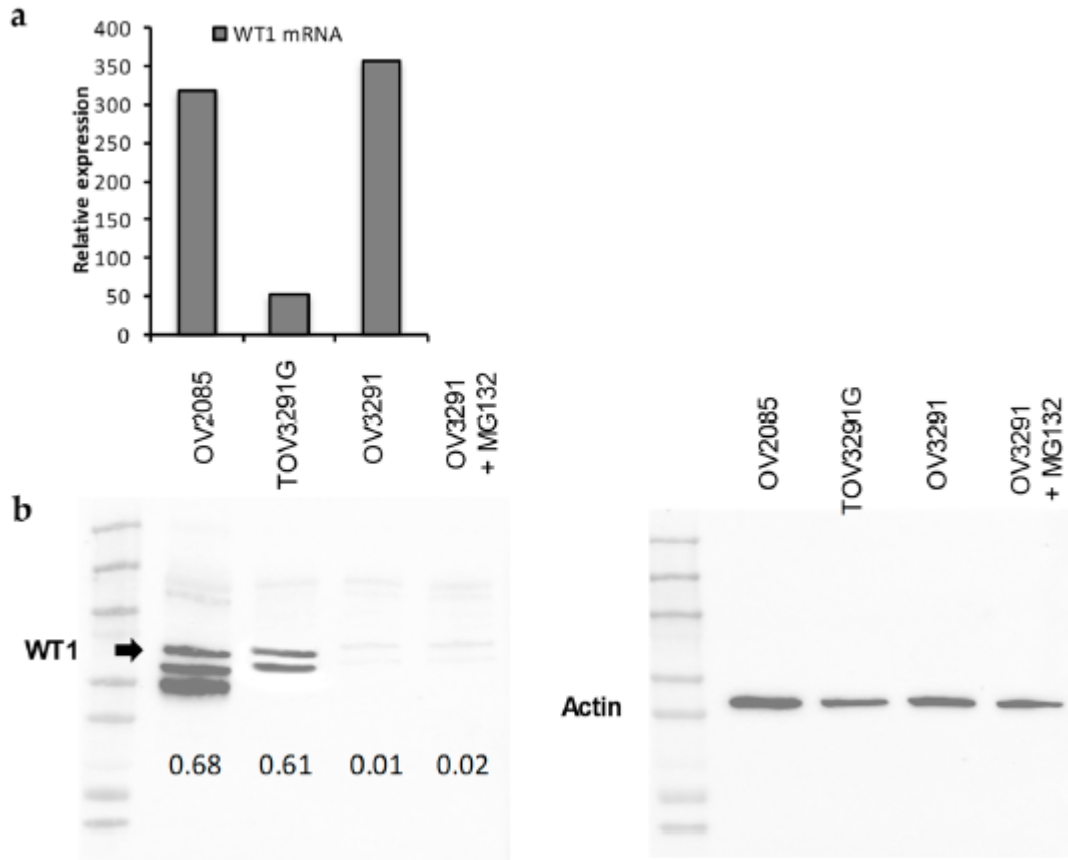
		p53	CK7	CK8	CK18	CK19	WT1	PAX8	ER
Lane 1	OV2085	1.24	0.04	0.38	0.14	0.43	1.16	1.46	1.16
Lane 2	TOV2835EP	0.69	0.26	0.56	0.49	0.32	1.00	0.91	1.15
Lane 3	TOV2881EP	0.33	0.34	0.45	0.76	0.51	0.47	0.42	0.01
Lane 4	TOV2929D	0.46	0.01	0.46	0.63	0.26	0.46	0.57	0.91
Lane 5	OV2978	0.01	0.48	0.31	0.35	1.13	0.36	0.62	0.41
Lane 6	TOV3121EP	0.01	0.91	0.55	0.88	0.99	0.46	0.45	0.88
Lane 7	OV3291	0.56	0.85	0.06	0.00	0.66	0.00	0.36	0.00
Lane 8	OV3331	0.02	0.81	0.53	0.71	0.67	1.37	0.70	0.42
Lane 9	TOV2414	0.03	0.47	0.67	0.80	0.71	0.00	0.01	0.01
Lane 10	TOV3392D	0.05	0.40	0.13	0.11	0.68	0.00	0.43	0.01

**Figure S4 — Whole Western blots of protein expression of markers in tumor cell lines.** (a) Detection of characteristic subtype-specific EOC markers (p53, CK7, CK8, CK18, CK19, WT1, PAX8 and ER) in whole cell lysates of each cell line, with  $\beta$ -Actin as a control. All blots were loaded with the same sample order, indicated by lane numbers on the top left panel. Correspondence of lane numbers and cell lines 1 is indicated in (b). (b) Intensity ratio of biomarkers for each cell line, normalized with  $\beta$ -Actin.

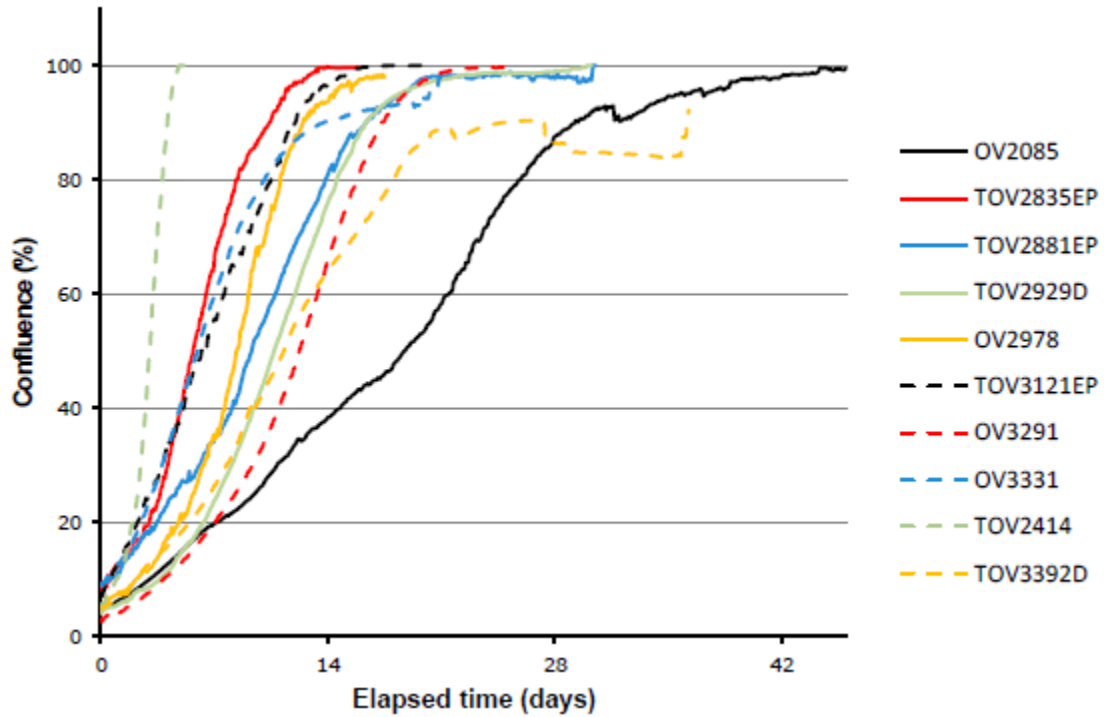


**Figure S5 — Gene expression of TP53 (a), CDKN1A (b) and CDKN2A (c).** Left panels are gene expression in the 10 novel EOC cell lines described in this work, whereas right panels are gene expression in the matched ascites and tumor cell lines derived from patients 2978 and 3291. The image on top (a) (left) shows protein bands of p53 from the WB of Figures 4 and S4, for ease of comparison. Red fonts denote cell lines with frameshift or splicing mutations.

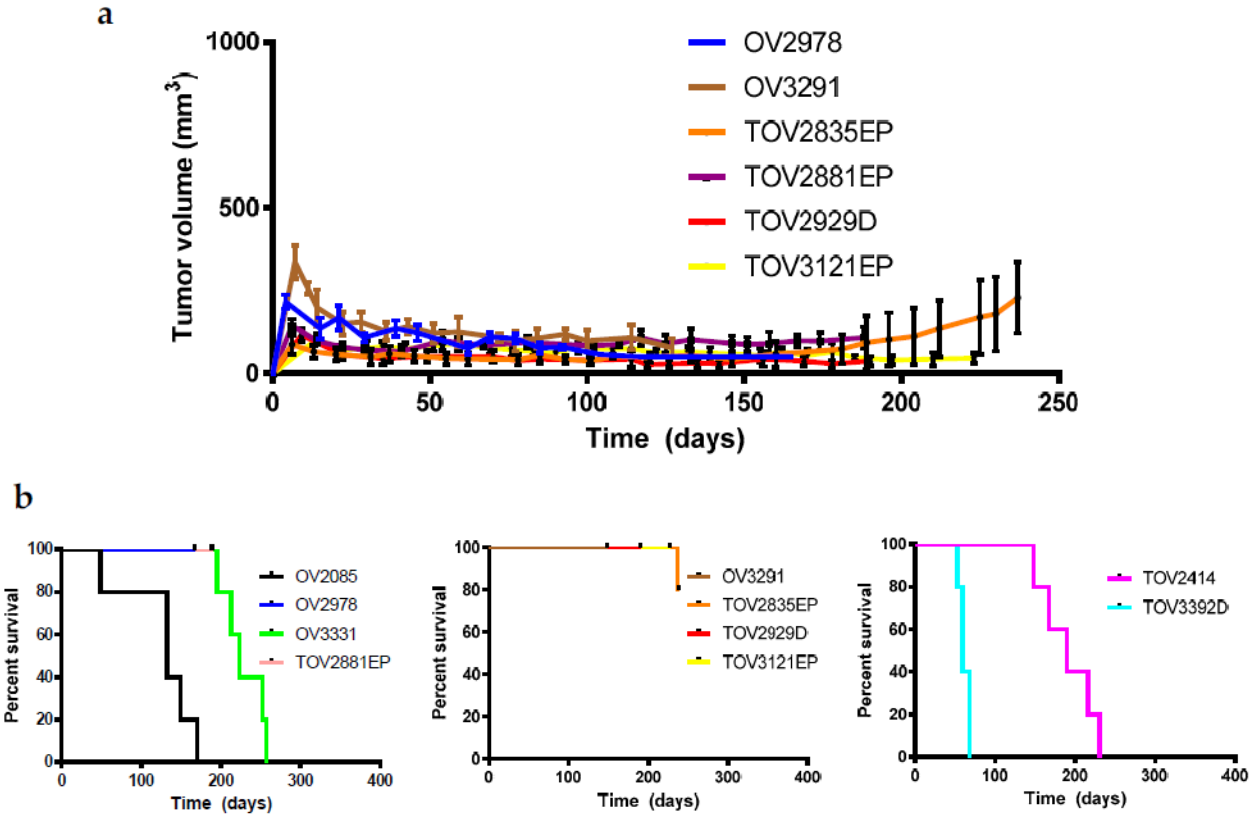




**Figure S6 — Characterization of WT1 expression in the OV3291 cell line.** (a) WT1 mRNA and (b) WT1 protein expression was analyzed in OV2085 (as a positive control), TOV3291G and OV3291 cells. Correlation between mRNA and protein expression of WT1 was observed in OV2085 and TOV3291G, but not in OV3291. WT1 protein was also analyzed in OV3291 treated for 2 h with MG132. MG132 is a proteasome inhibitor that reduces the degradation of ubiquitin-conjugated proteins. Intensity ratio of WT1 protein for each cell line was normalized with  $\beta$ -Actin.



**Figure S7 — Confluence-based proliferation curves by live cell imaging fitted into a single graph.** Cell proliferation of each cell line was determined by measuring confluence every 2 h. Initial values of confluence were between 5 and 10%, and cells were left to proliferate until confluence reached approximately 100%. Curves were fitted to a single graph for easier comparison between cell lines. Refer to Figure 4 for the SEM of each curve.



**Figure S8 — Supplementary in vivo growth characteristics.** (a) Evolution of tumor volume after SC injection in NRG mice, for cell lines that did not induce observable tumor growth ( $n = 5$ ). Points represent average  $\pm$  SEM, and curves were plotted until end-points were attained per group, when the first animal was sacrificed. (b) Kaplan-Meier survival curves of NRG mice after SC injection with each of the cell lines ( $n = 5$ ). Cell lines were separated for clarity. Censored data points represent mice that had reached end-points.

**Table S1** — Additional notes on patients from whom tumors were collected.

Patient ID	Additional Notes
2085	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Family history of breast cancer; Participated in study OV-16 Arm 2 (carboplatin/paclitaxel); Metastases at intra-abdominal lymph nodes, left iliac lymph node, liver and peritoneum; Presence of ascites
2835	Received bilateral salpingo-oophorectomy and total abdominal hysterectomy Patient tissue was negative for ovarian cancer at surgery in 2001, but peritoneal lavage was positive; Patient only received treatment in 2005; Received cisplatin intraperitoneally due to persistent miliary disease; Participated in study CEPO906A2203E1 (epothilone B); 10% clear cells at histopathology; Metastases at peritoneum, rectouterine pouch, omentum, right inguinal lymph node, right breast and liver (right lobe)
2881	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Family history of malignant neoplasm of the urinary tract; Received cisplatin intraperitoneally; Metastases at pelvic and retro-peritoneal lymph nodes, sigmoid colon, peritoneum and liver
2929	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Previous recto-sigmoid junction cancer, treated by partial colectomy; Ovarian metastases at small intestine, intra-abdominal lymph nodes and right kidney; Refused chemotherapy at third-line treatment, and was thus treated with Megestrol
2978	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Participated in study CEPO906A2303 (patupilone); Participated in study FOCUS Arm 1 (dalteparin); Metastases at peritoneum; Presence of ascites
3121	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Metastases at peritoneum, pleural space and liver
3291	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Carboplatin/taxol were administered both intraperitoneally and intravenously; Ascites and tumor were collected at the same time; Metastases at peritoneum and liver; Presence of ascites
3331	Was treated in a non-affiliated hospital and was not operated, thus no histopathology subtype could be determined; Death by malnutrition following disease progression; Participated in study CEPO906A2203E1 (epothilone B); Caelyx protocol was interrupted at patient's request; Metastases at paratracheal lymph node and peritoneum; Presence of ascites and pleural effusion
2414	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and partial omentectomy Used Premarin for menopause between 1998 and 2001 (before diagnosis); Presence of ascites
3392	Received bilateral salpingo-oophorectomy, total abdominal hysterectomy and omentectomy Treated with FEC Protocol (2004-2005), radiotherapy (2005) and Trastuzumab (2005-2006) for breast cancer; Ovarian metastases at peritoneum; Presence of ascites

**Table S2** — Additional observations in in vivo growth experiments (SC injections).

Cell line	Mouse	Observations
	1117	-
	1118	-
OV2085	1125	thymic lymphoma; prostration; respiratory distress (exclusion due to early onset of thymic lymphoma)
	1127	-
	1128	-
	1208	-
	1209	respiratory distress; 25% body weight loss
TOV2835EP	1210	-
	1211	-
	1212	-
	1372	-
	1373	-
TOV2881EP	1378	-
	1380	-
	1381	-
	1480	-
	1481	-
TOV2929D	1482	-
	1483	-
	1484	-
	1335	-
	1336	-
OV2978	1357	-
	1351	-
	1352	-
	1172	lots of abdominal fat
	1173	air in the intestines and fallopian tubes
TOV3121EP	1174	-
	1175	air and fluid in fallopian tubes; pale lungs
	1176	-
	1564	-
	1565	-
OV3291	1566	-
	1572	-
	1573	-
	1087	respiratory distress; weight loss; dehydration; white mucosae
	1088	-
OV3331	1089	-
	1090	respiratory distress; thymic lymphoma; enlarged spleen; filamentous mass below the heart
	1096	-
	1055	tumor ulceration
	1065	-
TOV2414	1066	tumor ulceration; large intestinal tumor; small metastases; swollen abdomen and stomach
	1067	tumor ulceration
	1068	tumor ulceration
	1591	20% body weight loss
	1592	20% body weight loss
	1581	20% body weight loss
	1582	25% body weight loss; dark pink lungs
TOV3392D	1593	20% body weight loss
	2444	20% body weight loss
	2445	20% body weight loss; pale organs; very swollen stomach
	2446	20% body weight loss; large amount of feces in intestines
	2447	20% body weight loss; pale organs
	2448	20% body weight loss; swollen stomach

**Table S3** — Additional observations in in vivo growth experiments (IP injections).

Cell line	Mouse	Observations
OV2085	1129	red ascites; metastases in fat near ovaries, bladder and above liver
	1137	2.5 mL red ascites; large ovarian tumors (R + L); metastases at mesentery and between liver and stomach; enlarged spleen with white spots; pale lungs
	1138	7 mL red ascites; large metastases at bladder, liver, spleen; small metastases at stomach and intestine; swollen and red fluid-filled ovary (L); enlarged spleen; pale lungs and liver
	1139	5.5 mL red ascites; medium metastases at bladder, liver, stomach, spleen, intestines; small metastases near spleen, liver, stomach; tumors at ovaries; enlarged spleen
	1147	3 mL red ascites; inguinal and ovarian tumors; medium metastases at bladder and below stomach; small metastases near spleen, liver, stomach; enlarged spleen
TOV2835EP	1218	weight loss; enlarged belly and spleen; prostration; hard yellow mesenteric tumor; pale lungs and liver
	1219	dyspnea; body weight loss; dizzy; air in stomach, intestines, caecum; pale lungs and liver
	1220	swollen and liquid-filled red fallopian tubes
	1221	swollen and liquid-filled red fallopian tubes
	1222	small white spot on spleen
TOV2881EP	1392	2 mL pinkish brown ascites; metastases at pancreas, liver, stomach, diaphragm; small nodules on kidneys; very pale liver
	1393	2 mL red ascites; small metastases at mesentery and fallopian tubes; enlarged spleen; pale lungs
	1394	5 mL red ascites; small metastases at liver, stomach; enlarged spleen; pale liver and lungs
	1395	5 mL red ascites; small metastases at liver, stomach; enlarged spleen; pale liver and lungs
	1396	enlarged intestine
TOV2929D	1499	2 mL ascites; enlarged intestine and spleen; medium metastasis between liver and stomach; small metastases at mesentery and stomach; swollen fallopian tubes
	1500	7 mL dark red ascites; small metastases at stomach, spleen, liver; enlarged spleen; light brown liver
	1501	5 mL dark red ascites; small metastases at bladder, liver, spleen and stomach
	1502	6.5 mL dark red ascites; medium metastases at stomach; small metastases at stomach and pancreas; enlarged spleen; pale liver
	1503	body weight loss; prostration; air in intestine and fallopian tubes; fluid in ovary (L)
OV2978	1341	small metastases below stomach/liver; fat at ovaries and fallopian tubes; small pockets in fallopian tubes
	1342	enlarged red fallopian tubes and intestine
	1343	lots of fat at ovaries and fallopian tubes; enlarged red fallopian tubes; speckled liver
	1344	lots of fat at ovaries and fallopian tubes; enlarged red fallopian tubes and intestine
	1345	dyspnea; clear ascites near organs; pale and speckled lungs; small metastasis near stomach
TOV3121EP	1182	swollen abdomen; enlarged and fluid-filled gallbladder
	1183	lots of abdominal fat
	1184	lots of abdominal fat
	1185	vivid red and partly clotted ascites; lots of abdominal fat; pale kidneys and liver
	1186	large tumor at ovary (R)
OV3291	1576	internal bleeding; small metastases at mesentery near stomach
	1577	small metastasis at pancreas
	1578	-
	1579	-
	1580	-
OV3331	1097	8.5 mL red ascites; stomach and liver metastases; large metastatic tumor at ovary and fallopian tube (L)
	1098	8.5 mL red ascites; metastases at stomach, liver, ovaries, fallopian tubes; white lungs
	1106	-
	1107	6 mL red ascites; small metastases at ovaries, bladder, fallopian tubes, mesentery; swollen fallopian tubes and spleen; pale lungs
	1108	4 mL red ascites; small metastases at bladder, fallopian tubes, mesentery; pale and speckled lungs
TOV2414	1076	important body weight loss; prostration; small inguinal tumor; pale lungs; small stomach
	1078	large SC/IP tumor; 4 small mesenteric metastases near pancreas
	1081	large tumor at injection site; tumor ulceration; SC/IP tumor
	1082	medium tumor at injection site; tumor ulceration; SC/IP tumor
	1083	large SC/IP tumor; tumor ulceration; small mesenteric metastases
TOV3392D	1575	tumor at injection site and ovary (L); inguinal metastasis; small metastases at stomach and liver
	1587	enlarged fallopian tubes
	1588	SC/IP tumor at injection site; small stomach and spleen; reddish intestines
	1589	large and medium inguinal metastases; SC/IP tumor at injection site
	1590	2 inguinal metastases; small inguinal metastases

**Table S4** — IHC conditions for staining whole ovarian tissue.

Antibody	Antigen Retrieval	Antigen retrieval Incubation (min)	Antibody Incubation (min)	Ventana Kit	Ventana Type
ARID1A	cc1	60	60	iVIEW DAB Detection Kit	BenchMark XT
CDX2	cc1	52	24	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA
CK18	cc1	30	40	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
CK19	cc1	60	40	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
CK20	cc1	60	44	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
CK7	cc1	60	44	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
CK8	cc1	60	60	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
ER	cc1	60	60	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
HER2	cc1	60	60	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
MUC2	cc1	36	32	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA
MUC5A	cc1	36	32	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA
Napsin A	cc1	32	32	OptiView DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA
p53	cc2	60	32	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
PAX8	cc1	36	32	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
PR	cc1	60	60	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT
SATB2	cc1	64	32	UltraView Universal DAB Detection Kit with amplification	BenchMark ULTRA
WT1	cc1	60	44	UltraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark XT

cc1/cc2: cell conditioning #1/#2.

**Table S5** — IHC conditions for staining whole ovarian tissue.

Antibody	Clone	Dilution (IHC)	Dilution (WB)	Catalog Number	Supplier	
ARID1A	polyclonal	1/50	-	HPA005456	MilliporeSigma	Burlington, MA, USA
CDX2	EPR2764Y	Pre-diluted	-	235R-16	Cell Marque	Rocklin, CA, USA
CK18	CD-10	1/1000	1/2000	sc-6259	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, TX, USA
CK19	Ks19.1	1/2000	1/500	MS-198-P	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
CK20	SPM140	1/200	-	sc-56522	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, TX, USA
CK7	OV-TL 12/30	1/200	1/1000	MS-1352-P	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
CK8	TS1	1/1000	1/500	MS-997-P	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
ER	SP1	1/100	1/100	ab16660	Abcam	Cambridge, UK
HER2	3B5	1/1000	1/1000	OP15L	MilliporeSigma	Burlington, MA, USA
MUC2	MRQ-18	1/100	-	291M-16	Cell Marque	Rocklin, CA, USA
MUC5A	MRQ-19	1/250	-	292M-96	Cell Marque	Rocklin, CA, USA
Napsin A	IP64	1/100	-	NAPSINA-L-CE	Leica Biosystems	Wetzlar, Germany
p53	DO-1	1/1000	1/200	sc-126	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, TX, USA
PAX8	polyclonal	1/300	1/5000	10336-1-AP	Proteintech	Rosemont, IL, USA
PR	Y85	Pre-diluted	-	323R-17	Cell Marque	Rocklin, CA, USA
SATB2	EPNCIR130A	1/100	-	ab92446	Abcam	Cambridge, UK
WT1	6F-H2	Pre-diluted	1/250	05-753	MilliporeSigma	Burlington, MA, USA
$\beta$ -Actin	AC-15		1/1000	ab6276	Abcam	Cambridge, UK
Gt x Ms	polyclonal (2°)		1/5000	AP124P	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Gt x Rb	polyclonal (2°)		1/10000	AP156P	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

2°: secondary.

**Table S6** — IncuCyte ZOOM 2016B cell line-specific confluence mask parameters.

Parameters	HGS								M	CC
	OV2085	TOV2835EP	TOV2881EP	TOV2929D	OV2978	TOV3121EP	OV3291	OV3331	TOV2414	TOV3392D
Segmentation augmentation	0.5	0.5	2	1.4	1	2	1.8	1	0.7	0.1
Hole fill ( $\mu\text{m}^2$ )	0	$5 \times 10^3$	$8 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$2 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$2 \times 10^3$
Cleanup										
Adjust size (pixels)	-2	8	0	-3	0	4	5	1	5	-2
Area min. ( $\mu\text{m}^2$ )	100	1500	600	300	200	1000	850	500	1000	100
Area max. ( $\mu\text{m}^2$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Filters										
Eccentricity min. ( $\mu\text{m}^2$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eccentricity max. ( $\mu\text{m}^2$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 2.1.2.15 References (Supplementary)

1. Fleury, H., et al., Novel high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines that reflect the molecular diversity of both the sporadic and hereditary disease. *Genes Cancer*, 2015, 6, 378-398.



## **2.2 Article 2 — Inhibition of NAD salvage counters acquired PARP inhibitor resistance in high-grade serous epithelial ovarian cancer**

### **2.2.1 Article 2 — Résumé en français**

**Titre en français :** L'inhibition de la récupération du NAD contre la résistance acquise aux inhibiteurs de PARP dans le cancer épithélial de l'ovaire de type séreux de haut grade

Le cancer épithélial de l'ovaire est la malignité gynécologique la plus létale, surtout dû à son haut taux de résistance au traitement au moment de la rechute, malgré une bonne réponse initiale à la chimiothérapie. Les inhibiteurs de PARP (PARPi) comme olaparib ont des résultats encourageants pour le traitement de patientes atteintes du cancer de l'ovaire, mais la thérapie d'entretien à long terme mène généralement à l'acquisition de résistance aux PARPi. Dans la présente étude, nous créons des modèles cellulaires de résistance acquise à l'aide d'une procédure de sélection *in vitro*; en utilisant ces nouveaux modèles, ainsi que des lignées cellulaires établies résistantes aux PARPi, nous montrons que l'utilisation de daporinad, une petite molécule inhibitrice du nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT), sensibilise de façon efficace les modèles à résistance acquise et intrinsèque aux PARPi. Nous démontrons la spécificité de cet effet synergique en ajoutant du nicotinamide mononucléotide (NMN), le métabolite résultant de l'activité catalytique du NAMPT, ce qui abroge complètement l'effet d'inhibition de croissance induit par la thérapie. Davantage de recherches ont démontré que le traitement avec ces drogues déplete le NAD intracellulaire, induit des cassures d'ADN double-brin, et induit l'apoptose via le clivage de la caspase-3. Nous confirmons l'efficacité de cette synergie dans un modèle de xénogreffe en souris, où le traitement simultané des souris avec olaparib et daporinad ralentit significativement la croissance tumorale. Pris ensemble, nos résultats suggèrent que l'inhibition du NAMPT pourrait grandement potentialiser l'effet d'olaparib dans un contexte de résistance au traitement, et offre une nouvelle option prometteuse pour la gestion des patientes du cancer de l'ovaire ayant subi une rechute.

## 2.2.2 Article 2 — Manuscrit en préparation

### **Inhibition of NAD Salvage Counters Acquired PARP Inhibitor Resistance in High-Grade Serous Epithelial Ovarian Cancer**

Skye A. Sauriol,<sup>1,2</sup> Euridice Carmona,<sup>1,2</sup> Kim Leclerc-Desaulniers,<sup>1,2</sup> Diane M. Provencher,<sup>1,2,3</sup> and Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada. <sup>2</sup> Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada. <sup>3</sup> Division of Gynecologic Oncology, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada. <sup>4</sup> Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

\*Correspondence: [anne-marie.mes-masson@umontreal.ca](mailto:anne-marie.mes-masson@umontreal.ca); Tel.: +514-890-8000 (ext. 25496)

#### **2.2.2.1 Abstract**

Epithelial ovarian cancer is the most lethal gynecological malignancy, owing notably to its high rate of therapy-resistant recurrence in spite of good initial response to chemotherapy. Although PARP inhibitors (PARPi) such as olaparib have shown promise for the treatment of ovarian cancer patients, extended maintenance therapy usually leads to acquired PARPi resistance. In the present study, we created cell-based models of acquired resistance through an in vitro selection procedure; using these new models, as well as established PARPi-resistant cell lines, we showed that the use of daporinad, a small molecule inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), effectively sensitized acquired and intrinsic resistance cellular models to PARPis. We demonstrated the specificity of this synergistic effect by adding nicotinamide mononucleotide (NMN), the resulting metabolite of NAMPT's catalytic activity, which abrogated the therapy-induced cell growth inhibition. Further investigation revealed that treatment with these drugs depleted intracellular NAD, induced double-strand DNA breaks, and promoted apoptosis through cleavage of caspase-3. We confirmed the efficacy of this synergy in a mouse xenograft model, where concomitant treatment of mice with olaparib and daporinad

significantly slowed tumor growth. Taken together, our results suggest that NAMPT inhibition could greatly potentiate the effect of olaparib in the context of resistance to treatment and offer a promising new option for the management of relapsed ovarian cancer patients.

#### **2.2.2.2 Introduction**

Epithelial ovarian cancer, especially the high-grade serous carcinoma (HGSC) subtype, is the most fatal of all gynecological malignancies (1, 2), owing to its late detection, heterogeneous nature and resistance to treatment, particularly at recurrence (3-5). Patients are usually treated with a combination of standard debulking surgery and chemotherapy (5, 6), and while initial response rates are often encouraging, relapse is observed in most cases (7, 8). Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) were first approved for ovarian cancer treatment in 2014 (9), and are now part of the standard of care for maintenance therapy in the first-line and recurrence settings for this disease (5, 6, 8, 10). While olaparib was first approved in the context of germline BRCA mutations for patients with recurrence, the emergence of new data led to PARPis being used earlier in patient care and, in the case of niraparib, independently from BRCA status (5, 6, 8). However, in spite their initial efficacy, acquisition of resistance to PARP inhibitors (PARPi) is observed in most cases, leading to subsequent relapse (11, 12).

PARP inhibitors mainly target PARP1, a highly expressed and ubiquitous protein responsible for synthesizing chains of poly(ADP-ribose) (PAR) directly onto its targets, including itself (13). The PARP1 enzyme cleaves molecules of nicotinamide dinucleotide (NAD) into nicotinamide (NAM) and ADP-ribose (ADPr), attaching the ADPr moieties onto its target (13). PARP1 and its PARylation play a role in multiple essential pathways including DNA damage response and repair, chromatin remodeling and cell death (13). PAR chains are subsequently broken down by poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) (14), and NAM is recycled into NAD by the NAD salvage pathway via nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) (15). PARPis, such as olaparib, niraparib, rucaparib and talazoparib, mimic NAD and compete for the catalytic domain of PARP1, preventing synthesis of PAR chains and trapping it onto DNA (16, 17).

Multiple mechanisms have been proposed to explain PARPi resistance in HGSC (11, 12, 18-20). As PARPis are widely regarded to be most effective in homologous recombination (HR)-deficient tumors due to synthetic lethality, restoration of HR functionality is also the most commonly observed mechanisms of resistance in the clinic, usually through reversion or compensation via secondary mutations (11). It has been reported that increased expression of efflux pumps such as ABCB1 reduces cellular levels of PARPi, limiting its effectiveness (18, 21). Mutations and loss of PARP1 have also been shown to induce PARPi resistance (22); notably, mutations specifically in PARP1's zinc finger domains cause resistance, as PARPi efficacy requires PARP1 to bind DNA (11). Changes in dePARylation have been studied in the context of resistance to PARPis. Loss of PARG has been shown to counteract PARPi efficacy by allowing PAR accumulation and maintaining the function of PARP1 (23). Paradoxically, however, molecular inhibition of PARG has also been demonstrated to effectively kill PARPi-resistant cells (14).

Taken together, these results fail to draw a full portrait of PARPi resistance. This phenomenon remains incompletely understood and requires further investigation. Here, we report that inhibition of the NAD salvage pathway abrogates acquired PARP inhibitor resistance in a variety of models that are otherwise highly diverse. The small molecule daporinad (FK866, APO866), a specific inhibitor of the rate-limiting enzyme of the NAD salvage pathway, is strongly synergistic with olaparib in all models tested, greatly potentiating the DNA damage- and cell death-inducing effects of olaparib. This molecule has already undergone clinical trials for leukemia, lymphoma and melanoma and, based on the pre-clinical results presented here, could be reconsidered for HGSC to effectively treat PARPi-resistant patients in a clinical setting.

### **2.2.2.3 Results**

*Cell line models were derived to study acquired PARPi resistance.*

In a previous study, our laboratory has published the olaparib sensitivity of a panel of HGSC cell lines, ranging from very sensitive to strongly resistant (24). To study acquired PARPi resistance, we selected six olaparib-sensitive cell lines (OV1946, TOV3041G, OV2978, TOV2978G, TOV1946 and OV2295) (24, 25) and generated resistant cell line models by exposing them to olaparib at increasing concentrations over an extended period of time (Figure 1, Table S1). The

developed cell lines gained the “olaparib-resistant” (or) suffix to denote their resistant phenotype and cell line of origin (for example: OV1946or). These cell lines showed high resistance to olaparib, with a half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) in the range of 1.1 to 6.12  $\mu$ M, 61- to 1154-fold higher than that of their parental counterpart (Figure 1b, Table S1). The  $IC_{50}$  values of our newly derived models were comparable to those of cell lines with intrinsic resistance or intermediate sensitivity to olaparib (24). We then derived resistance to two other PARPis, niraparib and talazoparib, in our panel of sensitive cell lines using the same method and obtained resistant cell lines with a fold change ranging from 54.5 to 2288 (Figures 1b-c, S1a-d, Table S1). Interestingly, all tested cell lines showed cross-resistance to the different PARPis, in that our models are resistant to every PARPi tested, regardless of the inhibitor used to derive resistance (Figures 1b-c, S1a-d, Table S1). The resistant phenotype was stable, as evaluated by consistent  $IC_{50}$ s after a freeze-thaw cycle (26) and after at least five passages in absence of any PARPi. Cells were thus cultured in inhibitor-free medium after resistance was derived.

*The molecular inhibition of NAMPT sensitizes resistant cells to PARPi.*

NAD is essential for PARP1 activity; it is used as a substrate to synthesize poly (ADP-ribose) chains, where PARP1 catalyzes the cleavage of this NAD into ADP-ribose and nicotinamide (27). Nicotinamide is then recycled and used to synthesize NAD anew via the NAD salvage pathway, the main synthesis pathway for this coenzyme in cancer cells (15). The rate-limiting enzyme of this pathway, NAMPT, has been targeted in pre-clinical studies and in clinical trials for treatment of multiple cancers, with mixed results (28, 29). Recent studies using NAMPT inhibitors as monotherapy in ovarian cancer cell lines have shown promising results to overcome resistance in certain contexts (30, 31). We evaluated the inhibition of NAMPT using the small molecule daporinad (32) in four of our acquired resistance models (those with higher  $IC_{50}$  values to olaparib) and observed little to no effect. However, concurrently treating our cells with olaparib and daporinad significantly inhibited cell growth (Figures 2a-f, S2a-f,i) in all our acquired resistance cell lines, and the two drugs showed high synergistic potential at the tested concentrations (Figure S3a). We also show that in intrinsically PARPi-resistant HGSC cell lines, OV4485 (BRCA1-mutated) and OV1369(R2) (Figure S1e-g), the combination of olaparib and daporinad is effective for inhibiting growth (Figures 2g-h, S2g-i), suggesting that inhibiting the

NAD salvage pathway can prove effective to circumvent both acquired and intrinsic resistance. We further show that combining daporinad with niraparib or talazoparib also inhibits the growth of OV1946or (Figure S4), suggesting that daporinad could more broadly sensitize resistant cells to PARPi. Moreover, we show that combining olaparib with two other NAMPT inhibitors, OT-82 and KPT-9274, effectively reproduces the results obtained with daporinad, confirming that the observed synergy is a class effect, rather than a drug-specific effect (Figure S5a-d, g). Drug concentrations used were selected based on the strongest synergy combination observed for each cell line (see Methods for details) and are in the range used in previously published reports (24, 30-34). To confirm the specificity of the observed synergistic effects, we treated our cells with a combination of NAMPT inhibitors and olaparib, but with added nicotinamide mononucleotide (NMN), the resulting metabolite of the reaction mediated by NAMPT, in the cell culture medium. We show that adding NMN abrogates the effect of the combination on cell growth in both acquired and intrinsic resistance models (Figures 2, S3b, S5a-b, S5e-g, S6), confirming that the synergy of this drug class combination is specifically due to NAMPT inhibition.

*The combination of olaparib and daporinad induces DNA damage and cell death.*

It has been shown that inhibition of PARP1 with olaparib decreases NAD consumption (35). This can be observed in our models, reflected by the observed increase in relative NAD levels in our olaparib-treated condition (Figure 3a). On the other hand, the inhibition of NAMPT prevents cancer cells from regenerating NAD from nicotinamide, thus drastically reducing the intracellular concentration of this coenzyme (31). We confirmed that this is the case by quantifying NAD in OV1946or cells after 24 hours of treatment and show that the relative NAD levels in daporinad-treated cells are significantly lower than in untreated controls. The combination of olaparib and daporinad resulted in similar levels of intracellular NAD as treatment with daporinad alone (Figure 3a). After five days of treatment, we show that olaparib alone induces cleavage of caspase-3 in OV1946or in spite of PARPi resistance, but that this effect is significantly increased with the addition of daporinad (Figure 3b-c), indicating that this combination strongly induces apoptosis in resistant cells. As previously shown (36, 37), this increased level of apoptosis is likely to be at least partly due to an increase in DNA damage after treatment, supported here by the quantification of  $\gamma$ H2A.X foci (Figure 3d-e). Taken together, these data suggest that daporinad

sensitizes cells to the DNA damaging effect of PARP inhibitors by depleting intracellular NAD, thus leading to increased cell death.

*Combining olaparib and daporinad slows tumor growth in vivo.*

To better evaluate the relevance of this combination for clinical treatment of resistant ovarian cancer, we used the OV1946 model for its capacity to form in vivo xenograft tumors (38). We injected OV1946or cells in immunodeficient mice to form resistant subcutaneous xenograft tumors. When the tumors reached an average volume of approximately 200 mm<sup>3</sup>, the mice were treated with either olaparib, daporinad, the combination, or vehicle solution. We show that both drugs individually had no effect when compared to vehicle, but that the combination significantly slowed tumor growth (Figure 4a-b). Furthermore, we show that the combination formulation is not toxic at the tested concentrations, as determined by mouse body weight variations (Figure 4c-d) and general monitoring of mouse health. Interestingly, the daporinad and combination conditions led to a significant increase in body weight after 15 days, compared to the olaparib and vehicle conditions. These data suggest that, in a clinical setting, combining olaparib and daporinad could prove effective at circumventing acquired olaparib resistance in HGSC with minimal toxicity.

#### **2.2.2.4 Discussion**

Our data show that HGSC with acquired olaparib resistance can be rendered vulnerable to treatment by adding daporinad to the treatment regimen (Figure 2a-f). These results are especially relevant in a clinical setting where olaparib is used for long-term maintenance treatment, which often leads to the development of acquired PARPi resistance and subsequent relapse (39). Furthermore, we show that the combination proves effective in two intrinsically resistant cell lines, OV4485 and OV1369(R2), suggesting that the benefit of this treatment regimen might also be applicable in the context of first-line olaparib therapy, where certain patients initially fail to respond to treatment. This is especially clinically relevant in the case of OV4485, a BRCA1-mutated cell line that displays resistance to PARP inhibition (24, 40), considering that, as previously mentioned, a significant portion of patients harboring a germline BRCA mutation do not respond to olaparib (41). The results presented here suggest that all

ovarian cancer patients, both BRCA-mutated and BRCA-wild type, could be treated with this combination, and would forgo the need for mutational status testing, greatly simplifying treatment with olaparib.

Our results for olaparib and daporinad seem to be more broadly applicable to PARP inhibitors and NAMPT inhibitors in general (Figures S4, S5). For PARP inhibitors, this includes niraparib and the promising inhibitor talazoparib, recently approved for use in breast cancer (42) and currently undergoing clinical trials for ovarian cancer (43); for NAMPT inhibitors, this includes OT-82 and KPT-9274 (44), both currently undergoing clinical trials, and especially interesting considering their oral route of administration, for clinical applications. Our data strongly suggest that the described combination is a class effect rather than a drug-specific effect and would remain relevant in the event of a shift towards newer and more effective PARPi or NAMPT inhibitors; further research would be warranted to confirm this, especially in pre-clinical models.

Interestingly, it has been shown that daporinad would also prove effective in sensitizing triple-negative breast cancer (TNBC) to olaparib (37). Indeed, Bajrami et al. have demonstrated that concomitant use of olaparib and daporinad has a greater effect on moderately olaparib-insensitive TNBC cell lines than olaparib alone. These results are pertinent in the context of intrinsic resistance, but the nature of the approval of olaparib as maintenance therapy highlights the importance of our findings on combatting acquired PARPi resistance specifically, a widespread issue hindering patient recovery in the clinical setting (11, 12). Taken together, the present work and the publication by Bajrami et al. suggest that a combination of olaparib and daporinad could be more broadly used to treat PARPi resistance in other malignancies for which these inhibitors are relevant, such as metastatic prostate cancer (45, 46), pancreatic cancer (47) and small-cell lung carcinoma (48). Further studies are warranted, especially considering the poor prognosis of some of these diseases (49-51).

In addition to the synergistic potential of olaparib and NAD salvage inhibition, other aspects of NAD metabolism might be targetable to further potentiate the effect of PARP inhibition. We confirmed the specificity and involvement of the NAD metabolism in the combination of olaparib and daporinad by rescue experiments using NMN (the product of the



activity of NAMPT), which was also observed when an NAMPT inhibitor was used as a single agent in other ovarian cancer cell lines (31). In parallel, the inhibition of NAD and NMN import from the extracellular environment could be an interesting approach, as it is known that NAD can be found in the blood circulation (52), and concentrations of NAD and its precursors, notably NMN, are dependent on diet and lifestyle (53, 54). It is established that extracellular NAD and its precursors can enter the cell; a study has shown that NAD uptake in mammalian cells is imported in a sodium-dependent fashion without being degraded extracellularly (55). This same study has shown that extracellular NAD, NMN and nicotinic acid mononucleotide, but not NAM or nicotinic acid, could rescue daporinad-mediated mortality (55), suggesting that NMN could also be imported into the cell. However, given that NAD and multiple of its precursors (such as NMN) cannot freely diffuse through membranes (56), these would be actively imported, and the question of how this is accomplished is still being debated. Such a function for CD38 and CD73 had been proposed, where these secreted enzymes would convert extracellular NAD into importable precursor metabolites (57), although recent research has shown that extracellular NAD could enhance PARP activity independently from CD73 and CD38 (58), suggesting that NAD can be imported through other means. Furthermore, two recent studies have proposed a role for sodium-dependent channels SLC6A17 and SLC12A8 in the import of NAD and NMN respectively (59, 60). Following these data, inhibition of NAD and NMN import might further potentiate the synergy of the combination assay. However, as previously mentioned, blood concentrations of NAD and NMN in patients fluctuate with diet and lifestyle; these potential variations, in accordance with the possibility for NAD and NMN cellular import, might in part explain why daporinad showed low efficiency as a single agent in clinical trials. Further studies would be warranted to assess the effect of diet on the combination's synergistic potential, and the value of adding inhibitors of NAD import in this context.

Our *in vivo* data demonstrates the efficiency of combining olaparib and daporinad in inhibiting the growth of a PARPi-resistant tumor (Figure 4). Although our method does not perfectly simulate relapse following therapy resistance *in vivo*, our resistant cell line underwent a selection process *in vitro* following extensive treatment to olaparib, similar to what could have occurred in the context of olaparib maintenance therapy. Interestingly, the treatment of mice

with daporinad alone or in combination caused a significant positive variation in the weight of mice (5.91% and 2.93% on average, respectively) (Figure 4c-d). However, such a phenomenon was not observed with daporinad in previously published data using nude mice (37); this suggests that the noted effect of daporinad on body weight might be due to the strain of mice used for the xenograft experiments.

Taken together, our data proposes a universally effective approach to address the problem of PARP inhibitor resistance. The heterogeneous nature of ovarian cancer and its propensity for resistance, both acquired and intrinsic, greatly contribute to its unmatched lethality amongst gynecological cancers (3, 4). We show that targeting the main biosynthesis pathway of PARP1's substrate in cancer cells works to induce or restore PARPi sensitivity in all models tested, providing robust evidence of this combination's usefulness both in vitro and in a preclinical model. Daporinad's status as a drug undergoing clinical trials makes it accessible for repurposing, and in spite of its mixed results as a single agent, we believe that it has strong clinical potential for combination therapy, providing a potential tool for physicians faced with drug-resistant relapse in ovarian cancer patients.

#### **2.2.2.5 Materials and Methods**

##### *Cell line culture conditions*

HGSC cell lines were cultured in 100 mm petri dishes (Sarstedt Inc., Nümbrecht, Germany) in OSE medium (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (WISSENT Inc.), 0.5 µg/mL amphotericin B (WISSENT Inc.) and 50 µg/mL gentamycin sulfate (WISSENT Inc.) (complete OSE medium). Plates were maintained at 37 °C in low oxygen conditions (7% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). The cells were passaged at near confluence by trypsin 0.05% (WISSENT Inc.) digestion. Cultures were discarded before the 20th passage, after which a fresh batch of cells was thawed for further experiments. For resistant cell lines, passages were counted from when stable resistance was confirmed.

##### *Acquired resistance cell line derivation*

To derive our acquired resistance cell lines, the PARPi-sensitive HGSC cell lines OV1946, TOV3041G, OV2978, TOV2978G, TOV1946 and OV2295 (Cellosaurus Accession numbers CVCL\_4375, CVCL\_9T24, CVCL\_A1SM, CVCL\_9U73, CVCL\_4062 and CVCL\_9T13 respectively) were exposed to olaparib, niraparib or talazoparib 24 hours after passaging at concentrations near their respective IC<sub>50</sub>. Cells were cultured in the presence of the inhibitor until their confluence lowered to 10%, at which time the culture medium was replaced with inhibitor-free fresh complete OSE medium. The cells were left to recover from treatment until reaching near-confluence, and subsequently passaged. Treatment was repeated at the same concentration post-passage until the cell growth was not affected at the concentration used. Concentrations were then increased two-fold, and the process repeated until a sufficient level of resistance was reached. The stability of the resistance phenotype was determined by evaluating the IC<sub>50</sub> of our resistant cell lines after at least five drug-free passages, as well as after a freeze-thaw cycle, as previously described (26).

#### *Reagent and drug preparation*

Olaparib (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA), daporinad (MedChemExpress), niraparib (Abmole Bioscience Inc., Houston, TX, USA), talazoparib (MedChemExpress), OT-82 (SelleckChem Chemicals, Houston, TX, USA) and KPT-9274 (SelleckChem Chemicals) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA).  $\beta$ -nicotinamide mononucleotide (NMN) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was dissolved in sterile water.

#### *PARP inhibitor sensitivity assays*

PARP inhibitor sensitivity was determined by clonogenic survival assays, as previously described (24, 40). Briefly, 750 to 2000 cells were seeded per well in 6-well plates. The cells were treated with a range of PARP inhibitor concentrations 24 hours after seeding, and the plates were incubated for 5 to 15 days, depending on cell growth, until colonies were visible to the naked eye. The cells were then fixed for 10 minutes with cold methanol (Chaptec Inc., Montréal, QC, Canada), and then dyed for 10 minutes with a solution of 50% v/v methanol and 0.5% m/v methylene blue (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA). Colonies were counted with a stereomicroscope, and the colony count for each concentration was represented as a mean

percentage of the control (untreated) wells. IC<sub>50</sub>s were calculated using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Each experiment was performed in duplicate and repeated at least three times.

#### *Drug combination assays*

The effect of the combination between daporinad and PARP inhibitors was determined by live-cell imaging proliferation assays and confluence monitoring over time using the IncuCyte® ZOOM System (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI, USA). In a 96-well plate, 1000 to 2000 cells were seeded per well, and the cells were treated 24 hours later with either the drug vehicle, daporinad, a PARP inhibitor, or a combination of these two drugs, in presence or absence of NMN (Sigma-Aldrich) (0.5 mM). For each cell line, an array of concentrations was tested for each drug, and only the concentrations with the strongest synergy per cell line were retained for each drug for subsequent experiments, ranging between 1 and 4  $\mu$ M (olaparib), and 8 and 16 nM (daporinad). Cell confluence was measured every four hours in each well for 5 to 12 days post-treatment, depending on the individual cell line growth rates, and each time point was represented as an average of the fold-changes from the initial confluence values per condition. Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times, except where otherwise indicated in figure legends. For OV1946or, synergy maps were generated using SynergyFinder (61).

#### *Antibodies*

For Western blots, cleaved caspase-3 (CC3) was detected using a primary anti-CC3 (Asp175) antibody (Cell Signaling Technology, Whitby, ON, Canada) at a 1:1000 dilution, and a secondary peroxidase horseradish-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (MilliporeSigma) at a 1:2500 dilution.  $\beta$ -actin was detected using a primary anti- $\beta$ -actin (AC-50) monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK) at a 1:10000 dilution, and a secondary peroxidase horseradish-conjugated goat anti-mouse (H+L) IgG antibody (MilliporeSigma) at a 1:2500 dilution. For immunofluorescence,  $\gamma$ H2A.X was detected using a primary anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) clone JBW301 antibody (MilliporeSigma) at a 1:1500 dilution, and a secondary Cyanine5-

conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed antibody (Invitrogen, Waltham, MA, USA), at a 1:800 dilution.

#### *Intracellular NAD quantification*

OV1946or cells were treated with the drug vehicle (DMSO), 20  $\mu$ M of olaparib, 20 nM of daporinad, or a combination of the two drugs in 100 mm petri dishes and incubated at 37 °C for 24 hours. The treated cells were then harvested using trypsin, and  $2 \times 10^5$  cells were counted and pelleted per condition. Intracellular NAD levels were then quantified using the NAD/NADH quantification colorimetric kit (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) according to manufacturer instructions. Relative NAD levels were calculated as a ratio of absorbance compared to the vehicle condition. Experiments were performed in six replicates and repeated three times.

#### *Western blot*

OV1946or cells were treated with the drug vehicle (DMSO), 20  $\mu$ M of olaparib, 20 nM of daporinad, or a combination of the two drugs in 100 mm petri dishes, and incubated at 37 °C. After five days of treatment, the cell supernatant was collected, and the treated cells were harvested with trypsin (0.05%). Adherent and suspended cells were pelleted together and rinsed, then lysed on ice for 30 minutes with lysis buffer (Triton X-100 1%, Glycerol 10%, Tris-Base pH 4.7 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Total protein concentration was measured by Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using a GENESYS 10S US-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 30  $\mu$ g of total protein extract were loaded into precast Mini PROTEAN® TGX™ 4–15% gradient Tris-glycine SDS-polyacrylamide 10-well gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and migrated at 90 V for 65 minutes. The migrated proteins were transferred onto a Trans-Blot Turbo Midi 0.2  $\mu$ m PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories) with the Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad Laboratories) using the low molecular weight program. The membranes were blocked with a solution of 5% skim milk (Burlington, ON, Canada) and 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich) in PBS (WISENT Inc.) for 60 minutes. The membranes were then incubated with primary antibody in the PBS-Tween-Milk solution overnight at 4 °C for CC3, or at room temperature for 60 minutes in the case of  $\beta$ -actin.

The membranes were subsequently incubated with the secondary antibody for 60 minutes at room temperature, and the proteins were detected and imaged with Amersham™ ECL Prime Western Blotting detection reagents (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories). Densitometry was performed using the NIH ImageJ software (62).

### *Immunofluorescence*

OV1946or cells were seeded on circular borosilicate glass coverslips (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) in 24-well plates, at a density of 40 000 cells per well. The cells were treated with the drug vehicle (DMSO), 20  $\mu$ M of olaparib, 20 nM of daporinad, or a combination of the two drugs, and incubated at 37 °C for five days. The cover slides were then collected and the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes, then permeabilized with 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 minutes. The cover slides were subsequently blocked with a solution of 0.8% bovine serum albumen (BSA) (Sigma-Aldrich) and 4% donkey serum (Sigma-Aldrich) in PBS for 60 minutes, then incubated with the primary antibody overnight at 4 °C. The next day, the cover slides were incubated with the secondary antibody for 60 minutes at room temperature, then mounted onto microscope slides using ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) and left to set overnight at room temperature, protected from light. Pictures were taken using a ZEISS Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), and the quantification of foci per cell was performed using the NIH ImageJ software (62).

### *Mouse experiments*

All animal studies were approved by the Institutional Committee on Animal Protection (Comité institutionnel de protection des animaux-CIPA) protocol according to the Canadian Council on Animal Care (CCAC) (protocols C14008AMMs and C18010AMMs). A suspension of  $5 \times 10^6$  cells in a solution of 50% Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) (WISENT Inc.) and 50% Matrigel® basement membrane matrix (Corning Inc., Corning, NY, USA) was prepared for each mouse, for a total injection volume of 200  $\mu$ L. The cell suspension delivered into NOD.Cg-Rag1tm1Mom IL2rgtm1Wjl/SzJ (NOD rag gamma; NRG) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) as a left gluteal subcutaneous injection, as previously described (40). When the

tumors reached an average volume of approximately 200 mm<sup>3</sup>, the mice were injected intraperitoneally with either 50 mg/kg of olaparib, 5 mg/kg of daporinad, a combination of these two drugs, or the drug vehicle, consisting of 10% DMSO (MilliporeSigma), 40% polyethylene glycol 400 (Sigma-Aldrich) and 50% DPBS (WISENT Inc.). The mice were housed under sterile conditions in a laminar flow environment with unrestricted access to food and water, and their weight and tumor xenograft volume was measured at least twice a week. Mice were treated once a day for 21 days, after which the animals were sacrificed in accordance with CCAC guidelines. Each group consisted of 8 mice.

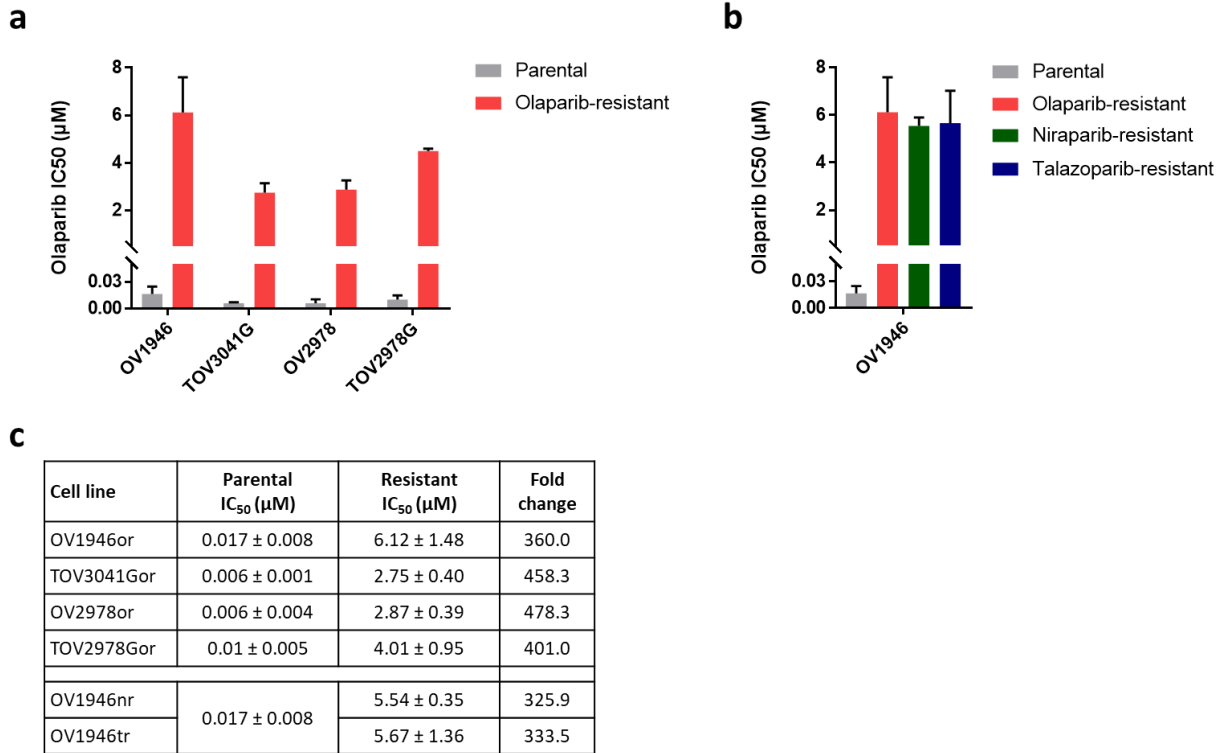
#### **2.2.2.6 Acknowledgments**

Ovarian tumor banking and cell line derivation was supported by Ovarian Cancer Canada (OCC) and by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer) of the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) affiliated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). We thank the animal facility of the Centre de recherche du CHUM (CRCHUM) for their contribution to the animal experiments. A.-M.M.-M. and D.M.P. are researchers of the CRCHUM, which receives support from the FRQS. A.S. was supported by an FRQS doctoral scholarship, as well as studentships from the Canderel Fund and the Michèle St-Pierre Scholarship of the Institut du cancer de Montréal (ICM). This work was supported by the Oncopole in collaboration with the FRQS, the Cancer Research Society, Génome Québec and IRICoR (#265877 to D.M.P. and A.-M.M.-M).

#### **2.2.2.7 Conflicts of Interest**

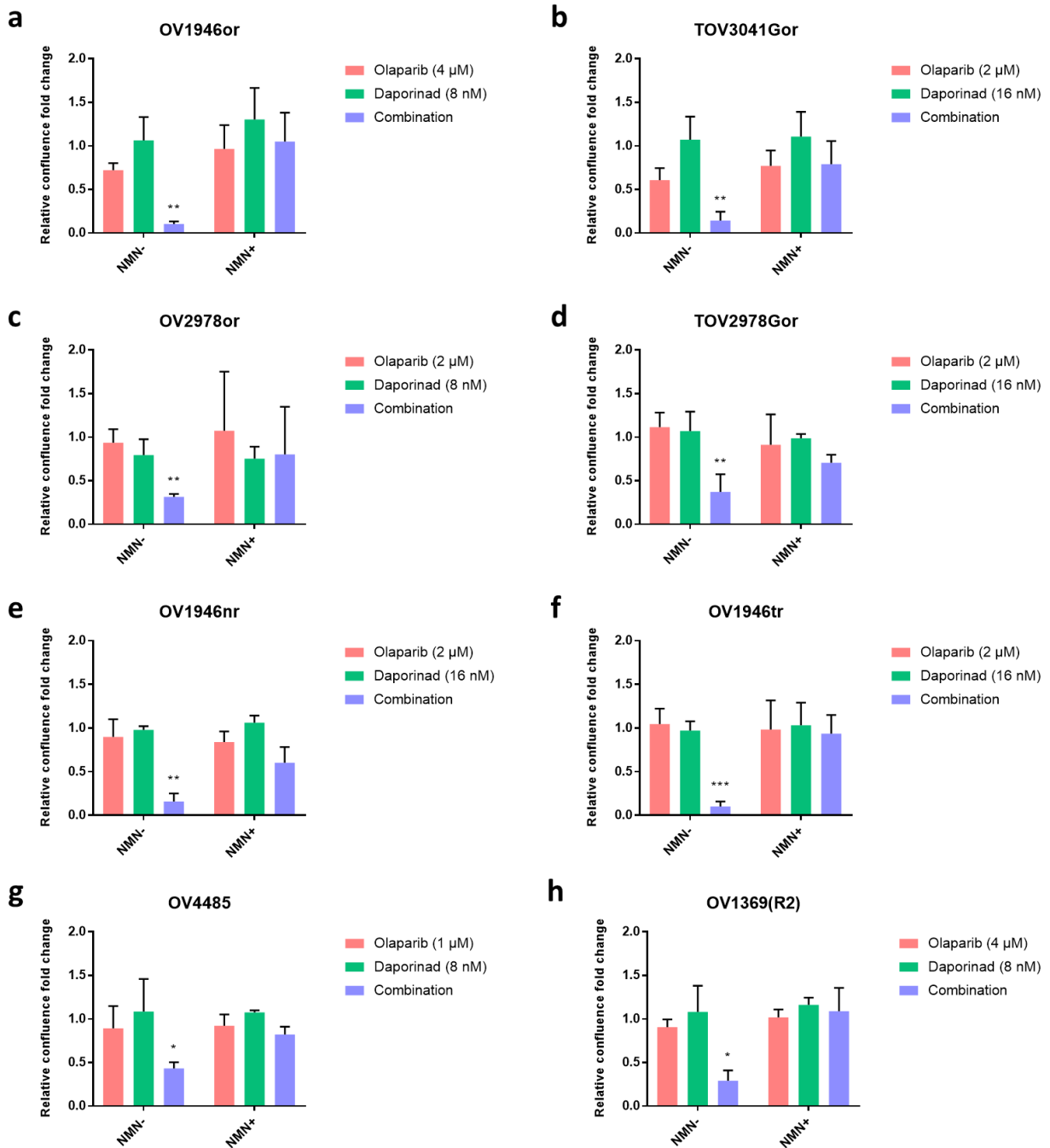
The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

### 2.2.2.8 Figures and Tables



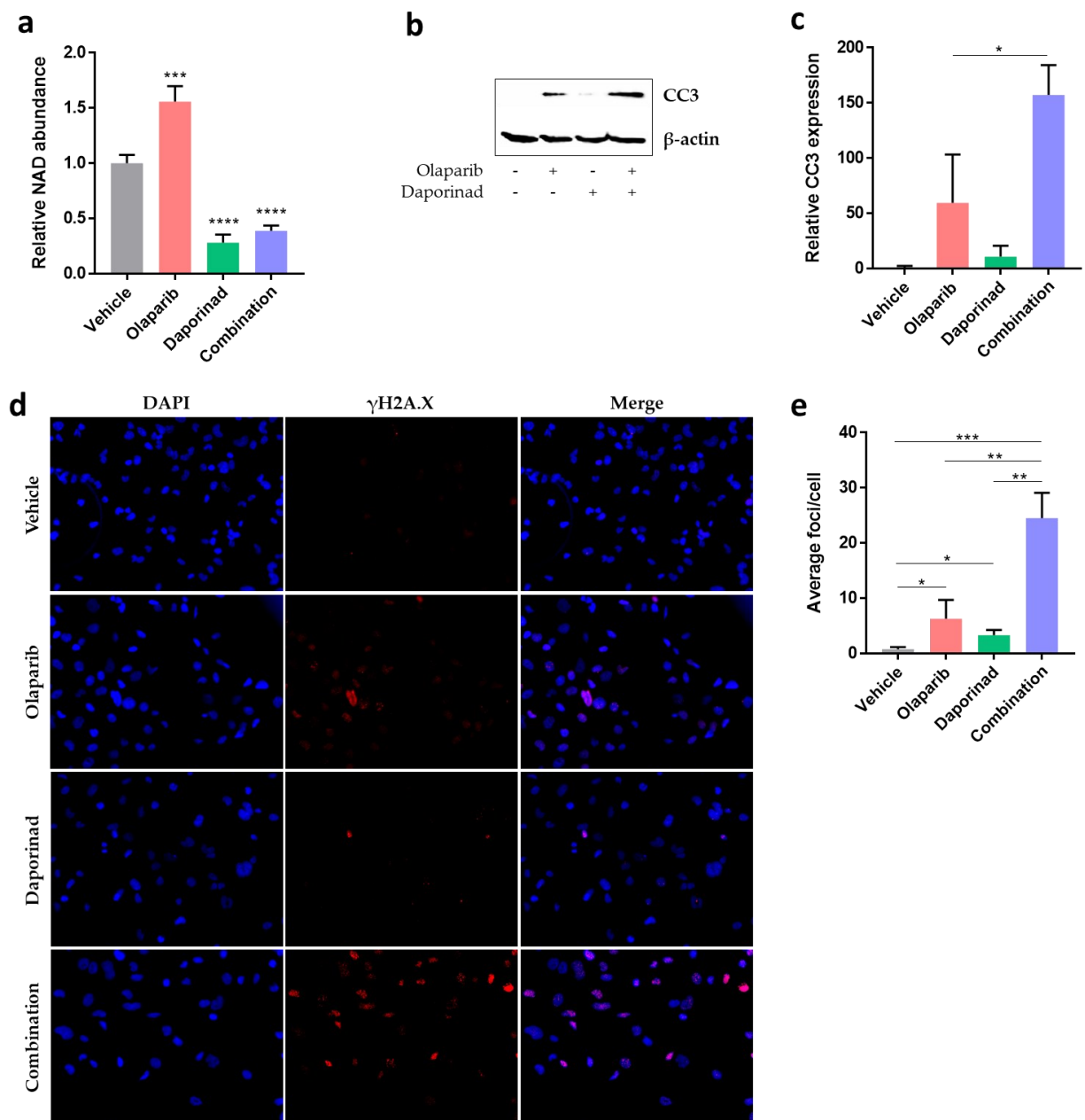
**Figure 1 — Olaparib sensitivity of the acquired resistance cell lines.** Box plot comparing the olaparib IC<sub>50</sub> of each of the olaparib-resistant (-or) cell lines to that of their parental counterparts (a), and the olaparib IC<sub>50</sub> of the niraparib- and talazoparib-resistant (-nr, -tr) OV1946 cell lines compared to parental OV1946 (b), with detailed values (c). Experiments were repeated three times. Error bars represent SEM.



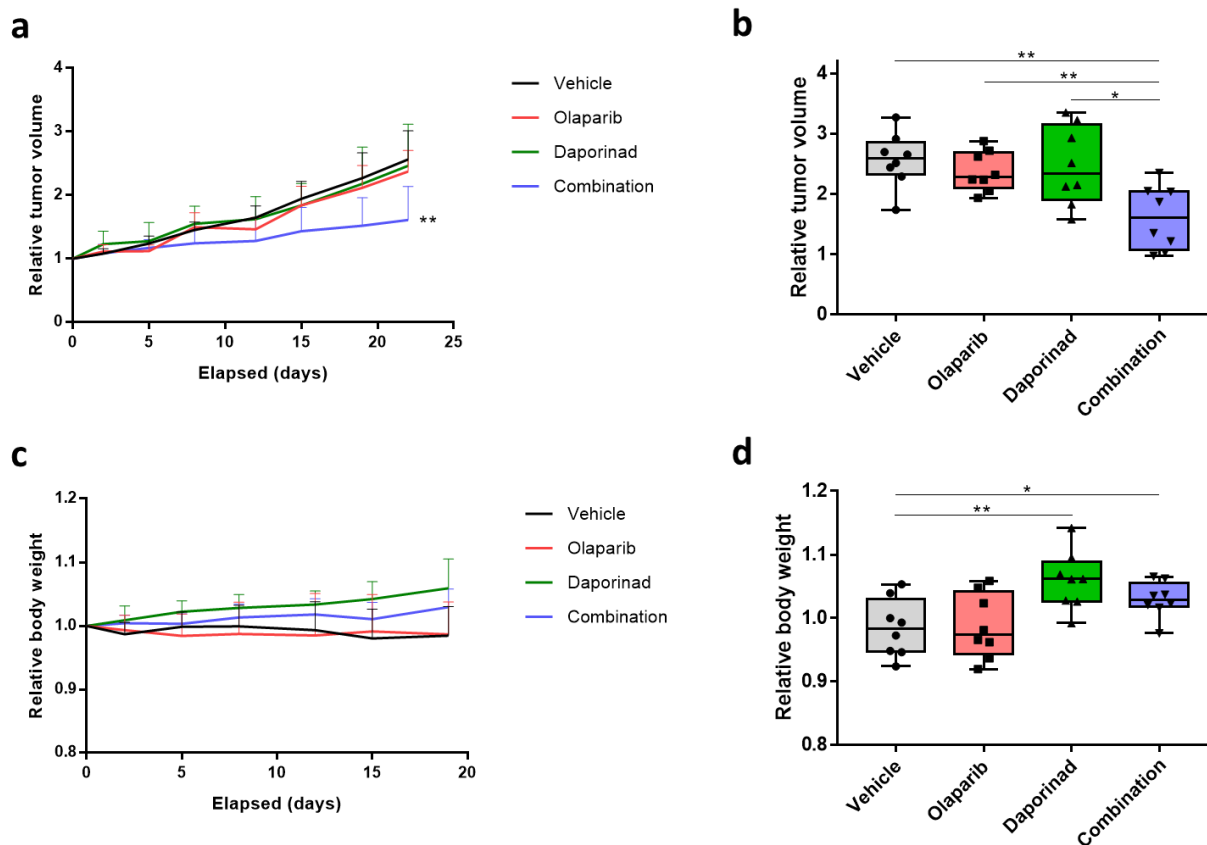


**Figure 2 — Combination of daporinad and olaparib in various resistant cell lines.** Box plots comparing the relative confluence fold change at experiment end points after treatment with daporinad, olaparib or a combination of the two, in absence or presence of NMN. Experiments were repeated three times. Error bars represent SEM. Statistical significance was determined using Student’s t-tests between the combination and each single agent, and only the highest p-

value was illustrated. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Numerical values are detailed in Supplementary Figures 2 and 6.



**Figure 3 — Effect of treatment on NAD metabolism and apoptosis.** Relative intracellular NAD levels after 24 hours of treatment (a). Western blot (b) and densitometry (c) of cleaved caspase-3 (CC3) expression after 5 days of treatment as a measure of apoptosis. Immunofluorescent staining (d) and quantification (e) of  $\gamma$ H2A.X foci after 24 hours of treatment as a measure of DNA damage. Experiments were repeated three times. Error bars represent SEM. Statistical significance was determined using Student's t-tests. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 4 — *In vivo* mouse xenograft models.** Xenograft tumor growth over time per treatment condition (a), with box plots representing the relative tumor volume at end points (b). Evolution of mouse body weight over time (c) and at end points (d) were plotted. Statistical significance was determined using Student's t-tests. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Each group consisted of 8 mice.

### 2.2.2.9 References

1. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(4):284-96.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33.
3. Erol A, Niemira M, Kretowski AJ. Novel Approaches in Ovarian Cancer Research against Heterogeneity, Late Diagnosis, Drug Resistance, and Transcoelomic Metastases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
4. Davidson B, Trope CG. Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Womens Health (Lond).* 2014;10(5):519-33.
5. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet.* 2019;393(10177):1240-53.
6. Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Barroilhet L, Behbakht K, Berchuck A, et al. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;19(2):191-226.
7. Freimund AE, Beach JA, Christie EL, Bowtell DDL. Mechanisms of Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32(6):983-96.
8. Moore KN, Pothuri B, Monk B, Coleman RL. PARP inhibition in recurrent ovarian cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2020;18(10):647-55.
9. Kim G, Ison G, McKee AE, Zhang H, Tang S, Gwise T, et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015;21(19):4257-61.
10. Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ.* 2020;371:m3773.
11. Wakefield MJ, Nestic K, Kondrashova O, Scott CL. Diverse mechanisms of PARP inhibitor resistance in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019;1872(2):188307.
12. Klotz DM, Wimberger P. Overcoming PARP inhibitor resistance in ovarian cancer: what are the most promising strategies? *Arch Gynecol Obstet.* 2020;302(5):1087-102.
13. Kamaletdinova T, Fanaei-Kahrani Z, Wang ZQ. The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. *Cells.* 2019;8(12).
14. Chen SH, Yu X. Targeting dePARylation selectively suppresses DNA repair-defective and PARP inhibitor-resistant malignancies. *Sci Adv.* 2019;5(4):eaav4340.
15. Kennedy BE, Sharif T, Martell E, Dai C, Kim Y, Lee PW, et al. NAD(+) salvage pathway in cancer metabolism and therapy. *Pharmacol Res.* 2016;114:274-83.
16. Bochum S, Berger S, Martens UM. Olaparib. *Recent Results Cancer Res.* 2018;211:217-33.

17. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 2012;72(21):5588-99.
18. McMullen M, Karakasis K, Madariaga A, Oza AM. Overcoming Platinum and PARP-Inhibitor Resistance in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
19. D'Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair (Amst).* 2018;71:172-6.
20. Mittica G, Ghisoni E, Giannone G, Genta S, Aglietta M, Sapino A, et al. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2018;13(4):392-410.
21. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon AL, Chakravarty P, Scott AL, Bray SE, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer.* 2016;115(4):431-41.
22. Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Drean A, Song F, Aleksandrov R, et al. Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2018;9(1):1849.
23. Gogola E, Duarte AA, de Ruiter JR, Wiegant WW, Schmid JA, de Bruijn R, et al. Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. *Cancer Cell.* 2018;33(6):1078-93 e12.
24. Fleury H, Carmona E, Morin VG, Meunier L, Masson JY, Tonin PN, et al. Cumulative defects in DNA repair pathways drive the PARP inhibitor response in high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017;8(25):40152-68.
25. Sauriol SA, Simeone K, Portelance L, Meunier L, Leclerc-Desaulniers K, de Ladurantaye M, et al. Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease. *Cancers (Basel).* 2020;12(8).
26. McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol.* 2014;4:40.
27. Putt KS, Hergenrother PJ. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD(+): application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Anal Biochem.* 2004;326(1):78-86.
28. Sampath D, Zabka TS, Misner DL, O'Brien T, Dragovich PS. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacol Ther.* 2015;151:16-31.
29. Shackelford RE, Mayhall K, Maxwell NM, Kandil E, Coppola D. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review. *Genes Cancer.* 2013;4(11-12):447-56.
30. Nacarelli T, Fukumoto T, Zundell JA, Fatkhutdinov N, Jean S, Cadungog MG, et al. NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2020;80(4):890-900.

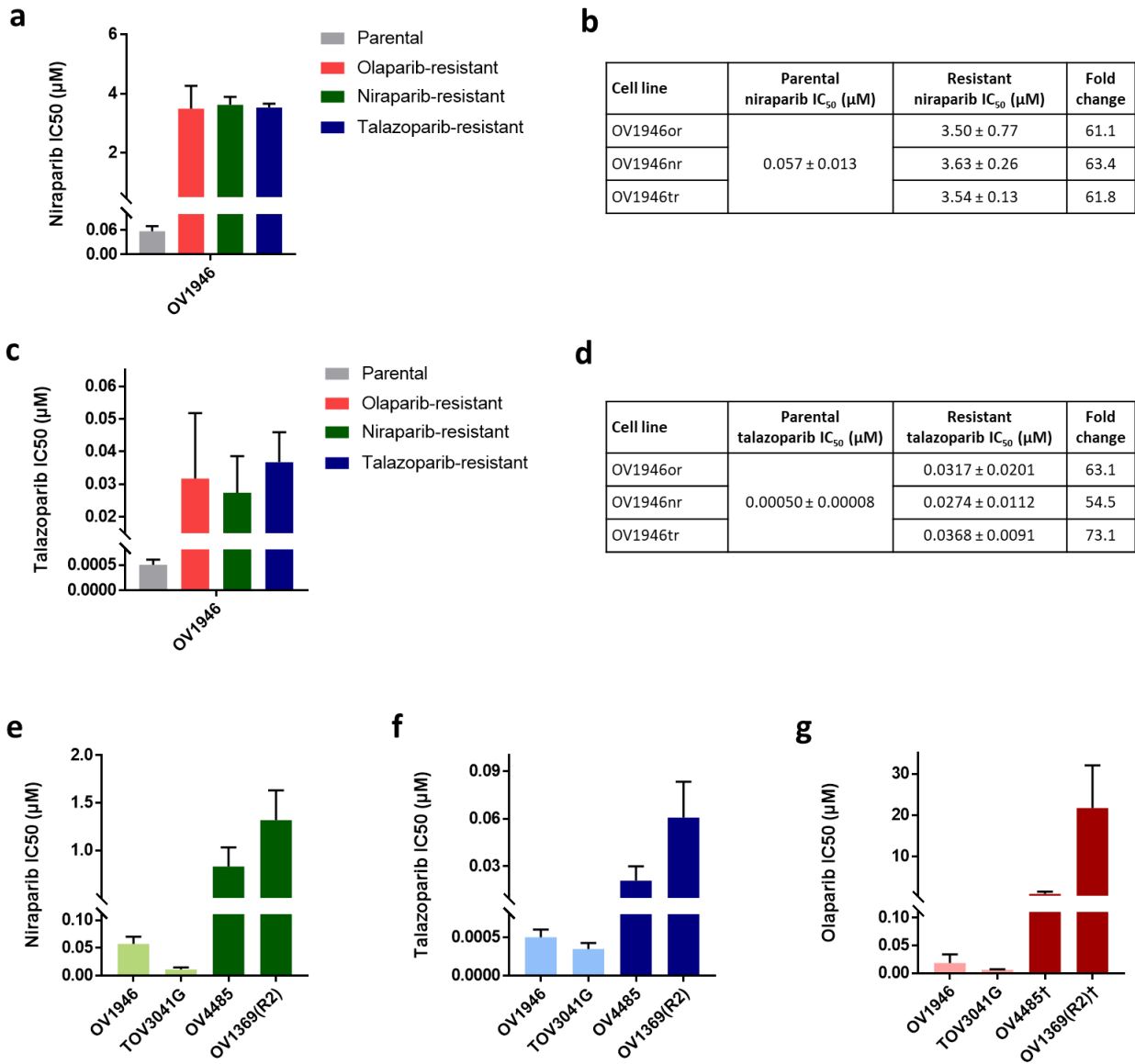
31. Kudo K, Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Morita M, Kawai M, et al. Divergent metabolic responses dictate vulnerability to NAMPT inhibition in ovarian cancer. *FEBS Lett.* 2020;594(9):1379-88.
32. Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* 2003;63(21):7436-42.
33. Korotchkina L, Kazyulkin D, Komarov PG, Polinsky A, Andrianova EL, Joshi S, et al. OT-82, a novel anticancer drug candidate that targets the strong dependence of hematological malignancies on NAD biosynthesis. *Leukemia.* 2020;34(7):1828-39.
34. Mitchell S, Zhang P, Cannon M, Beaver L, Lehman A, Harrington B, et al. Anti-tumor NAMPT inhibitor, KPT-9274, mediates gender-dependent murine anemia and nephrotoxicity by regulating SIRT3-mediated SOD deacetylation. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):101.
35. Cohen MS. Interplay between compartmentalized NAD(+) synthesis and consumption: a focus on the PARP family. *Genes Dev.* 2020;34(5-6):254-62.
36. Dale Rein I, Solberg Landsverk K, Micci F, Patzke S, Stokke T. Replication-induced DNA damage after PARP inhibition causes G2 delay, and cell line-dependent apoptosis, necrosis and multinucleation. *Cell Cycle.* 2015;14(20):3248-60.
37. Bajrami I, Kigozi A, Van Weverwijk A, Brough R, Frankum J, Lord CJ, et al. Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med.* 2012;4(10):1087-96.
38. Ouellet V, Zietarska M, Portelance L, Lafontaine J, Madore J, Puiffe ML, et al. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2008;8:152.
39. Ray-Coquard I, Vanacker H, Le Saux O, Tredan O. Overcoming resistance to PARP inhibitor in epithelial ovarian cancer, are we ready? *EBioMedicine.* 2020;61:103046.
40. Fleury H, Communal L, Carmona E, Portelance L, Arcand SL, Rahimi K, et al. Novel high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines that reflect the molecular diversity of both the sporadic and hereditary disease. *Genes Cancer.* 2015;6(9-10):378-98.
41. Domchek SM, Aghajanian C, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, et al. Efficacy and safety of olaparib monotherapy in germline BRCA1/2 mutation carriers with advanced ovarian cancer and three or more lines of prior therapy. *Gynecol Oncol.* 2016;140(2):199-203.
42. Hoy SM. Talazoparib: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(18):1939-46.
43. Della Corte L, Foreste V, Di Filippo C, Giampaolino P, Bifulco G. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) as target for the treatment of epithelial ovarian cancer: what to know. *Expert Opin Investig Drugs.* 2021;30(5):543-54.
44. Galli U, Colombo G, Travelli C, Tron GC, Genazzani AA, Grolla AA. Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy. *Front Pharmacol.* 2020;11:656.

45. Risdon EN, Chau CH, Price DK, Sartor O, Figg WD. PARP Inhibitors and Prostate Cancer: To Infinity and Beyond BRCA. *Oncologist*. 2021;26(1):e115-e29.
46. Nizialek E, Antonarakis ES. PARP Inhibitors in Metastatic Prostate Cancer: Evidence to Date. *Cancer Manag Res*. 2020;12:8105-14.
47. Zhu H, Wei M, Xu J, Hua J, Liang C, Meng Q, et al. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*. 2020;19(1):49.
48. Serzan MT, Farid S, Liu SV. Drugs in development for small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2020;12(10):6298-307.
49. Swami U, McFarland TR, Nussenzeig R, Agarwal N. Advanced Prostate Cancer: Treatment Advances and Future Directions. *Trends Cancer*. 2020;6(8):702-15.
50. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(44):9694-705.
51. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(2):247-69.
52. Breton M, Costemale-Lacoste JF, Li Z, Lafuente-Lafuente C, Belmin J, Mericskay M. Blood NAD levels are reduced in very old patients hospitalized for heart failure. *Exp Gerontol*. 2020;139:111051.
53. Poljsak B, Kovac V, Milisav I. Healthy Lifestyle Recommendations: Do the Beneficial Effects Originate from NAD(+) Amount at the Cellular Level? *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:8819627.
54. Mills KF, Yoshida S, Stein LR, Grozio A, Kubota S, Sasaki Y, et al. Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice. *Cell Metab*. 2016;24(6):795-806.
55. Billington RA, Travelli C, Ercolano E, Galli U, Roman CB, Grolla AA, et al. Characterization of NAD uptake in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2008;283(10):6367-74.
56. Canto C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab*. 2015;22(1):31-53.
57. Grozio A, Sociali G, Sturla L, Caffa I, Soncini D, Salis A, et al. CD73 protein as a source of extracellular precursors for sustained NAD<sup>+</sup> biosynthesis in FK866-treated tumor cells. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25938-49.
58. Wilk A, Hayat F, Cunningham R, Li J, Garavaglia S, Zamani L, et al. Extracellular NAD(+) enhances PARP-dependent DNA repair capacity independently of CD73 activity. *Sci Rep*. 2020;10(1):651.
59. Grozio A, Mills KF, Yoshino J, Bruzzone S, Sociali G, Tokizane K, et al. Slc12a8 is a nicotinamide mononucleotide transporter. *Nat Metab*. 2019;1(1):47-57.



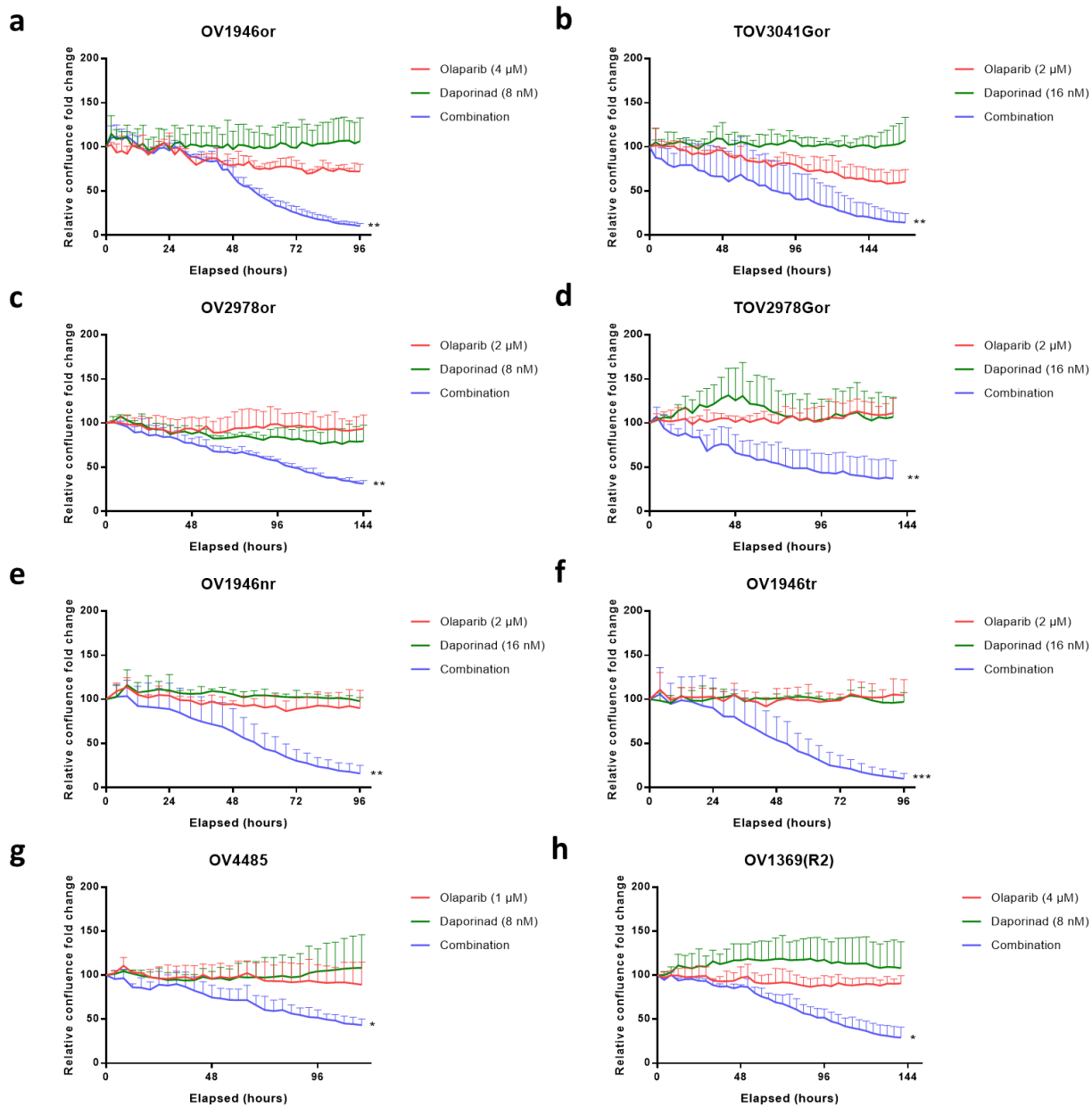
60. Wang L, Liu B, Liu Y, Sun Y, Liu W, Yu D, et al. Escherichia coli Strain Designed for Characterizing in Vivo Functions of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Analogues. *Org Lett*. 2019;21(9):3218-22.
61. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(W1):W488-W93.
62. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.

## 2.2.2.10 Supplementary Figures and Tables



**Figure S1 — Sensitivity of the resistant cell lines to niraparib and talazoparib.** Bar graphs and IC<sub>50</sub> values of the OV1946 acquired resistance cell lines, and their parental counterpart, to niraparib (a, b) and talazoparib (c, d), as well as bar graphs illustrating the niraparib (e), talazoparib (f) and olaparib (g) sensitivity of OV4485 and OV1369(R2), in comparison to two sensitive cell lines. Experiments were repeated two to four times. Error bars represent SEM.

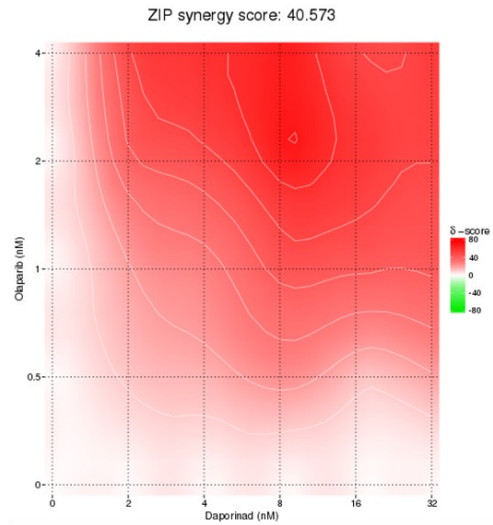
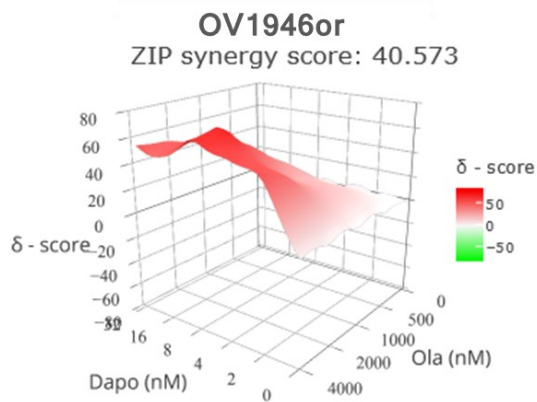
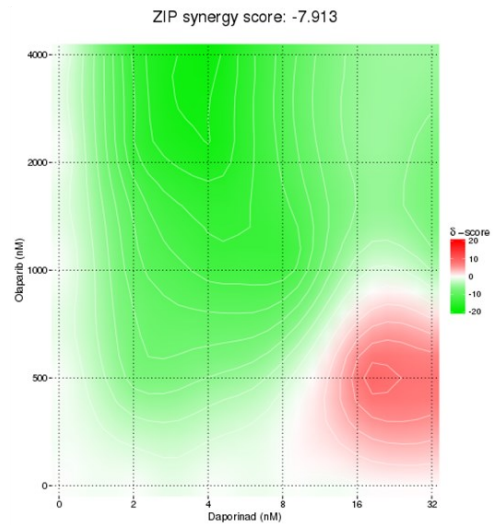
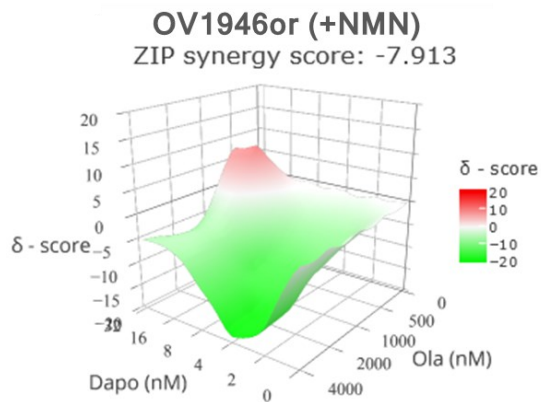
†Olaparib IC<sub>50</sub> data for OV4485 and OV1369(R2) were taken from Fleury H, *et al.* (2017).



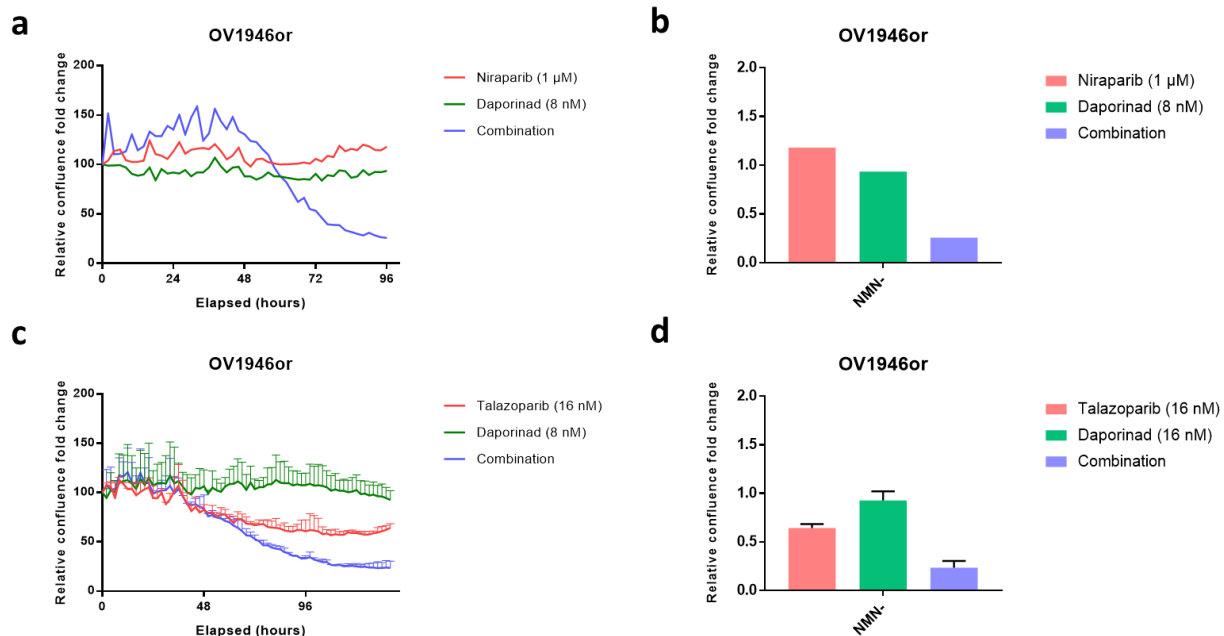
**i**

Cell line	Ola vs combo (NMN-)		Dapo vs combo (NMN-)	
	Fold change	p-value	Fold change	p-value
OV1946or	-7.0	0.00026	-10.4	0.00334
TOV3041Gor	-4.3	0.00927	-7.5	0.00484
OV2978or	-2.9	0.00215	-2.4	0.00926
TOV2978Gor	-3.0	0.00795	-2.9	0.01593
OV1946nr	-5.7	0.00450	-6.2	0.00014
OV1946tr	-10.5	0.00092	-9.7	0.00026
OV4485	-2.1	0.03934	-2.5	0.04160
OV1369(R2)	-3.1	0.00196	-3.7	0.01307

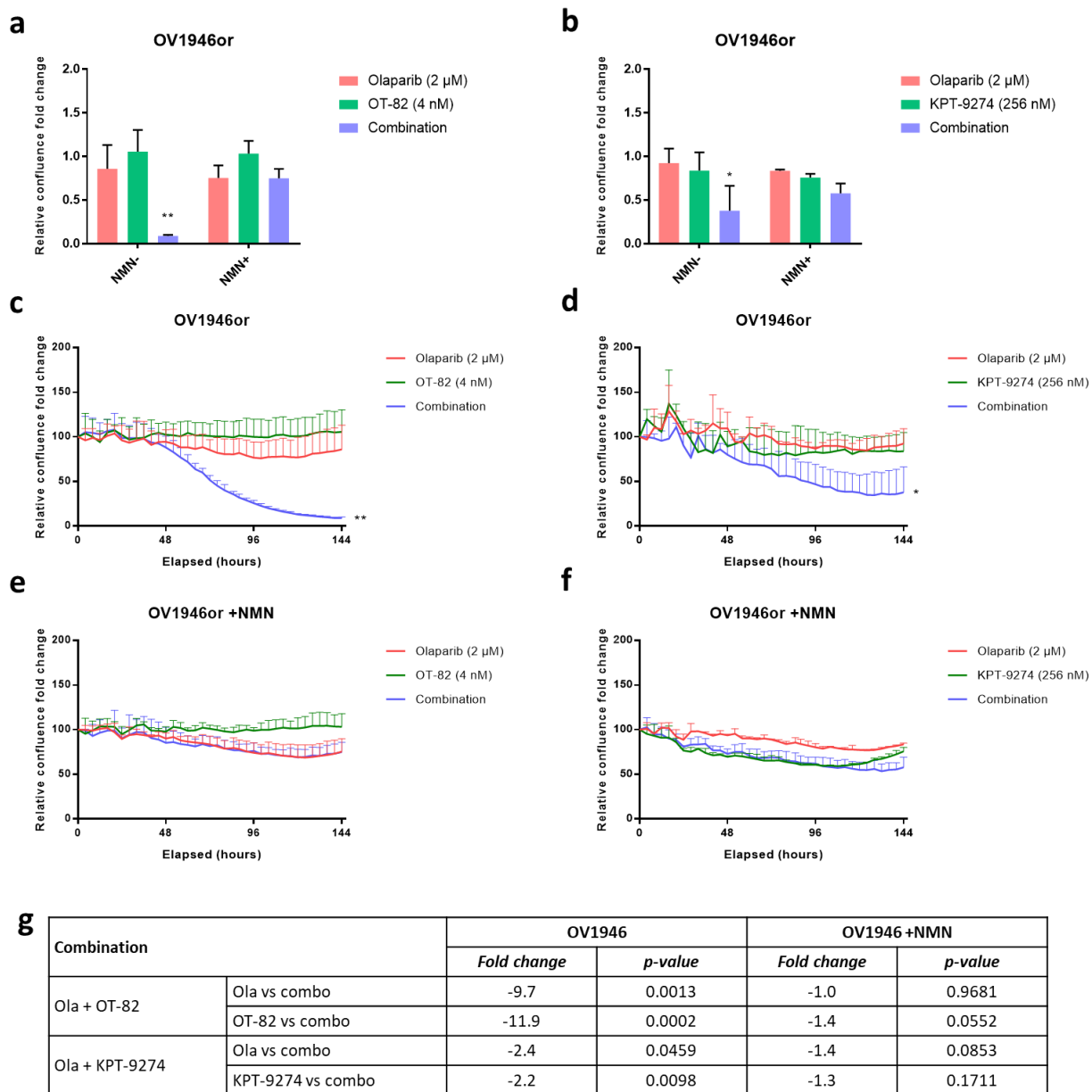
**Figure S2 — Treatment growth curves.** Graphs representing confluence fold change over time per treatment, compared to vehicle (a-h). Fold changes and p-values at endpoints were detailed per condition for each cell line (i). Experiments were repeated three times. Statistical significance was determined using Student's t-tests between the combination and each single agent, and only the highest p-value was illustrated. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Error bars represent SEM.

**a****b**

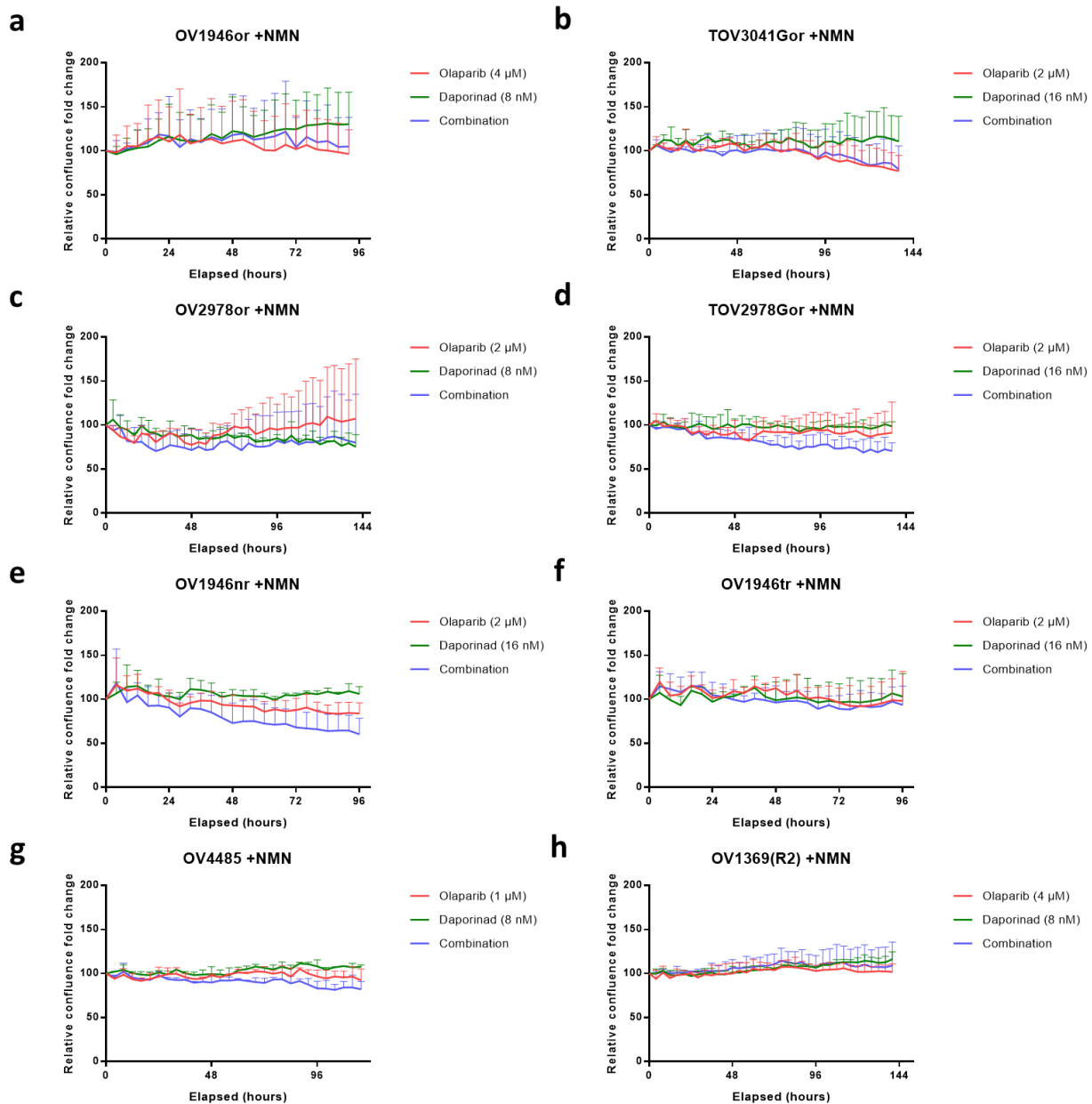
**Figure S3 — Synergy map of the combination of olaparib and daporinad.** Representative graphical maps of the zero interaction potency (ZIP) scores of the combination of olaparib and daporinad in OV1946or. The same drug concentrations were used in absence (a) or presence (b) of NMN in the culture medium. Synergy is represented by red areas and positive scores, while antagonism is represented by green areas and negative scores.



**Figure S4 — Effect of the combination of daporinad and niraparib, and daporinad and talazoparib.** Live-cell imaging-based growth curves (a, c) and endpoints (b, d) of OV1946or treated with daporinad and niraparib (a, b), or daporinad and talazoparib (c, d). Experiments were done once (a, b) or twice (c, d). Error bars represent SEM.



**Figure S5 — Effect of treatment with olaparib and other NAMPT inhibitors.** Graphs representing the effect of treatment with olaparib in combination with NAMPT inhibitors OT-82 (a) and KPT-9274 (b). Confluence fold change over time per treatment, compared to vehicle, with (c-d) or without (e-f) NMN added into growth medium. Fold changes and p-values at endpoints were detailed per condition for each cell line (g). Experiments were repeated two (f), three (d,e) or four (c) times. Statistical significance was determined using Student's t-tests between the combination and each single agent, and only the highest p-value was illustrated on graphs. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Error bars represent SEM.

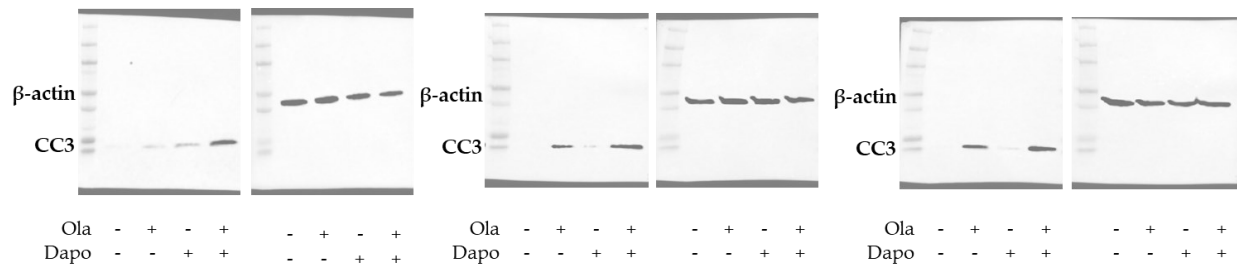


**i**

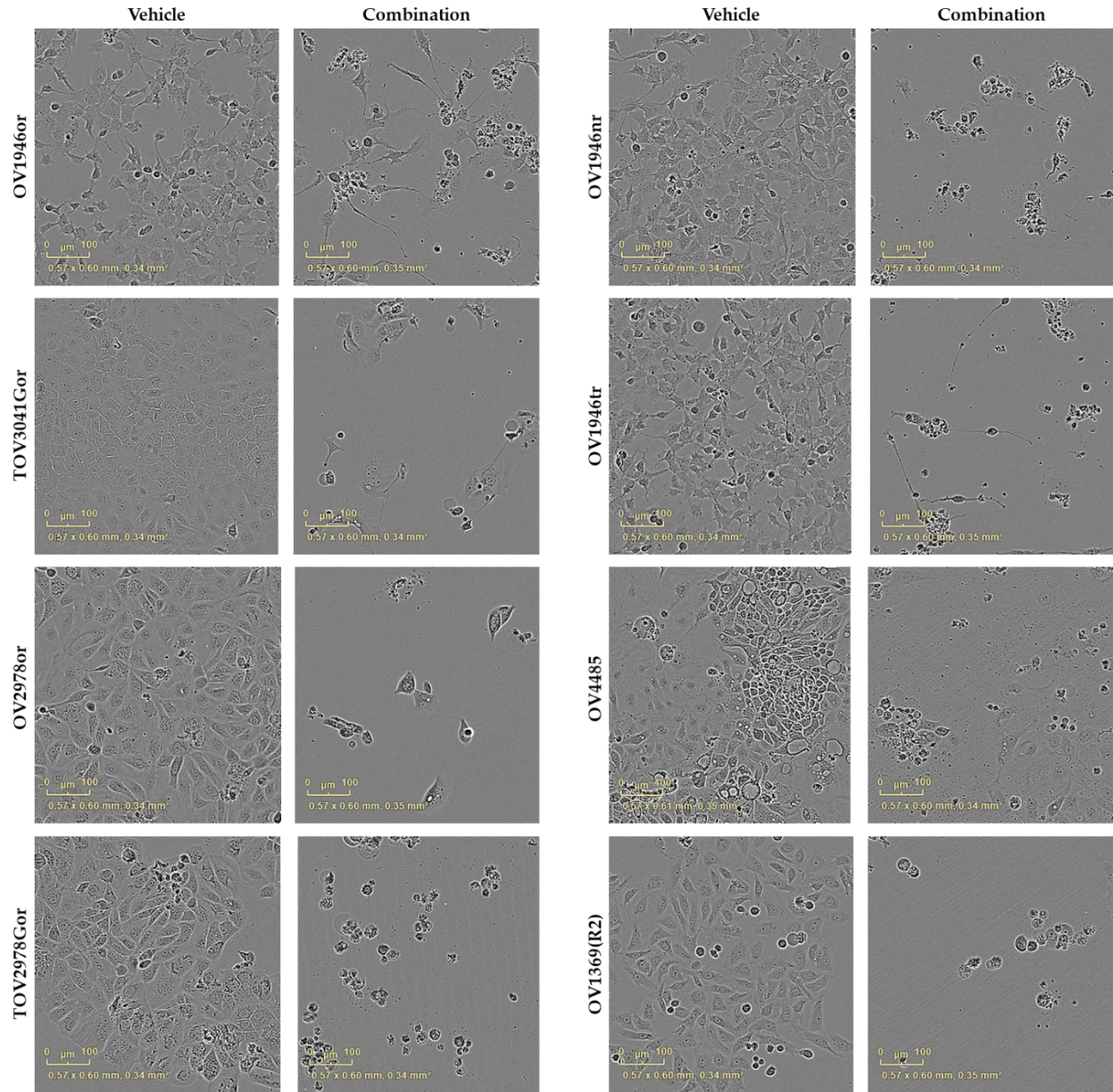
Cell line	Ola vs combo (NMN+)		Dapo vs combo (NMN+)	
	Fold change	p-value	Fold change	p-value
OV1946or	1.1	0.747	-1.2	0.422
TOV3041Gor	1.5	0.641	1.0	0.976
OV2978or	-1.3	0.618	1.1	0.890
TOV2978Gor	-1.3	0.377	-1.4	0.010
OV1946nr	-1.4	0.131	-1.9	0.016
OV1946tr	-1.1	0.847	-1.1	0.648
OV4485	-1.1	0.329	-1.3	0.009
OV1369(R2)	1.1	0.681	-1.1	0.672



**Figure S6 — Treatment growth curves with added NMN.** Graphs representing confluence fold change over time per treatment, compared to vehicle, with NMN added into growth medium (a-h). Fold changes and p-values at endpoints were detailed per condition for each cell line (i). Experiments were repeated three times. Statistical significance was determined using Student's t-tests between the combination and each single agent, and only the highest p-value was illustrated. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Error bars represent SEM.



**Figure S7 — Full blots of the effect of treatment on cleaved caspase-3 levels.** Uncropped pictures of the Western blots (n=3) for cleaved caspase-3 and  $\beta$ -actin, as shown in Figure 3b.



**Figure S8 — Cell line morphology in absence or presence of combination treatment.** Live-cell imaging pictures of each tested cell line, treated with vehicle or olaparib and daporinad combination.

**Table S1 – PARPi sensitivity of derived acquired resistance cell lines.**

Parental cell line	Olaparib IC <sub>50</sub> (μM)	Inhibitor used	Resistant cell line	Olaparib IC <sub>50</sub> (μM)	Fold change
TOV3041G	0.006 ± 0.001 (n=3)	Niraparib	TOV3041Gnr	5.7 ± 2.2 (n=3)	950
		Talazoparib	TOV3041Gtr	4.8 ± 2.1 (n=3)	800
OV2978	0.006 ± 0.004 (n=3)	Niraparib	OV2978nr	2.4 (n=1)	400
		Talazoparib	OV2978tr	2.4 (n=1)	400
TOV2978G	0.01 ± 0.005 (n=3)	Niraparib	TOV2978Gnr	3.8 (n=1)	380
		Talazoparib	TOV2978Gtr	3.0 (n=1)	300
TOV1946	0.018 ± 0.015 (n=3)	Olaparib	TOV1946or	1.1 ± 0.2 (n=3)	61
		Niraparib	TOV1946nr	8.7 ± 2.8 (n=3)	485
OV2295	0.0013 (n=1)	Olaparib	OV2295or	1.5 ± 0.2 (n=2)	1154
<b>Parental cell line</b>					
Parental cell line	Niraparib IC <sub>50</sub> (μM)	Inhibitor used	Resistant cell line	Niraparib IC <sub>50</sub> (μM)	Fold change
TOV3041G	0.012 ± 0.004 (n=3)	Olaparib	TOV3041Gor	2.3 ± 0.7 (n=3)	191
		Niraparib	TOV3041Gnr	4.8 ± 3.2 (n=3)	400
		Talazoparib	TOV3041Gtr	3.9 ± 2.2 (n=3)	325
<b>Parental cell line</b>					
Parental cell line	Talazoparib IC <sub>50</sub> (nM)	Inhibitor used	Resistant cell line	Talazoparib IC <sub>50</sub> (nM)	Fold change
TOV3041G	0.035 ± 0.008 (n=3)	Olaparib	TOV3041Gor	39.0 ± 45.0 (n=2)	1114
		Niraparib	TOV3041Gnr	80.1 ± 71.4 (n=3)	2288
		Talazoparib	TOV3041Gtr	44.9 ± 34.4 (n=2)	1283

## Chapitre 3 – Discussion

### 3.1 Valeur et impact des résultats

#### 3.1.1 Modèles d'étude

Tel que précédemment décrit, le cancer épithélial de l'ovaire est une maladie hétérogène, autant entre les patientes qu'à même une seule tumeur. Dépeindre la maladie de façon représentative, incluant les sous-types plus rares, requiert un grand nombre de modèles qui, pris individuellement, ne fournissent que des informations limitées mais qui, pris ensemble, gagnent en puissance et illustrent plus adéquatement le large spectre de diversité du CEO. Dans cette optique, Cancer de l'ovaire Canada a établi, comme première priorité de recherche de son initiative OvCAN, le développement de modèles de recherche pour le cancer de l'ovaire (339), soulignant comme critique le besoin de bons modèles bien caractérisés, fiables et diversifiés.

À même notre laboratoire jusqu'en 2015, 22 lignées cellulaires de CEO avaient été dérivées et bien caractérisées, rendant accessible un grand nombre de modèles versatiles et efficaces pour la communauté de recherche scientifique (112, 124, 125, 340). Parmi ces 22 lignées, 18 ont été décrites comme CSHG; les quatre autres ont été caractérisées au diagnostic comme CE, CCC, adénocarcinome et carcinome séreux de grade 1-2. La publication dans *Cancers* (Chapitre 2.1) décrit 10 nouvelles lignées dérivées dans notre laboratoire, ajoutant un modèle du sous-type CM, et un du sous-type CCC, en plus de 7 lignées CSHG et un d'adénocarcinome (préssumé CSHG). Ces nouveaux modèles sont importants dans leur contribution au nombre disponible pour l'étude de la maladie, surtout pour le carcinome mucineux (Figure 2, Chapitre 1.3.2.2). De plus, quatre des lignées décrites dans cette publication peuvent former des tumeurs sous-cutanées en souris, incluant celles des deux sous-types moins communs, permettant ainsi l'étude de la maladie *in vivo*, un atout pour la recherche translationnelle. Les lignées ci-caractérisées présentent des profils diversifiés de phénotypes importants pour la maladie ou son étude, incluant la sensibilité à la chimiothérapie, la vitesse de migration et de croissance, et la capacité à former des sphéroïdes. L'ensemble de ces 32 lignées et leurs données génomiques ont été mises à la disposition de la communauté de recherche.

Une partie de l'intérêt d'avoir beaucoup de modèles d'étude réside dans l'analyse jointe de vastes banques de données à l'aide d'algorithmes, permettant d'étudier un grand nombre de gènes, protéines et voies de signalisation simultanément en peu de temps. De ces analyses peuvent ressortir des cibles thérapeutiques, des biomarqueurs et d'autres facteurs d'intérêt dans l'étude de la maladie. Tel qu'énoncé ci-haut pour le partage des modèles d'étude, l'accessibilité et le partage des banques de données favorise la découverte et alimente le progrès en recherche.

En ce sens, mon projet a généré une grande quantité de données d'expression génique standardisées, ainsi que des données de séquençage génétique; les 32 lignées cellulaires de cancer épithélial de l'ovaire développées dans notre laboratoire ont été soumises une analyse d'expression par biopuce et à un séquençage d'exome, tel que décrit au chapitre 2.1, dans le but premier de rendre accessible ces données aux groupes de recherche étudiant le CEO. Nous avons nous-mêmes effectué plusieurs analyses ciblées de ces données, notamment afin d'évaluer et d'identifier les similarités entre nos différents modèles.

En plus des 32 lignées de CEO, nous avons également soumis les 15 lignées dérivées résistantes aux PARPi à une analyse d'expression par biopuce, dans le but de comparer le profil des lignées résistantes à leur lignée parentale respective; ces banques de données seront également rendues accessibles pour utilisation par la communauté de recherche.

### **3.1.1.1 Données d'expression**

Nos 32 lignées de CEO sont issues d'échantillons variés de 23 patientes différentes, leur parenté ayant été confirmée par analyses STR (*short tandem repeat*), et incluent quatre sous-types différents bien définis : CSHG, CSBG, CM et CCC. Une classification hiérarchique révèle sans surprise que la majorité des lignées cellulaires issues d'une même patiente sont phénotypiquement proches les unes des autres; OV1946 et TOV1946, OV3291 et TOV3291G, OV2978 et TOV2978G, et les lignées 3133 (Annexe, Figure 8). Or, OV1369(R2) et OV2295(R2) ressortent comme éloignées de leurs lignées apparentées. Cela pourrait possiblement être expliqué par la nature de celles-ci, tel qu'établi dans leur publication d'origine (112), en tant que lignées issues d'échantillons prélevés suite à la rechute des patientes. Nous postulons que les traitements successifs entre la chirurgie primaire et la rechute pourraient avoir une incidence sur

leur profil d'expression, expliquant potentiellement en partie pourquoi ces deux lignées se retrouvent aussi éloignées; le profil d'OV3133(R2) supporte également cette idée, étant la lignée la plus éloignée des autres à même le groupe issu de la patiente 3133, et provenant elle aussi d'un échantillon de rechute. Cependant, dans le cas d'OV2295(R2), cet échantillon a été prélevé en même temps que celui de TOV2295(R), au moment de la rechute (112); pourtant, la lignée TOV2295(R) se retrouve phénotypiquement beaucoup plus près d'OV2295, qui elle est issue d'un échantillon d'ascites prélevées lors de la chirurgie primaire. Il a été démontré que les ascites divergent précocement de la tumeur d'origine (341); vue la proximité comparable entre ascites primaire versus tumeur primaire (1946, 2978, 3291) et ascite primaire versus tumeur récurrente (OV2295 et TOV2295(R)), nous pourrions émettre que les ascites subissent des altérations d'expression génique plus marquées au fil du temps, mais cela resterait à confirmer. Il a été démontré que les ascites puissent être un marqueur de l'évolution de la maladie, que celles-ci pourraient contribuer au développement de métastases et de chimiorésistance, et même qu'elles pourraient moduler l'évolution de la tumeur solide elle-même (342-344). Prises ensemble, ces données suggèrent que la tumeur et les ascites évoluent conjointement mais peuvent diverger phénotypiquement après une plus longue durée, nous informant ainsi sur l'importance de considérer ces deux aspects dans le traitement de patientes à long terme, et surtout dans la gestion d'une rechute.

Nos lignées cellulaires incluent des modèles de plusieurs sous-types différents de CEO (Annexe, Figure 8). Les divers sous-types de CEO sont fortement hétérogènes et démontrent habituellement des caractéristiques moléculaires distinctes (24). Dans l'ensemble de nos modèles, une majorité des lignées de CSHG se regroupent ensemble pour former l'une des deux branches majeures; la lignée de CM TOV2414 et l'une des lignées de CCC, TOV21G, se classifient avec les CSHG, alors que OV1946 et TOV1946, des lignées de ce dernier sous-type, se regroupent dans l'autre branche majeure; il serait intéressant d'étudier les particularités de ces modèles menant à une telle classification, qui pourrait nous informer sur la pertinence de certains gènes dans la définition des sous-types. L'autre embranchement inclut, séparée des autres, la lignée TOV81D, décrite dans sa publication d'origine comme adénocarcinome papillaire séreux de grade 1-2 (340); depuis cette publication, la classification de haut grade versus bas grade a été adoptée,

où un carcinome de grade 1 serait considéré comme bas grade, alors qu'un carcinome de grade 2 ou 3 serait classifié comme haut grade (345). La maladie de la patiente à partir de laquelle TOV81D a été dérivée a été gradée comme 1-2, rendant ambigu le sous-type de cette lignée. Cependant, l'absence d'une mutation de *TP53* dans cette lignée, ainsi que sa position isolée dans la classification hiérarchique (Annexe, Figure 8), suggère que celle-ci serait issue d'un CSBG, plutôt que d'un CSHG. La lignée TOV112D, quant à elle, issue d'une patiente diagnostiquée avec un CE à la pathologie, a initialement été décrite comme une lignée de CE (340). Or, des analyses moléculaires effectuées plusieurs années plus tard ont démontré que la lignée est issue d'une portion dédifférenciée de la tumeur. La classification de cette lignée a donc été raffinée, l'indiquant comme une lignée de carcinome dédifférencié (346). Selon cette classification, il n'est pas surprenant que ce modèle soit phénotypiquement distinct.

Deux lignées, OV90 et OV3331, ont été classifiées comme adénocarcinome, sans sous-type spécifié au diagnostic. La lignée OV3331 est issue des ascites d'une patiente n'ayant pas reçu de chirurgie de cytoréduction, et de ce fait n'a pas pu recevoir de sous-type histopathologique au diagnostic; or, tel que décrit dans la première publication de cette thèse (Chapitre 2.1), les caractéristiques moléculaires de cette lignée suggèrent fortement que celle-ci est du sous-type CSHG, ce qui est supporté ici par son regroupement avec les autres lignées de ce sous-type (Annexe, Figure 8). La lignée OV90, quant à elle, ne présentait pas suffisamment de propriétés différenciées pour être classifiée (347). La publication d'origine note que cette lignée porte une mutation *TP53* (340), suggérant que celle-ci pourrait être du sous-type CSHG; nous notons que plusieurs publications utilisant OV90 ont présumé qu'elle était de ce sous-type (298, 348-354), sans doute dû au moins en partie à son assignation comme lignée séreuse dans des banques de données telles l'organisation de distribution American Type Culture Collection (ATCC) (355), et le projet de caractérisation DepMap (356). Or, une analyse au niveau transcriptomique (Annexe, Figure 9) révèle une absence d'expression de l'ARN de *WT1* ce qui, en plus de sa ségrégation dans la classification hiérarchique, pèse contre cette classification. Or, son absence d'expression de l'ARN de *Napsin A*, de *PR* et d'*ER* suggère qu'elle ne serait pas des sous-types CCC ou CE. Cependant, OV90 serait porteuse d'une mutation *BRAF* (357), souvent retrouvée chez les sous-types CSBG et CM; le haut grade au diagnostic de la patiente 90 la disqualifie comme CSBG, mais



son profil moléculaire superficiel pourrait la classer comme CM. Un groupe ayant analysé divers modèles cellulaires a caractérisé OV90 comme « possiblement séreux de haut grade », avec un score intermédiaire selon leurs critères d'analyse (128), et un autre ayant étudié le statut mutationnel de plusieurs lignées n'a pas pu assigner avec certitude un sous-type pour OV90 (66). Vue sa proximité avec TOV112D dans la classification, nous pourrions postuler qu'il s'agit également d'un carcinome dédifférencié, mais davantage d'analyses moléculaires plus profondes seraient nécessaires pour le confirmer.

Somme toute, l'ensemble des divers modèles développés par notre laboratoire constituent une précieuse mine d'information qui, bien exploitée, permettra à la communauté de recherche sur le cancer de l'ovaire d'étudier la maladie sous plusieurs aspects, et de découvrir et tester de nouveaux biomarqueurs et thérapies applicables à une importante fraction de patientes.

### **3.1.2 Résistance aux inhibiteurs de PARP**

En plus de ces 32 lignées de CEO, ma question de recherche sur la résistance acquise aux inhibiteurs de PARP m'a mené au développement de modèles d'étude pour ce phénomène en particulier. Mon second manuscrit (Chapitre 2.2) décrit le processus de dérivation de lignées cellulaires résistantes aux PARPi, à partir de six lignées sensibles précédemment caractérisées, incluant la lignée OV2978 décrite dans ma première publication (Chapitre 2.1). Il est à noter que nous avons tenté de dériver des lignées résistantes aux PARPi à partir de la lignée sensible BRCA2-mutée OV4453; or, nous n'avons pas pu créer de modèles à partir de cette lignée dû à une sensibilité accrue et persistantes à ces inhibiteurs. Les 15 nouveaux modèles (dérivés des 6 lignées parentales) m'ont servi dans l'étude du phénomène de résistance acquise aux PARPi, et ont mené à la découverte d'une vulnérabilité importante des tumeurs résistantes. Ces lignées, ainsi que leurs données d'expression génique, seront publiées et pourront servir à d'autres groupes de recherche souhaitant étudier cet aspect important du cancer de l'ovaire, soit la résistance au traitement.

La résistance au traitement est, tel que décrit plus tôt (Chapitre 1.2.1), l'un des facteurs importants entravant l'amélioration du taux de survie du CEO. Il est connu que la majorité des

patientes traitées aux inhibiteurs de PARP rechutent avec une maladie résistante, ayant cessé de répondre à la thérapie; cela s'ajoute au phénomène répandu de résistance intrinsèque, où plusieurs patientes ne répondent pas au traitement même initialement. Fleury *et al.* ont publié des données de sensibilité à olaparib pour 18 de nos lignées de CEO, soient 17 CSHG et OV90, considérée par cette publication comme de faisant partie de ce sous-type (298). À partir de ces données, le groupe a su démontrer que la sensibilité aux PARPi n'était pas seulement influencée par la fonctionnalité de la voie de réparation du HR, mais également celle des autres voies de la réparation.

Afin de déterminer si le profil de sensibilité à olaparib se traduisait aux autres PARPi, nous avons parallèlement évalué la  $CI_{50}$  de ces lignées à niraparib et à talazoparib (Annexe, Figure 10). Nous observons, en comparant les graphiques pour olaparib (298), niraparib et talazoparib, que les six lignées les plus sensibles demeurent les mêmes : OV2295 reste la plus sensible aux trois inhibiteurs, suivie de TOV3041G, TOV2978G, OV4453, OV1946 et TOV1946, dans un ordre variable. Il est à noter que dans la publication de Fleury *et al.* ci-référencée, seulement cinq lignées ont été classées comme « sensibles »; TOV2978G a été catégorisée comme ayant une sensibilité intermédiaire, mais reste la plus sensible parmi ce groupe. La catégorie résistante telle que définie par Fleury *et al.*, quant à elle, ne compte que quatre lignées, dont OV866(2), qui ressort comme lignée intermédiaire dans nos analyses sur niraparib et talazoparib. Les trois autres lignées résistantes à olaparib – TOV1369, OV1369(R2) et OV90 – sont également des plus résistantes aux deux autres drogues, en plus de TOV2223G, TOV3133G et OV4485, cette dernière portant une mutation BRCA1 la rendant déficiente en HR (124). Pour cette raison, OV4485 est un modèle d'étude important dans le cadre des PARPi, représentant les 20 à 50% des patientes portant une mutation BRCA mais ne répondant pas au traitement initial (302, 323).

En observant les profils de réponse de nos lignées aux trois PARPi testés, nous notons que les groupes de sensibilité sont similaires; les lignées sensibles à un PARPi le sont aux deux autres, et les lignées résistantes à un PARPi démontrent une résistance au moins intermédiaire aux autres. Ces résultats suggèreraient qu'une patiente intrinsèquement résistante à un PARPi le serait potentiellement aux autres inhibiteurs de cette classe. Or, dans le cas des profils de réponse à niraparib (Annexe, Figure 10), nous notons que la distinction entre le groupe résistant et le

groupe intermédiaire est moins bien définie. Un lien pourrait être fait entre cette observation et le plus large spectre d'utilisation de niraparib en clinique (20, 191), comparé à olaparib (298) ou talazoparib (Annexe, Figure 10), dont le groupe résistant est beaucoup mieux défini et significativement moins sensible que le groupe intermédiaire. Somme toute, tel que démontré, nos nombreuses lignées cellulaires sont des modèles diversifiés, bien caractérisés et représentatifs du CEO, pouvant servir pour l'étude des sous-types, de leurs biomarqueurs et de nouvelles voies de traitement dans divers contextes cliniques, incluant la résistance aux inhibiteurs de PARP.

### **3.1.2.1 Voies de traitement spécifiques**

Un grand nombre de publications décrivent des mécanismes par lesquels une tumeur résisterait au traitement par PARPi, tel que décrit au chapitre 1.4.3. Nous avons tenté de déterminer quels pourraient être les mécanismes supportant la résistance dans nos modèles, autant la résistance intrinsèque qu'acquise, afin de trouver de potentielles solutions.

Dans notre recherche sur les mécanismes de résistance intrinsèque aux PARPi, nous avons comparé les profils d'expression génique des six lignées résistantes et six lignées sensibles à au moins deux des trois PARPi pour lesquels nous avons des données. Une analyse de voies de signalisation, à l'aide de la base de données *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), puis un tri des voies les plus importantes démontre, tel que précédemment décrit par Fleury *et al.*, que diverses voies de réparation de l'ADN seraient associées à la résistance aux PARPi (Annexe, Figure 11a) : le BER (2<sup>e</sup> rang), le NER (6<sup>e</sup> rang), le MMR (20<sup>e</sup> rang), le HR (13<sup>e</sup> rang) et la voie d'anémie de Fanconi (3<sup>e</sup> rang). La voie du NHEJ, quant à elle, ressort comme la 54<sup>e</sup> plus fortement associée à la résistance, selon cette analyse. Le résultat au premier rang est celle des ribosomes, ce qui est également fort intéressant. En effet, tel que décrit plus haut, PARP1 joue un rôle dans la transcription, la maturation et l'assemblage des ribosomes (Chapitre 1.4.1.4), et il a été démontré que la voie de biogénèse des ribosomes est souvent dérégulée dans le CSHG (358). Un groupe a notamment montré en 2014 que la phosphorylation d'une sous-unité ribosomale, la protéine ribosomale S6, induirait une résistance aux PARPi en médiant la réparation de l'ADN (359), suggérant davantage que les processus ribosomaux dans la cellule pourraient avoir une incidence sur la réponse aux PARPi. Un autre groupe a émis que la sensibilité

aux PARPi chez les patientes non déficientes en réparation d'ADN pourrait être expliquée par le rôle de PARP1 dans la modification et la translocation de DDX21, qui promeut la transcription de l'ADN ribosomal (360), et qui est surexprimée au nucléole chez les patientes atteintes du cancer. Il a été proposé que les PARPi puissent être combinés à des inhibiteurs de synthèse des ribosomes (358), ce que nos résultats d'analyse d'expression génique semblent appuyer. Ces analyses au niveau des voies de signalisation nous ont permis d'interpréter certains aspects du phénomène de résistance et de formuler des hypothèses; nous avons également effectué des analyses au niveau des gènes afin de déterminer de potentielles cibles thérapeutiques.

Nous avons ressorti de notre analyse les 30 gènes significatifs les plus fortement affectés (Annexe, Figure 11b). Parmi ces 30 gènes, 11 sont des gènes stimulés (d'un facteur d'au moins 4) par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) : *OAS2*, *OASL*, *FGF13*, *SP110*, *OAS3*, *ISG15*, *EMB*, *BST1*, *RHBDL2*, *IFIT3* et *DUSP6* (361). Nous notons par ailleurs que tous ces gènes, à l'exception de *DUSP6*, sont sous-exprimés dans les lignées résistantes, comparé aux lignées sensibles (Annexe, Figure 11b). Il a récemment été démontré que la signalisation par IFN- $\gamma$  serait associée à une perte de fonction de BRCA1 dans le CSHG, où des cellules de CSHG portant une mutation dans ce gène voyaient une augmentation de l'expression de gènes induits par l'IFN- $\gamma$ , incluant *OAS2* et *OAS3* (362). Nous pourrions émettre que, malgré que nos lignées sensibles ne portent pas toutes une mutation BRCA, leur incapacité à réparer des CDB puisse de façon plus générale mener à une surexpression des gènes induits par l'IFN- $\gamma$ . En outre, nous avons porté une attention particulière à l'intégrine beta-3 (*ITGB3*), qui est ressortie comme le gène significatif le plus fortement surexprimé en moyenne dans le groupe résistant, comparé au groupe sensible (27.9 fois, t-test de Student  $p = 0.02$ ) (Annexe, Figure 12), en tant que protéine pouvant être ciblée directement. Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta; la sous-unité beta-3 peut dimériser avec les sous-unités alpha-IIb et alpha-v, ces deux dimères agissant comme récepteurs reconnaissant la séquence arginine-glycine-asparagine de divers substrats du milieu extracellulaire (363). Plusieurs groupes ont démontré que les intégrines, dont l'intégrine beta-3, peuvent jouer un rôle dans la résistance au traitement dans le cancer, et que cibler ces protéines peut sensibiliser la tumeur (364-366). Nous avons testé notre potentielle cible à l'aide de cilengitide, un puissant inhibiteur de l'intégrine alpha-v-beta-3, et secondairement des intégrines

alpha-v-beta-5 et alpha-v-beta-1 (367), ayant été le sujet de plusieurs essais cliniques pour divers cancers (368). Nos résultats illustrent que la combinaison entre niraparib et cilengitide était efficace contre OV1369(R2) (Annexe, Figure 12b), notre lignée la plus intrinsèquement résistante aux PARPi (Annexe, Figure 10). Nos essais subséquents sur la lignée OV4485, aussi résistante aux PARPi, ont démontré une plus faible efficacité de synergie pour cette combinaison, voire même de l'antagonisme à certaines concentrations (Annexe, Figure 12c). Ceci suggère que la combinaison pourrait être efficace chez certaines patientes sans l'être chez d'autres, et que d'autres marqueurs que l'expression d'ITGB3 seraient nécessaires pour prédire lesquelles y répondraient. Une piste possible serait la voie Src, via laquelle l'intégrine alpha-v-beta-3 active les kinases JNK et p38 (369, 370); il a été démontré que JNK et p38 pourraient servir de mécanisme compensatoire médiant la résistance à olaparib dans le cancer de l'ovaire, et que leur inhibition empêche efficacement la croissance de cellules résistantes à ce PARPi (371). Davantage d'études seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Parallèlement, tel que décrit ci-haut, nous avons soumis nos lignées ayant acquis une résistance aux PARPi à une analyse d'expression par biopuce. En comparant l'expression génique des lignées résistantes et des lignées parentales pour OV1946, TOV3041G, OV2978 et TOV2978G, nous observons que respectivement 34.9%, 32.2%, 19.5% et 10.6% des gènes surexprimés ou sous-exprimés le sont pour les trois modèles dérivés d'une même lignée (Annexe, Figure 13a). Or, en analysant l'ensemble de ces données d'expression, aucun gène n'était différentiellement exprimé en commun entre toutes nos lignées résistantes. En comparant les gènes communément affectés entre seulement deux familles, les lignées OV1946 résistantes et les lignées TOV3041G résistantes, nous observons que la majorité des gènes surexprimés dans ce premier groupe de lignées sont sous-exprimés dans ce deuxième groupe, et vice-versa (Annexe, Figure 13b); un total de 276 gènes sur 10 413, soit environ 2.6% des gènes affectés au total, sont affectés de la même façon entre les deux groupes. Ceci suggère que la majorité des mécanismes par lesquels nos modèles résistants ont acquis la résistance diffèrent selon la lignée parentale, et que combattre ces mécanismes nécessiterait une approche patiente-spécifique, voire même inhibiteur-spécifique. Nous concluons qu'une approche par analyse d'expression ne permette pas de trouver une solution universelle. Nous avons donc plutôt opté d'analyser nos données afin de trouver de

potentiels mécanismes de résistance et cibles thérapeutiques à même une famille de lignées résistantes, plutôt qu'entre les différentes familles.

Comme les lignées résistantes dérivées à partir d'OV1946 et de TOV3041G ont été développées en premier, la majorité des analyses ont été effectuées sur celles-ci. Une analyse KEGG des voies de signalisation nous indique qu'un grand nombre de gènes de la voie de la phosphorylation oxydative sont surexprimés dans toutes les trois lignées résistantes issues d'OV1946 (Annexe, Figure 14a); une analyse plus en profondeur démontre que la majorité des gènes de cette voie sont surexprimés dans au moins une des trois lignées (Annexe, Figure 14b). Nous avons émis comme hypothèse que les lignées OV1946 résistantes aux PARPi auraient subi un changement métabolique et puissent être davantage dépendantes à la phosphorylation oxydative pour leur survie. Afin de tester cette possibilité, nous avons traité la lignée OV1946or, ainsi que la lignée parentale OV1946 et la lignée oculaire épithéliale non transformée ARPE19 comme contrôles, avec le puissant inhibiteur moléculaire rotenone, qui cible le complexe I de la voie de respiration de la mitochondrie (372). Nous avons observé que la lignée parentale OV1946 est plus sensible au rotenone que la lignée normale ARPE19 (Annexe, Figure 14c); cela n'est pas surprenant, puisqu'il est connu que cet inhibiteur a des propriétés antitumorales dans plusieurs cancers (373-375). De plus, en ligne avec notre hypothèse, nous avons observé que la lignée résistante OV1946or est plus vulnérable au rotenone que sa lignée parentale, suggérant effectivement que cette famille de lignées résistantes dépendrait davantage de la voie de respiration mitochondriale, comparativement à avant l'acquisition de résistance. Or, malgré que la lignée normale ARPE19 était moins affectée que les lignées de CEO dans cette étude (Annexe, Figure 14c), le rotenone demeure un inhibiteur lourdement toxique, et son utilisation est difficilement envisageable dans un contexte clinique (372). La poursuite de cette potentielle vulnérabilité nécessiterait une molécule puissante et spécifique moins néfaste ciblant la voie de la phosphorylation oxydative.

Une analyse parallèle plus ciblée des données d'expression a ressorti que, parmi les enzymes PARP, PARP14 était particulièrement fortement surexprimée dans les trois lignées résistantes TOV3041G (Annexe, Figure 15a). PARP14 a récemment accru de l'intérêt comme une cible thérapeutique potentielle pour combattre certains cancers (376, 377); cette enzyme de la

famille des PARP est en fait une MART, qui activerait la transcription de certains gènes de croissance via le facteur de transcription STAT6, lorsque stimulée par l'interleukine-4 (376). Il a aussi été démontré que PARP14 jouerait un rôle dans la réparation de l'ADN par HR (378), et que son inhibition sensibiliserait certains cancers au traitement, notamment dû à son rôle de suppresseur de JNK (379, 380). Nous avons confirmé la surexpression de PARP14 au niveau protéique dans nos trois lignées résistantes dérivées de TOV3041G (Annexe, Figure 15b), et avons parallèlement noté que l'expression protéique de PARP1 n'était pas altérée, malgré l'indication d'une légère baisse d'expression au niveau de l'ARN dans nos données de biopuce. Afin de confirmer le rôle de PARP14 dans la résistance aux PARPi, nous avons transfecté la lignée résistante TOV3041Gor avec un petit ARN interférant (siRNA) ciblant PARP14 (Annexe, Figure 15c). Un essai de croissance a montré qu'après transfection, nos cellules résistantes étaient plus sensibles au traitement à olaparib (Annexe, Figure 15d), suggérant un rôle pour PARP14 dans la résistance à cet inhibiteur. Cependant, malgré l'intérêt accru de PARP14 comme cible thérapeutique prometteuse depuis plusieurs années déjà, ce n'est que récemment qu'un inhibiteur spécifique et puissant contre cette protéine a été décrit et publié (381). Cet inhibiteur, le RBN012759, inhiberait PARP14 avec une  $CI_{50}$  de 3 nM, sans cibler les autres membres de la famille PARP. Il serait fort intéressant de tester l'efficacité de ce nouvel inhibiteur en combinaison avec olaparib dans le contexte des lignées résistantes TOV3041G, et de sa possible utilité dans un contexte clinique pour des cas analogues à ces modèles.

Dans l'optique d'analyses ciblées, nous avons jugé que, dans le contexte de la résistance acquise aux PARPi, comme dans la résistance intrinsèque, les voies de réparation de l'ADN pourraient être d'intérêt. Nous avons considéré la possibilité que nos lignées dérivées aient une plus forte capacité à réparer des cassures d'ADN comme mécanisme de résistance, tel que décrit dans les cas de réversion BRCA, par exemple (Chapitre 1.4.3.2.1). Une analyse préliminaire de nos données d'expression démontre en effet que plusieurs gènes des diverses voies de réparation sont différenciellement exprimés dans les lignées résistantes OV1946 et TOV3041G, quoique présentant des profils plutôt différents (Annexe, Figure 16a-b). Nous avons décidé d'évaluer davantage la fonctionnalité des voies de réparation des CDB, soit le HR et le NHEJ; il a déjà été décrit qu'OV1946 n'a pas de voie de HR fonctionnelle, et que TOV3041G est faiblement

compétente pour cette voie, tel qu'évalué par la formation de foci RAD51 (298). Nos propres données sur la formation de foci RAD51 illustrent une voie de HR faiblement compétente pour OV1946, et une voie fonctionnelle pour TOV3041G (Annexe, Figure 16c). Suivant cette méthode, les lignées résistantes d'OV1946 démontrent une plus grande capacité à former des foci RAD51, suggérant une réversion de la fonctionnalité de la voie du HR. Les lignées résistantes TOV3041Gor et TOV3041Gnr, quant à elles, démontrent une tendance à la baisse pour la formation de ces foci, suggérant une perte ou une suppression de la voie, qui n'est pas observée dans TOV3041Gtr (Annexe, Figure 16c). À l'aide d'un système rapporteur de plasmides DR-GFP et EJ5-GFP, il est possible de mesurer respectivement l'activité des voies du HR et du NHEJ, suivant la capacité des cellules à réparer une cassure particulière dans un gène rapporteur sur un plasmide transfecté, induite par une enzyme de restriction exogène (382). Nos données démontrent une tendance non significative d'augmentation de l'activité de HR dans la lignée résistante OV1946or, comparé à la lignée parentale, mais pas dans la lignée TOV3041Gor (Annexe, Figure 16d); cette légère augmentation dans OV1946or se base sur une lignée parentale d'un niveau de compétence très faible (Annexe, Figure 16e, gauche), et n'arrive qu'à un niveau seuil d'environ 50% de celui de la lignée compétente TOV112D (Annexe, Figure 16e, droite), suggérant que le rétablissement de la voie du HR est partielle. Nous notons entre autres, dans nos données d'expression, que les gènes BRCA1 et BRCA2 ne varient pas significativement entre OV1946 et ses lignées résistantes; malgré que ces gènes ne soient pas mutés pour cette lignée, il serait intéressant de tester leur expression protéique, ainsi que celle d'autres gènes jouant un rôle dans le phénotype de BRCAness. Nous n'observons pas non plus de différence significative dans la voie du NHEJ pour OV1946or, mais notons que cette voie semble être fonctionnelle pour la lignée résistante ainsi que la lignée parentale (Annexe, Figure 16d). Dans le cas de TOV3041G, nous notons un très faible niveau basal de NHEJ, et observons une robuste augmentation de l'activité de cette voie dans TOV3041Gor (Annexe, Figure 16d-e, centre), suggérant que cette voie est rétablie suite à l'acquisition de résistance par cette lignée. Cette supposition est supportée par nos données d'expression, où environ 40% des gènes de cette voie sont surexprimés dans les lignées résistantes TOV3041G comparativement à la lignée parentale (Annexe, Figure 16b), et pourrait expliquer la résistance de ces lignées, malgré l'apparente diminution des foci RAD51 dans la lignée TOV3041Gor



(Annexe, Figure 16c-d). D'autant plus, il est connu que certains facteurs, notamment 53BP1 (383) et le complexe shieldin (384), peuvent jouer un rôle de suppression de la voie du HR et de la formation des foci RAD51. Malgré que ces protéines ne ressortent pas comme affectées dans nos données d'expression d'ARN, il serait intéressant de mesurer le niveau d'expression protéique de certains de ces acteurs afin d'évaluer s'ils peuvent expliquer la diminution en HR et l'augmentation en NHEJ observées.

Prises ensemble, ces données sur les voies de réparation de l'ADN pourraient en partie expliquer la résistance acquise aux PARPi dans nos modèles. Néanmoins, davantage d'analyses seraient nécessaires pour confirmer l'étendue de l'impact de ces voies, surtout des voies de réparation des CSB qui n'ont pas été explorées en profondeur. Cependant, il reste tout de même probable que d'autres facteurs jouent un rôle important dans le phénotype résistant observé, et une compréhension complète du profil de résistance de ces modèles nécessiterait des recherches plus étendues. De plus, seules les lignées résistantes d'OV1946 et de TOV3041G ont été substantiellement analysées dans le cadre de cette thèse; l'étude de nos autres modèles permettrait une appréciation plus générale de la résistance acquise, et assurerait une représentativité plus exhaustive de ce phénomène.

### **3.1.2.2 Voie de traitement universelle**

Tel que précédemment expliqué, un grand nombre de publications ont déjà décrit des mécanismes par lesquels une tumeur peut compenser sa sensibilité aux PARPi, ainsi que des solutions pour contrer ces mécanismes spécifiques, auxquels s'ajoutent les résultats de la section précédente (Chapitre 3.1.2.1). Ce type de méthode s'inscrit dans une optique de médecine personnalisée, où chaque patiente serait traitée selon sa maladie et son mécanisme de résistance spécifiques; or, non seulement cette approche est-elle peu pratique pour les médecins traitants, mais elle laisse place à l'erreur, et implique l'identification de tous les mécanismes sous-jacents possibles, ainsi que leurs solutions respectives. Les résultats décrits dans le second manuscrit (Chapitre 2.2) sont détachés de cette idée de médecine personnalisée, détaillant un moyen de contourner la résistance aux inhibiteurs de PARP par un mécanisme plus général, se basant sur le mode de fonctionnement de PARP1 plutôt que sur le moyen spécifique par lequel une lignée démontre ou acquiert une résistance.

L'efficacité de la synergie entre l'inhibition de NAMPT et l'inhibition de PARP a été démontrée dans le cancer du sein triple négatif en 2012 (337), puis dans le sarcome d'Ewing en 2017 (338); or, Bajrami *et al.* et Heske *et al.* ne cherchaient pas à répondre à une question de résistance, mais plutôt de potentialisation des PARPi dans la maladie qu'ils étudiaient. Leurs résultats montrent que l'utilisation de l'inhibiteur de NAMPT daporinad augmente l'effet cytotoxique d'olaparib en sensibilisant les cellules à ce dernier. Notre recherche affirme plutôt, dans le CEO, que l'utilisation d'un inhibiteur de NAMPT combat la résistance aux PARPi, même dans une situation de résistance acquise après traitement. Nous postulons que l'utilisation d'inhibiteurs de NAMPT en clinique, en combinaison avec les PARPi, pourrait prolonger la durée de vie des patientes dans les stades avancés après rechute, mais augmenterait aussi la proportion de patientes qui bénéficieraient d'un traitement aux PARPi au départ. De plus, suivant les résultats présentés par ces deux groupes, il est possible que l'utilisation d'inhibiteurs de NAMPT pour combattre la résistance aux PARPi puisse s'étendre au cancer du sein et du sarcome d'Ewing, voire même au cancer de la prostate, au cancer du pancréas et au carcinome pulmonaire à cellules claires, pour lesquels les PARPi sont actuellement étudiés ou approuvés pour utilisation clinique.

Deux autres publications récentes ont observé de potentielles applications de l'inhibition du NAMPT dans le cancer épithélial de l'ovaire. La première par Nacarelli *et al.* dans *Cancer Research* en 2020, décrit l'utilisation de daporinad dans le contexte de sénescence induite par le traitement à la chimiothérapie dans le CEO (385). Il est connu que les chimiothérapies à base de platine induisent un phénotype de sénescence, et que ce phénomène induit une chimiorésistance en conférant aux cellules tumorales un phénotype apparenté aux cellules souches (386). Ce groupe a démontré que le NAMPT promeut l'apparition de ce phénotype de cellules souches via l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), et que son inhibition réprime non seulement l'activation de l'ALDH, mais également le phénotype sécrétoire associé à la sénescence post-chimiothérapie. Nacarelli et collègues démontrent qu'il est avantageux de combiner daporinad à un agent à base de platine, rendant ainsi plus efficace la chimiothérapie.

La seconde publication récente par Kudo *et al.*, publiée dans *FEBS Letters* en 2020, tente d'élucider, dans le CEO, les facteurs de sensibilité dictant la réponse au daporinad comme agent unique (387). Ce groupe établit un lien entre la voie métabolique de la glycolyse et la sensibilité

à l'inhibition du NAMPT; les lignées de CEO dont la glycolyse est dépendante du NAMPT seraient sensibles au daporinad comme agent unique, incluant un nombre de lignées résistantes aux inhibiteurs de PARP, où l'inhibiteur dépléterait les niveaux d'ATP dans la cellule. Or, malgré les données *in vitro* présentées par ce groupe, daporinad comme agent unique ne s'est pas montré efficace en essais cliniques, quoique pour des cancers différents (388). De ce fait, un nombre de publications ont subséquemment démontré l'efficacité de combiner les inhibiteurs de NAMPT avec plusieurs autres thérapies, incluant la chimiothérapie alkylante (389-391), tel que mentionné ci haut, mais aussi l'immunothérapie anti-PD-L1 (392) et l'inhibition de NT5E (393), de CD20 (394), de LDHA (395) et du protéasome (396).

Parallèlement, une publication dans *Nature* en 2019 par le laboratoire de Paul S. Mischel a démontré, par des analyses sur un grand nombre de tissus tumoraux et normaux, que certains tissus expriment fortement l'enzyme nicotinate phosphoribosyltransférase (NAPRT), et que les tumeurs qui proviennent de ces tissus ont une fréquence d'amplification plutôt élevée pour cette enzyme. Ils démontrent également que ces tumeurs sont entièrement dépendantes du NAPRT et de la voie de Preiss-Handler pour leur survie; or, les tissus normaux qui n'expriment pas fortement cette enzyme sont plutôt dépendantes du NAMPT et de la voie de récupération pour le métabolisme du NAD (397). Une observation intéressante à soulever ici est que le tissu ovarien serait l'un des tissus exprimant de hauts niveaux de NAPRT, et dont les tumeurs séreuses ont une fréquence élevée d'amplification de cette enzyme (397). Malgré que le groupe de Kudo *et al.* ait démontré une certaine efficacité de daporinad seul dans plusieurs lignées de CSHG (387), nos observations ont plutôt suggéré que l'inhibition du NAMPT n'était pas à elle seule suffisante pour affecter la croissance de nos modèles cellulaires de CSHG; ceci pourrait suggérer que nos lignées cellulaires seraient plutôt dépendantes de la voie Preiss-Handler et du NAPRT, suivant les données obtenues par le groupe de Mischel. Cependant, nous démontrons qu'en présence d'olaparib, l'inhibition du NAMPT était efficace pour tuer des cellules tumorales ovariennes séreuses, suggérant que la voie de récupération joue un rôle important dans le métabolisme du NAD dans cette maladie, et que ces tumeurs ne dépendent pas uniquement de la voie Preiss-Handler. Il est toutefois possible, vu les données obtenues par Chowdhry *et al.* (397), que l'inhibition de cette dernière voie puisse aussi être synergique avec l'inhibition de PARP. Cette

hypothèse pourrait être vérifiée à l'aide de siRNA ciblant NAPRT, mais il n'existe pas actuellement d'inhibiteurs spécifiques et puissants contre NAPRT, puisque l'intérêt pour cette protéine est récent (388), ne rendant pas pour l'instant possible cette option de traitement en clinique. Il a par ailleurs été décrit que l'inhibition du NAPRT sensibilise les cellules tumorales à l'inhibition de NAMPT, incluant le cancer de l'ovaire (398); dans cette optique, il pourrait être intéressant de tester la potentielle synergie cette combinaison avec l'inhibition de PARP, vu l'importance de ces deux voies de métabolisme du NAD dans le tissu ovarien.

## Chapitre 4 – Conclusions et perspectives

Le cancer de l’ovaire est bien établi comme le cancer gynécologique le plus létal, et dans la majorité des cas de diagnostic, il s’agit d’une sentence de mort dans les cinq années suivantes. Il est urgent de trouver des solutions innovatrices et efficaces afin de drastiquement améliorer le sort des patientes. Comme l’a émis Cancer de l’ovaire Canada, le développement de modèles robustes, fiables et représentatifs est une priorité pour l’étude du cancer de l’ovaire sous tous ses aspects, incluant l’évaluation du risque, la découverte de biomarqueurs en dépistage et en pronostique, la classification et l’identification des sous-types, la prédiction de la réponse au traitement, le développement de nouvelles thérapies, et la prévention et la gestion des rechutes. La communauté de recherche en cancer de l’ovaire, à travers ses divers congrès et consortiums, encourage le partage des données et des outils, et nous espérons que les fruits de notre recherche, que ce soit nos modèles versatiles exhaustivement décrits et caractérisés, nos banques de données génomiques, notre biobanque extensive d’échantillons de patientes, ou bien notre expertise technique diversifiée, puissent servir à pousser la recherche sur cette maladie bien au-delà des limites auxquelles nous sommes confrontés.

Nous savons que l’hétérogénéité et la résistance au traitement sont deux aspects caractéristiques et centraux à la létalité de la maladie; à travers cette thèse, ces deux aspects sont traités, et des solutions sont proposées.

D’abord, le développement et la caractérisation de nouveaux modèles cellulaires, surtout pour les sous-types plus rares, permettent des études plus puissantes et approfondies du cancer épithélial de l’ovaire en son ensemble, et permet d’adresser l’hétérogénéité de la maladie, autant entre les sous-types qu’à même un sous-type spécifique. Le développement de différents modèles provenant d’une même patiente, soit en appariant ascites et tumeur, ou en prélevant avant et après traitement, permet non seulement d’étudier divers aspects d’une même maladie, mais également d’évaluer son processus de développement menant à la rechute. Les modèles développés par notre laboratoire permettent ce genre d’étude, et il serait intéressant d’analyser en profondeur les divergences notamment génomiques, protéomiques et métabolomiques entre

les diverses lignées issues d'une même patiente. D'une part, tel que discuté précédemment, les ascites seraient un point d'étude intéressant en tant que modulateur de la réponse au traitement et du développement de métastases, surtout dans le cas où des différences phénotypiques significatives seraient observées entre la tumeur et leurs ascites correspondantes. D'autre part, l'étude des modèles d'ascites ou de tumeurs à différents points dans le temps sont d'un intérêt particulier; il serait possible d'évaluer l'évolution de la maladie et de sa réponse au traitement, permettant d'élucider certains mécanismes de résistance clinique qui favoriseraient la rechute. Il a par ailleurs été démontré que les patientes de CEO acquièrent diverses altérations génétiques et épigénétiques, pouvant notamment mener à la surexpression ou à la réexpression de certaines protéines, à une inactivation de suppresseurs de tumeur, à une acquisition de résistance à la chimiothérapie, et à une adaptation des profils du métabolisme et de la prolifération (399-402), soulignant l'importance de modèles issus d'une même patiente à plusieurs points temporels, pour l'étude de l'évolution de la maladie, incluant au fil des lignes de traitement. De tels modèles cellulaires ont été dérivés dans notre laboratoire, et représentent un précieux outil d'étude pour ce phénomène.

Ensuite, l'étude de la résistance au traitement nécessite également des modèles, dont plusieurs ont été dérivés et étudiés dans le but de trouver des solutions possibles à ce phénomène. Nous planifions rendre ces lignées cellulaires disponibles pour utilisation par la communauté de recherche, fournissant ainsi un nombre important des modèles diversifiés, efficaces et faciles à entretenir pour l'étude de la résistance acquise aux inhibiteurs de PARP. La grande quantité de données générées par notre analyse de biopuce nous a révélé des profils d'expression fortement variés, et malgré que nous ayons soulevé quelques voies et facteurs possibles par lesquels la résistance pourrait être médiée, il serait intéressant de pousser davantage ces recherches pour chacun des groupes de modèles, et d'identifier un potentiel fil conducteur les liant. De la même façon qu'il existe des clés d'identification pour la classification des sous-types du CEO, avec suffisamment de modèles de résistance, il pourrait être possible de dresser une clé d'identification basée sur des données génomiques, afin de classer davantage les patientes selon leurs facteurs de résistance et ainsi, dans une optique de médecine personnalisée, déterminer quel serait le traitement le plus efficace par patiente. En poussant davantage, et en

combinant les modèles résistants provenant d'une même patiente, il pourrait être possible d'identifier quels seraient les mécanismes de résistance les plus probables d'apparaître avant même que la patiente ne rechute, selon le profil de la tumeur primaire. De telles études nécessiteraient cependant un nombre beaucoup plus important de modèles, qu'il serait possible de dériver avec la méthode décrite dans le second article de cette thèse.

Nous avons établi, suivant les résultats présentés dans ce second article, que la combinaison entre daporinad et les PARPi serait efficace pour combattre la résistance à cette dernière classe d'inhibiteurs, autant pour une résistance acquise qu'intrinsèque, et ce dans tous les modèles de résistance testés. Nous jugeons que la versatilité d'un traitement est importante pour son implémentation dans un contexte clinique; la médecine personnalisée demeure un idéal complexe à atteindre, et un traitement universel, comme la chimiothérapie l'est depuis longtemps, serait présumément beaucoup plus attrayant du point de vue d'un médecin. De ce fait, l'un des grands intérêts de la combinaison entre les PARPi et daporinad est son apparente applicabilité universelle, indépendamment du profil de résistance de la patiente. Cependant, daporinad est une drogue administrée par voie intraveineuse, plutôt que par voie orale; dans un contexte d'études et d'implémentation clinique, un inhibiteur oral serait de loin préférable, surtout en combinaison avec un PARPi déjà approuvé pour administration orale. Nos résultats ont démontré, par l'utilisation des inhibiteurs de NAMPT OT-82 et KPT-9274, que la synergie observée entre daporinad et olaparib est un effet de classe, plutôt qu'un effet spécifique à cet inhibiteur. Ces deux nouvelles molécules, actuellement en essais cliniques pour le lymphome (OT-82), le lymphome non-Hodgkinien et la leucémie myéloïde (KPT-9274), sont prometteuses pour leur administration orale, et pourraient être utilisées en combinaison avec les PARPi pour le traitement de CSHG résistant. Davantage de recherches, notamment sur des modèles animaux, seraient nécessaire pour confirmer l'efficacité de ces combinaisons. Parallèlement, nous collaborons actuellement avec un groupe de chercheurs du Princess Margaret Cancer Centre, afin de tester notre combinaison sur des échantillons primaires de patiente ayant rechuté après traitement aux PARPi. La confirmation de l'efficacité de notre traitement sur de tels modèles de résistance acquise supporteraient fortement son applicabilité chez les patientes, et servirait comme preuve de concept robuste pour d'éventuels essais cliniques.

Somme toute, nous espérons que les résultats présentés dans cette thèse puissent servir de point d'appui pour la recherche sur le CEO, et que nos perspectives translationnelles puissent se traduire en une amélioration du sort des patientes diagnostiquées avec cette maladie létale.



## Références bibliographiques

1. Odes EJ, Randolph-Quinney PS, Steyn M, Throckmorton J, Smilg JS, Zipfel B, et al. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S Afr J Sci*. 2016;112(7/8).
2. Di Lonardo A, Nasi S, Pulciani S. Cancer: we should not forget the past. *J Cancer*. 2015;6(1):29-39.
3. Hajdu SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011;117(5):1097-102.
4. Goba Cancer Observatory (GCO) [En ligne]. World Health Organization (WHO). 2021 [cité le 2021/02/06]. Disponible: <https://gco.iarc.fr/>
5. NIH. Cancer Statistics : National Cancer Institute; 2020 [modifié le 2020/09/25; cité le 2021/02/06 2021]. Disponible: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
6. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
7. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):726-34.
8. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*. 2008;25(9):2097-116.
9. Warren GW, Cummings KM. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013:359-64.
10. Roy S. Impact of UV Radiation on Genome Stability and Human Health. *Adv Exp Med Biol*. 2017;996:207-19.
11. Araldi RP, Sant'Ana TA, Modolo DG, de Melo TC, Spadacci-Morena DD, de Cassia Stocco R, et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1537-56.
12. Kanda T, Yajima M, Ikuta K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(4):1132-9.
13. Lunn RM, Jahnke GD, Rabkin CS. Tumour virus epidemiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1732).
14. Ceccaroli C, Pulliero A, Geretto M, Izzotti A. Molecular fingerprints of environmental carcinogens in human cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2015;33(2):188-228.
15. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005;23(2):276-92.
16. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986;323(6089):643-6.
17. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:605-18.
18. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(1):7-33.

19. Brenner DR, Weir HK, Demers AA, Ellison LF, Louzado C, Shaw A, et al. Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *CMAJ*. 2020;192(9):E199-E205.
20. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet*. 2019;393(10177):1240-53.
21. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(4):284-96.
22. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(2):151-6.
23. Ebell MH, Culp MB, Radke TJ. A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Am J Prev Med*. 2016;50(3):384-94.
24. Kossai M, Leary A, Scoazec JY, Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):41-9.
25. Freimund AE, Beach JA, Christie EL, Bowtell DDL. Mechanisms of Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(6):983-96.
26. Christie EL, Bowtell DDL. Acquired chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl\_8):viii13-viii5.
27. Mittica G, Ghisoni E, Giannone G, Genta S, Aglietta M, Sapino A, et al. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2018;13(4):392-410.
28. Tschernichovsky R, Goodman A. Risk-Reducing Strategies for Ovarian Cancer in BRCA Mutation Carriers: A Balancing Act. *Oncologist*. 2017;22(4):450-9.
29. Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S, et al. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON*. 2018;23(4):862-6.
30. Biller LH, Syngal S, Yurgelun MB. Recent advances in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2019;18(2):211-9.
31. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*. 2009;80(6):609-16.
32. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
33. Ogrodniczak A, Menkiszak J, Gronwald J, Tomiczek-Szwiec J, Szwiec M, Cybulski C, et al. Association of recurrent mutations in BRCA1, BRCA2, RAD51C, PALB2, and CHEK2 with the risk of borderline ovarian tumor. *Hered Cancer Clin Pract*. 2022;20(1):11.
34. Elit L. Familial ovarian cancer. *Can Fam Physician*. 2001;47:778-84.
35. Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;41:3-14.
36. Roach MK, Andreotti RF. The Normal Female Pelvis. *Clin Obstet Gynecol*. 2017;60(1):3-10.
37. Holesh JE, Bass AN, Lord M. Physiology, Ovulation. *StatPearls [Internet]*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2020.
38. Kraggerud SM, Høie-Hansen CE, Alagaratnam S, Skotheim RI, Abeler VM, Rajpert-De Meyts E, et al. Molecular characteristics of malignant ovarian germ cell tumors and comparison with testicular counterparts: implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 2013;34(3):339-76.
39. Williams CJ, Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. Dans: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, rédacteurs. *Endotext [Internet]*. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc.; 2012.
40. King DG. Ovarian Cortex : Southern Illinois University Carbondale; 2021 [2022]. Disponible: <https://histology.siu.edu/erg/RE007b.htm>

41. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:1-9.
42. Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment (PDQ(R)): Patient Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
43. Horta M, Cunha TM. Sex cord-stromal tumors of the ovary: a comprehensive review and update for radiologists. *Diagn Interv Radiol.* 2015;21(4):277-86.
44. Jamieson S, Fuller PJ. Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary. *Endocr Rev.* 2012;33(1):109-44.
45. SCC. Tumeurs cancéreuses de l'ovaire : 2021 [cité le 2021/02/06 2021]. Disponible: <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/ovarian/ovarian-cancer/cancerous-tumours/>
46. Shaaban AM, Rezvani M, Elsayes KM, Baskin H, Jr., Mourad A, Foster BR, et al. Ovarian malignant germ cell tumors: cellular classification and clinical and imaging features. *Radiographics.* 2014;34(3):777-801.
47. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev.* 2017;26(1):55-62.
48. Vang R, Visvanathan K, Gross A, Maambo E, Gupta M, Kuhn E, et al. Validation of an algorithm for the diagnosis of serous tubal intraepithelial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2012;31(3):243-53.
49. Carlson JW, Miron A, Jarboe EA, Parast MM, Hirsch MS, Lee Y, et al. Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4160-5.
50. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(4):695-700.
51. Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(4):280-304.
52. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1053-64.
53. Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL, Wong ST, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;309(7):C444-56.
54. Porcel JM, Diaz JP, Chi DS. Clinical implications of pleural effusions in ovarian cancer. *Respirology.* 2012;17(7):1060-7.
55. Mironov O, Sala E, Mironov S, Pannu H, Chi DS, Hricak H. Thoracic metastasis in advanced ovarian cancer: comparison between computed tomography and video-assisted thoracic surgery. *J Gynecol Oncol.* 2011;22(4):260-8.
56. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27(2):161-74.
57. Liu F, Gao Z, Shen D, Zhao H, Wang C, Ye Y, et al. Significance of SATB2 expression in colon cancer and its differential diagnosis in digestive tract adenocarcinoma and ovarian primary and metastatic carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2019;215(7):152430.

58. Kobel M, Rahimi K, Rambau PF, Naugler C, Le Page C, Meunier L, et al. An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian Carcinoma Typing. *Int J Gynecol Pathol*. 2016;35(5):430-41.
59. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
60. Mittempergher L. Genomic Characterization of High-Grade Serous Ovarian Cancer: Dissecting Its Molecular Heterogeneity as a Road Towards Effective Therapeutic Strategies. *Curr Oncol Rep*. 2016;18(7):44.
61. E Oh, Quartuccio SM, Cheng W, Ahmed RA, King SM, Burdette JE. Mutation or loss of p53 differentially modifies TGFbeta action in ovarian cancer. *PLoS One*. 2014;9(2):e89553.
62. Silwal-Pandit L, Langerod A, Borresen-Dale AL. TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(1).
63. Yamulla RJ, Nalubola S, Flesken-Nikitin A, Nikitin AY, Schimenti JC. Most Commonly Mutated Genes in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Are Nonessential for Ovarian Surface Epithelial Stem Cell Transformation. *Cell Rep*. 2020;32(9):108086.
64. Acs G, Pasha T, Zhang PJ. WT1 is differentially expressed in serous, endometrioid, clear cell, and mucinous carcinomas of the peritoneum, fallopian tube, ovary, and endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. 2004;23(2):110-8.
65. Ramalingam P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2016;30(2):166-76.
66. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, Chow C, Salamanca C, Prentice LM, et al. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PLoS One*. 2013;8(9):e72162.
67. Slomovitz B, Gourley C, Carey MS, Malpica A, Shih IM, Huntsman D, et al. Low-grade serous ovarian cancer: State of the science. *Gynecol Oncol*. 2020;156(3):715-25.
68. Morice P, Gouy S, Leary A. Mucinous Ovarian Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(13):1256-66.
69. Perren TJ. Mucinous epithelial ovarian carcinoma. *Ann Oncol*. 2016;27 Suppl 1:i53-i7.
70. Ricci F, Affatato R, Carrassa L, Damia G. Recent Insights into Mucinous Ovarian Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
71. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Caramia F, Li J, Rowley SM, et al. Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors. *Genome Med*. 2015;7(1):87.
72. Alshenawy HA, Radi DA. Napsin-A, a Possible Diagnostic Marker for Differentiating Clear Cell Ovarian Carcinoma From Other High-grade Ovarian Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(8):605-10.
73. Kriplani D, Patel MM. Immunohistochemistry: A diagnostic aid in differentiating primary epithelial ovarian tumors and tumors metastatic to the ovary. *South Asian J Cancer*. 2013;2(4):254-8.
74. Yamashita Y, Nagasaka T, Naiki-Ito A, Sato S, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2015;28(1):111-7.
75. Chan KKL, Siu MKY, Jiang YX, Wang JJ, Wang Y, Leung THY, et al. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):606.

76. Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Ronnett BM. Immunohistochemistry for estrogen and progesterone receptors in the distinction of primary and metastatic mucinous tumors in the ovary: an analysis of 124 cases. *Mod Pathol*. 2006;19(1):97-105.
77. Kelemen LE, Kobel M. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemma. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1071-80.
78. Albarracin CT, Jafri J, Montag AG, Hart J, Kuan SF. Differential expression of MUC2 and MUC5AC mucin genes in primary ovarian and metastatic colonic carcinoma. *Hum Pathol*. 2000;31(6):672-7.
79. Strickland S, Wasserman JK, Giassi A, Djordjevic B, Parra-Herran C. Immunohistochemistry in the Diagnosis of Mucinous Neoplasms Involving the Ovary: The Added Value of SATB2 and Biomarker Discovery Through Protein Expression Database Mining. *Int J Gynecol Pathol*. 2016;35(3):191-208.
80. Li Z, Roth R, Rock JB, Lehman A, Marsh WL, Suarez A, et al. Dual Immunostain With SATB2 and CK20 Differentiates Appendiceal Mucinous Neoplasms From Ovarian Mucinous Neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(5):484-91.
81. Fujiwara K, Shintani D, Nishikawa T. Clear-cell carcinoma of the ovary. *Ann Oncol*. 2016;27 Suppl 1:i50-i2.
82. Khalique S, Lord CJ, Banerjee S, Natrajan R. Translational genomics of ovarian clear cell carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2020;61:121-31.
83. Takeda T, Banno K, Okawa R, Yanokura M, Iijima M, Irie-Kunitomi H, et al. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review). *Oncol Rep*. 2016;35(2):607-13.
84. Kuroda T, Kohno T. Precision medicine for ovarian clear cell carcinoma based on gene alterations. *Int J Clin Oncol*. 2020;25(3):419-24.
85. Bartosch C, Manuel Lopes J, Oliva E. Endometrial carcinomas: a review emphasizing overlapping and distinctive morphological and immunohistochemical features. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(6):415-37.
86. Cameron RI, Ashe P, O'Rourke DM, Foster H, McCluggage WG. A panel of immunohistochemical stains assists in the distinction between ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2003;22(3):272-6.
87. Ohta Y, Suzuki T, Shiokawa A, Mitsuya T, Ota H. Expression of CD10 and cytokeratins in ovarian and renal clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2005;24(3):239-45.
88. Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, et al. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int J Gynecol Pathol*. 2019;38 Suppl 1:S40-S63.
89. Cybulska P, Paula ADC, Tseng J, Leitao MM, Jr., Bashashati A, Huntsman DG, et al. Molecular profiling and molecular classification of endometrioid ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2019;154(3):516-23.
90. Pierson WE, Peters PN, Chang MT, Chen LM, Quigley DA, Ashworth A, et al. An integrated molecular profile of endometrioid ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2020;157(1):55-61.
91. Hollis RL, Thomson JP, Stanley B, Churchman M, Meynert AM, Rye T, et al. Molecular stratification of endometrioid ovarian carcinoma predicts clinical outcome. *Nat Commun*. 2020;11(1):4995.

92. McConechy MK, Ding J, Senz J, Yang W, Melnyk N, Tone AA, et al. Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Mod Pathol.* 2014;27(1):128-34.
93. Sieh W, Kobel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol.* 2013;14(9):853-62.
94. Brodeur MN, Simeone K, Leclerc-Deslauniers K, Fleury H, Carmona E, Provencher DM, et al. Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer: comparison of 2D monolayers, spheroids, ex vivo tumors and in vivo models. *Sci Rep.* 2021;11(1):18183.
95. Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, Drost J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* 2019;38(15):e101654.
96. Lohmussaar K, Boretto M, Clevers H. Human-Derived Model Systems in Gynecological Cancer Research. *Trends Cancer.* 2020;6(12):1031-43.
97. Simeone K, Guay-Lord R, Lateef MA, Peant B, Kendall-Dupont J, Orimoto AM, et al. Paraffin-embedding lithography and micro-dissected tissue micro-arrays: tools for biological and pharmacological analysis of ex vivo solid tumors. *Lab Chip.* 2019;19(4):693-705.
98. Wimsatt JH, Montgomery C, Thomas LS, Savard C, Tallman R, Innes K, et al. Assessment of a mouse xenograft model of primary colorectal cancer with special reference to perfluorooctane sulfonate. *PeerJ.* 2018;6:e5602.
99. Chen C, Lin W, Huang Y, Chen X, Wang H, Teng L. The Essential Factors of Establishing Patient-derived Tumor Model. *J Cancer.* 2021;12(1):28-37.
100. Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells.* 2019;8(8).
101. Peille AL, Vuaroqueaux V, Wong SS, Ting J, Klingner K, Zeitouni B, et al. Evaluation of molecular subtypes and clonal selection during establishment of patient-derived tumor xenografts from gastric adenocarcinoma. *Commun Biol.* 2020;3(1):367.
102. Chaudary N, Pintilie M, Schwock J, Dhani N, Clarke B, Milosevic M, et al. Characterization of the Tumor-Microenvironment in Patient-Derived Cervix Xenografts (OCICx). *Cancers (Basel).* 2012;4(3):821-45.
103. Nishida-Aoki N, Bondesson AJ, Gujral TS. Measuring Real-time Drug Response in Organotypic Tumor Tissue Slices. *J Vis Exp.* 2020(159).
104. Holliday DL, Moss MA, Pollock S, Lane S, Shaaban AM, Millican-Slater R, et al. The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models. *J Clin Pathol.* 2013;66(3):253-5.
105. Pennington K, Chu QD, Curiel DT, Li BD, Mathis JM. The utility of a tissue slice model system to determine breast cancer infectivity by oncolytic adenoviruses. *J Surg Res.* 2010;163(2):270-5.
106. Dorrigiv D, Simeone K, Communal L, Kendall-Dupont J, St-Georges-Robillard A, Peant B, et al. Microdissected Tissue vs Tissue Slices-A Comparative Study of Tumor Explant Models Cultured On-Chip and Off-Chip. *Cancers (Basel).* 2021;13(16).
107. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc.* 2020;15(10):3380-409.
108. Nanki Y, Chiyoda T, Hirasawa A, Ookubo A, Itoh M, Ueno M, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. *Sci Rep.* 2020;10(1):12581.

109. Theriault BL, Portelance L, Mes-Masson AM, Nachtigal MW. Establishment of primary cultures from ovarian tumor tissue and ascites fluid. *Methods Mol Biol.* 2013;1049:323-36.
110. Paskal W, Paskal AM, Debski T, Gryziak M, Jaworowski J. Aspects of Modern Biobank Activity - Comprehensive Review. *Pathol Oncol Res.* 2018;24(4):771-85.
111. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel).* 2019;11(8).
112. Letourneau IJ, Quinn MC, Wang LL, Portelance L, Caceres KY, Cyr L, et al. Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2012;12:379.
113. Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int.* 2013;37(10):1038-45.
114. Li S, Zhang Z, Han L. Molecular Treasures of Cancer Cell Lines. *Trends Mol Med.* 2019;25(8):657-9.
115. Sato S, Rancourt A, Sato Y, Satoh MS. Single-cell lineage tracking analysis reveals that an established cell line comprises putative cancer stem cells and their heterogeneous progeny. *Sci Rep.* 2016;6:23328.
116. Rolver MG, Elingaard-Larsen LO, Pedersen SF. Assessing Cell Viability and Death in 3D Spheroid Cultures of Cancer Cells. *J Vis Exp.* 2019(148).
117. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1977;59(1):221-6.
118. Breen L, Keenan J, Clynes M. Generation of lung cancer cell line variants by drug selection or cloning. *Methods Mol Biol.* 2011;731:125-33.
119. Wen Y, Hou Y, Yi X, Sun S, Guo J, He X, et al. EZH2 activates CHK1 signaling to promote ovarian cancer chemoresistance by maintaining the properties of cancer stem cells. *Theranostics.* 2021;11(4):1795-813.
120. Poulain L, Ziller C, Muller CD, Erbacher P, Bettinger T, Rodier JF, et al. Ovarian carcinoma cells are effectively transfected by polyethylenimine (PEI) derivatives. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(4):644-52.
121. McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol.* 2014;4:40.
122. Staff PO. Correction: Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One.* 2015;10(3):e0122284.
123. Hernandez L, Kim MK, Lyle LT, Bunch KP, House CD, Ning F, et al. Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol Oncol.* 2016;142(2):332-40.
124. Fleury H, Communal L, Carmona E, Portelance L, Arcand SL, Rahimi K, et al. Novel high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines that reflect the molecular diversity of both the sporadic and hereditary disease. *Genes Cancer.* 2015;6(9-10):378-98.
125. Ouellet V, Zietarska M, Portelance L, Lafontaine J, Madore J, Puiffe ML, et al. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2008;8:152.
126. Bezdieniezhykh N, Lykhova A, Semesiuk N, Okhrimenko R, Kudryavets Y. Establishment and characterization of new breast and ovarian cancer cell lines as a model for studying cellular plasticity in vitro. *Exp Oncol.* 2016;38(2):94-100.

127. Kreuzinger C, Gamperl M, Wolf A, Heinze G, Geroldinger A, Lambrechts D, et al. Molecular characterization of 7 new established cell lines from high grade serous ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2015;362(2):218-28.
128. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun.* 2013;4:2126.
129. Gallardo-Rincon D, Espinosa-Romero R, Munoz WR, Mendoza-Martinez R, Villar-Alvarez SD, Onate-Ocana L, et al. Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of epithelial ovarian cancer in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2016;58(2):302-8.
130. Longo DL, Young RC. The natural history and treatment of ovarian cancer. *Annu Rev Med.* 1981;32:475-90.
131. Amram-Benamran M-L, Cochet S, Sappino A-P, Petignat P. Dépistage du cancer de l'ovaire : recommandations pour la pratique clinique. *Rev Med Suisse.* 2010;6:1062-8.
132. Can Ovarian Cancer Be Found Early? : American Cancer Society; 2020 [modifié le 2020/07/24; cité le 2021/02/06 2021]. Disponible: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html>
133. Lynch Syndrome : Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2020 [modifié le 2020/01/15; cité le 2021/02/06 2021]. Disponible: [https://www.cdc.gov/genomics/disease/colorectal\\_cancer/lynch.htm](https://www.cdc.gov/genomics/disease/colorectal_cancer/lynch.htm)
134. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res.* 2019;12(1):28.
135. Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF. Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA.* 2018;319(6):595-606.
136. Zhao T, Hu W. CA125 and HE4: Measurement Tools for Ovarian Cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2016;81(5):430-5.
137. Muyldermans M, Cornillie FJ, Koninckx PR. CA125 and endometriosis. *Hum Reprod Update.* 1995;1(2):173-87.
138. Li J, Dowdy S, Tipton T, Podratz K, Lu WG, Xie X, et al. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(6):555-66.
139. Chen D, Wu Y, Tilley RD, Gooding JJ. Rapid and ultrasensitive electrochemical detection of DNA methylation for ovarian cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2022;206:114126.
140. Gunderson CC, Radhakrishnan R, Gomathinayagam R, Husain S, Aravindan S, Moore KM, et al. Circulating Tumor Cell-Free DNA Genes as Prognostic Gene Signature for Platinum Resistant Ovarian Cancer Diagnosis. *Biomark Insights.* 2022;17:11772719221088404.
141. Jou HJ, Ling PY, Hsu HT. Circulating tumor cells as a "real-time liquid biopsy": Recent advances and the application in ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2022;61(1):34-9.
142. Marinelli LM, Kisiel JB, Slettedahl SW, Mahoney DW, Lemens MA, Shridhar V, et al. Methylated DNA markers for plasma detection of ovarian cancer: Discovery, validation, and clinical feasibility. *Gynecol Oncol.* 2022.
143. Gao Y, Zeng S, Xu X, Li H, Yao S, Song K, et al. Deep learning-enabled pelvic ultrasound images for accurate diagnosis of ovarian cancer in China: a retrospective, multicentre, diagnostic study. *Lancet Digit Health.* 2022;4(3):e179-e87.



144. Piver MS. Treatment of ovarian cancer at the crossroads: 50 years after single-agent melphalan chemotherapy. *Oncology (Williston Park)*. 2006;20(10):1156-8.
145. Burns BC, Jr., Rutledge F, Gallager HS. Phenylalanine mustard in the palliative management of carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol*. 1963;22:30-7.
146. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.
147. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, et al. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med*. 1989;111(4):273-9.
148. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1996;334(1):1-6.
149. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2003;21(17):3194-200.
150. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):573-84.
151. du Bois A, Luck HJ, Meier W, Adams HP, Mobus V, Costa S, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(17):1320-9.
152. Takaya H, Nakai H, Takamatsu S, Mandai M, Matsumura N. Homologous recombination deficiency status-based classification of high-grade serous ovarian carcinoma. *Sci Rep*. 2020;10(1):2757.
153. Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, et al. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol*. 2008;26(34):5530-6.
154. Luvero D, Plotti F, Aloisia A, Montera R, Terranova C, Carlo De Cicco N, et al. Ovarian cancer relapse: From the latest scientific evidence to the best practice. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;140:28-38.
155. Colombo N, Conte PF, Pignata S, Raspagliesi F, Scambia G. Bevacizumab in ovarian cancer: Focus on clinical data and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:335-48.
156. Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(6):943-64.
157. Kim G, Ison G, McKee AE, Zhang H, Tang S, Gwise T, et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(19):4257-61.
158. Ison G, Howie LJ, Amiri-Kordestani L, Zhang L, Tang S, Sridhara R, et al. FDA Approval Summary: Niraparib for the Maintenance Treatment of Patients with Recurrent Ovarian Cancer in Response to Platinum-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(17):4066-71.
159. Balasubramaniam S, Beaver JA, Horton S, Fernandes LL, Tang S, Horne HN, et al. FDA Approval Summary: Rucaparib for the Treatment of Patients with Deleterious BRCA Mutation-Associated Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(23):7165-70.

160. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;81(1):17-38.
161. Boussios S, Abson C, Moschetta M, Rassy E, Karathanasi A, Bhat T, et al. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Talazoparib in Ovarian Cancer and Beyond. *Drugs R D.* 2020;20(2):55-73.
162. Hoy SM. Talazoparib: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(18):1939-46.
163. Wu X, Zhu J, Wang J, Lin Z, Yin R, Sun W, et al. Pamiparib Monotherapy for Patients with Germline BRCA1/2-Mutated Ovarian Cancer Previously Treated with at Least Two Lines of Chemotherapy: A Multicenter, Open-Label, Phase II Study. *Clin Cancer Res.* 2022;28(4):653-61.
164. Wang W, Liu JR, Zou W. Immunotherapy in Ovarian Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2019;28(3):447-64.
165. Le Saux O, Dubois B, Stern MH, Terme M, Tartour E, Classe JM, et al. [Current advances in immunotherapy in ovarian cancer]. *Bull Cancer.* 2020;107(4):465-73.
166. Borella F, Ghisoni E, Giannone G, Cosma S, Benedetto C, Valabrega G, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Epithelial Ovarian Cancer: An Overview on Efficacy and Future Perspectives. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(3).
167. Zamarin D, Burger RA, Sill MW, Powell DJ, Jr., Lankes HA, Feldman MD, et al. Randomized Phase II Trial of Nivolumab Versus Nivolumab and Ipilimumab for Recurrent or Persistent Ovarian Cancer: An NRG Oncology Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(16):1814-23.
168. O'Malley DM, Matulonis UA, Birrer MJ, Castro CM, Gilbert L, Vergote I, et al. Phase Ib study of mirvetuximab soravtansine, a folate receptor alpha (FRalpha)-targeting antibody-drug conjugate (ADC), in combination with bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2020;157(2):379-85.
169. Kalli KR, Block MS, Kasi PM, Erskine CL, Hobday TJ, Dietz A, et al. Folate Receptor Alpha Peptide Vaccine Generates Immunity in Breast and Ovarian Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2018;24(13):3014-25.
170. Birrer MJ, Betella I, Martin LP, Moore KN. Is Targeting the Folate Receptor in Ovarian Cancer Coming of Age? *Oncologist.* 2019;24(4):425-9.
171. Mallmann-Gottschalk N, Sax Y, Kimmig R, Lang S, Brandau S. EGFR-Specific Tyrosine Kinase Inhibitor Modifies NK Cell-Mediated Antitumoral Activity against Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
172. Wilken JA, Badri T, Cross S, Raji R, Santin AD, Schwartz P, et al. EGFR/HER-targeted therapeutics in ovarian cancer. *Future Med Chem.* 2012;4(4):447-69.
173. Xu L, Wu H, Jiang C, Wang H, Gao B, Yan S, et al. Dacomitinib, a new pan-EGFR inhibitor, is effective in killing ovarian cancer cells. *Discov Med.* 2016;22(122):297-309.
174. Leijen S, van Geel RM, Sonke GS, de Jong D, Rosenberg EH, Marchetti S, et al. Phase II Study of WEE1 Inhibitor AZD1775 Plus Carboplatin in Patients With TP53-Mutated Ovarian Cancer Refractory or Resistant to First-Line Therapy Within 3 Months. *J Clin Oncol.* 2016;34(36):4354-61.
175. Parmar K, Kochupurakkal BS, Lazaro JB, Wang ZC, Palakurthi S, Kirschmeier PT, et al. The CHK1 Inhibitor Prexasertib Exhibits Monotherapy Activity in High-Grade Serous Ovarian Cancer Models and Sensitizes to PARP Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2019;25(20):6127-40.
176. Kong A, Mehanna H. WEE1 Inhibitor: Clinical Development. *Curr Oncol Rep.* 2021;23(9):107.

177. Thibault B, Genre L, Le Naour A, Broca C, Mery E, Vuagniaux G, et al. DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses carboplatin resistance in ovarian cancer cells and triggers apoptotic or necroptotic cell death. *Sci Rep*. 2018;8(1):17862.
178. Binju M, Amaya-Padilla MA, Wan G, Gunosewoyo H, Suryo Rahmanto Y, Yu Y. Therapeutic Inducers of Apoptosis in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11).
179. Fleury H, Malaquin N, Tu V, Gilbert S, Martinez A, Olivier MA, et al. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nat Commun*. 2019;10(1):2556.
180. Lee EK, Konstantinopoulos PA. Combined PARP and Immune Checkpoint Inhibition in Ovarian Cancer. *Trends Cancer*. 2019;5(9):524-8.
181. Mirza MR, Avall Lundqvist E, Birrer MJ, dePont Christensen R, Nyvang GB, Malander S, et al. Niraparib plus bevacizumab versus niraparib alone for platinum-sensitive recurrent ovarian cancer (NSGO-AVANOVA2/ENGOT-ov24): a randomised, phase 2, superiority trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(10):1409-19.
182. Garcia-Martinez E, Redondo A, Piulats JM, Rodriguez A, Casado A. Are antiangiogenics a good 'partner' for immunotherapy in ovarian cancer? *Angiogenesis*. 2020;23(4):543-57.
183. Nimeiri HS, Oza AM, Morgan RJ, Friberg G, Kasza K, Faoro L, et al. Efficacy and safety of bevacizumab plus erlotinib for patients with recurrent ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancer: a trial of the Chicago, PMH, and California Phase II Consortia. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):49-55.
184. Boussios S, Karihtala P, Moschetta M, Karathanasi A, Sadauskaite A, Rassy E, et al. Combined Strategies with Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors for the Treatment of Ovarian Cancer: A Literature Review. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(3).
185. Barber HR, Kwon TH. Current status of the treatment of gynecologic cancer by site: ovary. *Cancer*. 1976;38(1 SUPPL):610-9.
186. Barber HR. Ovarian cancer. *CA Cancer J Clin*. 1986;36(3):149-84.
187. Doubeni CA, Doubeni AR, Myers AE. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*. 2016;93(11):937-44.
188. Marth C, Reimer D, Zeimet AG. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl\_8):viii36-viii9.
189. Lazarevic T, Rilak A, Bugarcic ZD. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem*. 2017;142:8-31.
190. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25(18):2677-81.
191. Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Barroilhet L, Behbakht K, Berchuck A, et al. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(2):191-226.
192. Conte C, Fagotti A, Avesani G, Trombadori C, Federico A, D'Indinosante M, et al. Update on the secondary cytoreduction in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a narrative review. *Ann Transl Med*. 2021;9(6):510.
193. Jiang C, Li Z. Prediction Models for Complete Resection in Secondary Cytoreductive Surgery of Patients With Recurrent Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:674637.
194. Chua TC, Liauw W, Robertson G, Morris DL. Second-line treatment of first relapse recurrent ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2010;50(5):465-71.

195. Berg T, Nottrup TJ, Roed H. Gemcitabine for recurrent ovarian cancer - a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2019;155(3):530-7.
196. Green AE, Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):229-39.
197. Lihua P, Chen XY, Wu TX. Topotecan for ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(2):CD005589.
198. Purnell MR, Whish WJ. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J.* 1980;185(3):775-7.
199. Drew Y. The development of PARP inhibitors in ovarian cancer: from bench to bedside. *Br J Cancer.* 2015;113 Suppl 1:S3-9.
200. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005;434(7035):917-21.
201. Nizialek E, Antonarakis ES. PARP Inhibitors in Metastatic Prostate Cancer: Evidence to Date. *Cancer Manag Res.* 2020;12:8105-14.
202. Serzan MT, Farid S, Liu SV. Drugs in development for small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2020;12(10):6298-307.
203. Zhu H, Wei M, Xu J, Hua J, Liang C, Meng Q, et al. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer.* 2020;19(1):49.
204. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004;26(8):882-93.
205. Li N, Chen J. ADP-ribosylation: activation, recognition, and removal. *Mol Cells.* 2014;37(1):9-16.
206. Barkauskaite E, Jankevicius G, Ahel I. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Mol Cell.* 2015;58(6):935-46.
207. Ummarino S, Hausman C, Di Ruscio A. The PARP Way to Epigenetic Changes. *Genes (Basel).* 2021;12(3).
208. Palazzo L, Mikolcevic P, Mikoc A, Ahel I. ADP-ribosylation signalling and human disease. *Open Biol.* 2019;9(4):190041.
209. Vyas S, Matic I, Uchima L, Rood J, Zaja R, Hay RT, et al. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat Commun.* 2014;5:4426.
210. Thorsell AG, Ekblad T, Karlberg T, Low M, Pinto AF, Tresaugues L, et al. Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors. *J Med Chem.* 2017;60(4):1262-71.
211. Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 2012;26(5):417-32.
212. Ali AAE, Timinszky G, Arribas-Bosacoma R, Kozlowski M, Hassa PO, Hassler M, et al. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(7):685-92.
213. Loeffler PA, Cuneo MJ, Mueller GA, DeRose EF, Gabel SA, London RE. Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Struct Biol.* 2011;11:37.
214. Dawicki-McKenna JM, Langelier MF, DeNizio JE, Riccio AA, Cao CD, Karch KR, et al. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain. *Mol Cell.* 2015;60(5):755-68.

215. Kouyama K, Mayanagi K, Nakae S, Nishi Y, Miwa M, Shirai T. Single-particle analysis of full-length human poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Biophys Physicobiol.* 2019;16:59-67.
216. Schreiber V, Molinete M, Boeuf H, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.* 1992;11(9):3263-9.
217. Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science.* 2012;336(6082):728-32.
218. Cohen MS. Interplay between compartmentalized NAD(+) synthesis and consumption: a focus on the PARP family. *Genes Dev.* 2020;34(5-6):254-62.
219. Miranda EA, Dantzer F, O'Farrell M, de Murcia G, de Murcia JM. Characterisation of a gain-of-function mutant of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212(2):317-25.
220. Rudolph J, Roberts G, Muthurajan UM, Luger K. HPF1 and nucleosomes mediate a dramatic switch in activity of PARP1 from polymerase to hydrolase. *Elife.* 2021;10.
221. Alessova EE, Lavrik OI. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):3811-27.
222. Kruger A, Burkle A, Hauser K, Mangerich A. Real-time monitoring of PARP1-dependent PARylation by ATR-FTIR spectroscopy. *Nat Commun.* 2020;11(1):2174.
223. Aberle L, Kruger A, Reber JM, Lippmann M, Hufnagel M, Schmalz M, et al. PARP1 catalytic variants reveal branching and chain length-specific functions of poly(ADP-ribose) in cellular physiology and stress response. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(18):10015-33.
224. Harrision D, Gravells P, Thompson R, Bryant HE. Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) vs. Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) - Function in Genome Maintenance and Relevance of Inhibitors for Anti-cancer Therapy. *Front Mol Biosci.* 2020;7:191.
225. Bonicalzi ME, Haince JF, Droit A, Poirier GG. Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when? *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(7-8):739-50.
226. Ahel I, Ahel D, Matsusaka T, Clark AJ, Pines J, Boulton SJ, et al. Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature.* 2008;451(7174):81-5.
227. Heale JT, Ball AR, Jr., Schmiesing JA, Kim JS, Kong X, Zhou S, et al. Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell.* 2006;21(6):837-48.
228. Huambachano O, Herrera F, Rancourt A, Satoh MS. Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7149-60.
229. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(10):610-21.
230. Woodhouse BC, Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(7):1077-86.
231. Jungmichel S, Rosenthal F, Altmeyer M, Lukas J, Hottiger MO, Nielsen ML. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol Cell.* 2013;52(2):272-85.
232. Ronson GE, Piberger AL, Higgs MR, Olsen AL, Stewart GS, McHugh PJ, et al. PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nat Commun.* 2018;9(1):746.

233. Prasad R, Dyrkheeva N, Williams J, Wilson SH. Mammalian Base Excision Repair: Functional Partnership between PARP-1 and APE1 in AP-Site Repair. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124269.
234. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a012583.
235. Abbotts R, Wilson DM, 3rd. Coordination of DNA single strand break repair. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:228-44.
236. Pines A, Vrouwe MG, Marteiijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M, et al. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J Cell Biol*. 2012;199(2):235-49.
237. Hsu PC, Gopinath RK, Hsueh YA, Shieh SY. CHK2-mediated regulation of PARP1 in oxidative DNA damage response. *Oncogene*. 2019;38(8):1166-82.
238. Liu Y, Kadyrov FA, Modrich P. PARP-1 enhances the mismatch-dependence of 5'-directed excision in human mismatch repair in vitro. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10(11):1145-53.
239. Spagnolo L, Barbeau J, Curtin NJ, Morris EP, Pearl LH. Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(9):4168-77.
240. Caron MC, Sharma AK, O'Sullivan J, Myler LR, Ferreira MT, Rodrigue A, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nat Commun*. 2019;10(1):2954.
241. Helleday T, Bryant HE, Schultz N. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*. 2005;4(9):1176-8.
242. Schultz N, Lopez E, Saleh-Gohari N, Helleday T. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(17):4959-64.
243. Hahm JY, Kang JY, Park JW, Jung H, Seo SB. Methylated-UHRF1 and PARP1 interaction is critical for homologous recombination. *BMB Rep*. 2020;53(2):112-7.
244. Hu Y, Petit SA, Ficarro SB, Toomire KJ, Xie A, Lim E, et al. PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer Discov*. 2014;4(12):1430-47.
245. Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol Cancer Res*. 2014;12(8):1069-80.
246. Huang D, Yang CZ, Yao L, Wang Y, Liao YH, Huang K. Activation and overexpression of PARP-1 in circulating mononuclear cells promote TNF-alpha and IL-6 expression in patients with unstable angina. *Arch Med Res*. 2008;39(8):775-84.
247. Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell*. 2003;113(6):677-83.
248. Rosado MM, Bennici E, Novelli F, Pioli C. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. *Immunology*. 2013;139(4):428-37.
249. Lin Y, Tang X, Zhu Y, Shu T, Han X. Identification of PARP-1 as one of the transcription factors binding to the repressor element in the promoter region of COX-2. *Arch Biochem Biophys*. 2011;505(1):123-9.
250. Boamah EK, Kotova E, Garabedian M, Jarnik M, Tulin AV. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli. *PLoS Genet*. 2012;8(1):e1002442.
251. Engbrecht M, Mangerich A. The Nucleolus and PARP1 in Cancer Biology. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7).

252. Veith S, Schink A, Engbrecht M, Mack M, Rank L, Rossatti P, et al. PARP1 regulates DNA damage-induced nucleolar-nucleoplasmic shuttling of WRN and XRCC1 in a toxicant and protein-specific manner. *Sci Rep.* 2019;9(1):10075.
253. Vyas S, Chesarone-Cataldo M, Todorova T, Huang YH, Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun.* 2013;4:2240.
254. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, et al. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2021;296:100046.
255. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 2019;29(5):347-64.
256. Mishchenko T, Balalaeva I, Gorokhova A, Vedunova M, Krysko DV. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death Dis.* 2022;13(5):455.
257. Kadam A, Jubin T, Roychowdhury R, Begum R. Role of PARP-1 in mitochondrial homeostasis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020;1864(10):129669.
258. Rossi MN, Carbone M, Mostocotto C, Mancone C, Tripodi M, Maione R, et al. Mitochondrial localization of PARP-1 requires interaction with mitofilin and is involved in the maintenance of mitochondrial DNA integrity. *J Biol Chem.* 2009;284(46):31616-24.
259. Szczesny B, Brunyanski A, Olah G, Mitra S, Szabo C. Opposing roles of mitochondrial and nuclear PARP1 in the regulation of mitochondrial and nuclear DNA integrity: implications for the regulation of mitochondrial function. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(21):13161-73.
260. Xu Y, Huang S, Liu ZG, Han J. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8788-95.
261. Brunyanski A, Olah G, Coletta C, Szczesny B, Szabo C. Regulation of mitochondrial poly(ADP-Ribose) polymerase activation by the beta-adrenoceptor/cAMP/protein kinase A axis during oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 2014;86(4):450-62.
262. Kadam A, Jubin T, Roychowdhury R, Garg A, Parmar N, Palit SP, et al. Insights into the functional aspects of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in mitochondrial homeostasis in *Dictyostelium discoideum*. *Biol Cell.* 2020;112(8):222-37.
263. Billingham LK, Chandel NS. NAD-biosynthetic pathways regulate innate immunity. *Nat Immunol.* 2019;20(4):380-2.
264. Verdin E. NAD(+) in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science.* 2015;350(6265):1208-13.
265. Ye C, Qi L, Li X, Wang J, Yu J, Zhou B, et al. Targeting the NAD(+) salvage pathway suppresses APC mutation-driven colorectal cancer growth and Wnt/beta-catenin signaling via increasing Axin level. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):16.
266. Kuribayashi H, Baba Y, Iwagawa T, Arai E, Murakami A, Watanabe S. Roles of Nmnat1 in the survival of retinal progenitors through the regulation of pro-apoptotic gene expression via histone acetylation. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):891.
267. Jayaram HN, Kusumanchi P, Yalowitz JA. NMNAT expression and its relation to NAD metabolism. *Curr Med Chem.* 2011;18(13):1962-72.

268. Mayer PR, Huang N, Dewey CM, Dries DR, Zhang H, Yu G. Expression, localization, and biochemical characterization of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2. *J Biol Chem.* 2010;285(51):40387-96.
269. Yue Z, Ma Y, You J, Li Z, Ding Y, He P, et al. NMNAT3 is involved in the protective effect of SIRT3 in Ang II-induced cardiac hypertrophy. *Exp Cell Res.* 2016;347(2):261-73.
270. Cambronne XA, Kraus WL. Location, Location, Location: Compartmentalization of NAD(+) Synthesis and Functions in Mammalian Cells. *Trends Biochem Sci.* 2020;45(10):858-73.
271. Stein LR, Imai S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):420-8.
272. Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, Verdin E. NAD(+) metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):119-41.
273. Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(3):251-72.
274. Sultani G, Samsudeen AF, Osborne B, Turner N. NAD(+) : A key metabolic regulator with great therapeutic potential. *J Neuroendocrinol.* 2017;29(10).
275. Madeira VMC. Overview of Mitochondrial Bioenergetics. *Methods Mol Biol.* 2018;1782:1-6.
276. Iyanagi T. Molecular mechanism of metabolic NAD(P)H-dependent electron-transfer systems: The role of redox cofactors. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2019;1860(3):233-58.
277. Dominguez-Gomez G, Diaz-Chavez J, Chavez-Blanco A, Gonzalez-Fierro A, Jimenez-Salazar JE, Damian-Matsumura P, et al. Nicotinamide sensitizes human breast cancer cells to the cytotoxic effects of radiation and cisplatin. *Oncol Rep.* 2015;33(2):721-8.
278. Zhang XM, Jing YP, Jia MY, Zhang L. Negative transcriptional regulation of inflammatory genes by group B3 vitamin nicotinamide. *Mol Biol Rep.* 2012;39(12):10367-71.
279. Pramono AA, Rather GM, Herman H, Lestari K, Bertino JR. NAD- and NADPH-Contributing Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer: An Overview. *Biomolecules.* 2020;10(3).
280. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990;250(4988):1684-9.
281. Maxwell KN, Domchek SM, Nathanson KL, Robson ME. Population Frequency of Germline BRCA1/2 Mutations. *J Clin Oncol.* 2016;34(34):4183-5.
282. Tonin PN. [The limited spectrum of pathogenic BRCA1 and BRCA2 mutations in the French Canadian breast and breast-ovarian cancer families, a founder population of Quebec, Canada]. *Bull Cancer.* 2006;93(9):841-6.
283. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 1997;336(20):1401-8.
284. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005;434(7035):913-7.
285. Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol.* 2011;5(4):387-93.
286. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 2012;72(21):5588-99.



287. Mateo J, Lord CJ, Serra V, Tutt A, Balmana J, Castroviejo-Bermejo M, et al. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Ann Oncol.* 2019;30(9):1437-47.
288. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376(9737):245-51.
289. Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, Ang JE, Gourley C, Karlan BY, et al. Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(4):372-9.
290. Foo T, George A, Banerjee S. PARP inhibitors in ovarian cancer: An overview of the practice-changing trials. *Genes Chromosomes Cancer.* 2021;60(5):385-97.
291. Musella A, Bardhi E, Marchetti C, Vertechy L, Santangelo G, Sassu C, et al. Rucaparib: An emerging parp inhibitor for treatment of recurrent ovarian cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;66:7-14.
292. Morice PM, Leary A, Dolladille C, Chretien B, Poulain L, Gonzalez-Martin A, et al. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia in patients treated with PARP inhibitors: a safety meta-analysis of randomised controlled trials and a retrospective study of the WHO pharmacovigilance database. *Lancet Haematol.* 2021;8(2):e122-e34.
293. Banerjee S, Gonzalez-Martin A, Harter P, Lorusso D, Moore KN, Oaknin A, et al. First-line PARP inhibitors in ovarian cancer: summary of an ESMO Open - Cancer Horizons round-table discussion. *ESMO Open.* 2020;5(6):e001110.
294. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1382-92.
295. Ledermann JA, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(11):1579-89.
296. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(2):110-20.
297. Hodgson DR, Dougherty BA, Lai Z, Fielding A, Grinsted L, Spencer S, et al. Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes. *Br J Cancer.* 2018;119(11):1401-9.
298. Fleury H, Carmona E, Morin VG, Meunier L, Masson JY, Tonin PN, et al. Cumulative defects in DNA repair pathways drive the PARP inhibitor response in high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017;8(25):40152-68.
299. Risdon EN, Chau CH, Price DK, Sartor O, Figg WD. PARP Inhibitors and Prostate Cancer: To Infinity and Beyond BRCA. *Oncologist.* 2021;26(1):e115-e29.
300. Pilie PG, Gay CM, Byers LA, O'Connor MJ, Yap TA. PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA-Mutant Cancers. *Clin Cancer Res.* 2019;25(13):3759-71.
301. Kurnit KC, Coleman RL, Westin SN. Using PARP Inhibitors in the Treatment of Patients With Ovarian Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2018;19(12):1.
302. Mohyuddin GR, Aziz M, Britt A, Wade L, Sun W, Baranda J, et al. Similar response rates and survival with PARP inhibitors for patients with solid tumors harboring somatic versus Germline BRCA mutations: a Meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer.* 2020;20(1):507.

303. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RH, Sonke GS, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):87-97.
304. McMullen M, Karakasis K, Madariaga A, Oza AM. Overcoming Platinum and PARP-Inhibitor Resistance in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
305. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon AL, Chakravarty P, Scott AL, Bray SE, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer.* 2016;115(4):431-41.
306. Amuzu S, Carmona E, Mes-Masson AM, Greenwood CMT, Tonin PN, Ragoussis J. Candidate Markers of Olaparib Response from Genomic Data Analyses of Human Cancer Cell Lines. *Cancers (Basel).* 2021;13(6).
307. Juhasz S, Smith R, Schauer T, Spekhardt D, Mamar H, Zentout S, et al. The chromatin remodeler ALC1 underlies resistance to PARP inhibitor treatment. *Sci Adv.* 2020;6(51).
308. Verma P, Zhou Y, Cao Z, Deraska PV, Deb M, Arai E, et al. ALC1 links chromatin accessibility to PARP inhibitor response in homologous recombination-deficient cells. *Nat Cell Biol.* 2021;23(2):160-71.
309. Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang SW, Shen Y, et al. Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget.* 2016;7(47):76534-50.
310. Murai J, Thomas A, Miettinen M, Pommier Y. Schlafen 11 (SLFN11), a restriction factor for replicative stress induced by DNA-targeting anti-cancer therapies. *Pharmacol Ther.* 2019;201:94-102.
311. Jiang X, Li X, Li W, Bai H, Zhang Z. PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms. *J Cell Mol Med.* 2019;23(4):2303-13.
312. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Perol D, Gonzalez-Martin A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2416-28.
313. Liu JF, Barry WT, Birrer M, Lee JM, Buckanovich RJ, Fleming GF, et al. Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1207-14.
314. Lampert EJ, Zimmer A, Padgett M, Cimino-Mathews A, Nair JR, Liu Y, et al. Combination of PARP Inhibitor Olaparib, and PD-L1 Inhibitor Durvalumab, in Recurrent Ovarian Cancer: a Proof-of-Concept Phase II Study. *Clin Cancer Res.* 2020;26(16):4268-79.
315. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;63(1):12-31.
316. Wu H, Chen S, Yu J, Li Y, Zhang XY, Yang L, et al. Single-cell Transcriptome Analyses Reveal Molecular Signals to Intrinsic and Acquired Paclitaxel Resistance in Esophageal Squamous Cancer Cells. *Cancer Lett.* 2018;420:156-67.
317. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell.* 2017;168(4):707-23.
318. Kelderman S, Schumacher TN, Haanen JB. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Mol Oncol.* 2014;8(6):1132-9.
319. Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):38.

320. Alvarez-Fernandez M, Malumbres M. Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition. *Cancer Cell*. 2020;37(4):514-29.
321. Lackner MR, Wilson TR, Settleman J. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol*. 2012;8(8):999-1014.
322. Vyse S, McCarthy F, Broncel M, Paul A, Wong JP, Bhamra A, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of acquired cancer drug resistance to pazopanib and dasatinib. *J Proteomics*. 2018;170:130-40.
323. Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer*. 2020;19(1):107.
324. Kim H, Xu H, George E, Hallberg D, Kumar S, Jagannathan V, et al. Combining PARP with ATR inhibition overcomes PARP inhibitor and platinum resistance in ovarian cancer models. *Nat Commun*. 2020;11(1):3726.
325. Lin KK, Harrell MI, Oza AM, Oaknin A, Ray-Coquard I, Tinker AV, et al. BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer Discov*. 2019;9(2):210-9.
326. Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, Dust S, Stover DG, Chi D, et al. CDK12 Inhibition Reverses De Novo and Acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA Wild-Type and Mutated Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep*. 2016;17(9):2367-81.
327. Tobalina L, Armenia J, Irving E, O'Connor MJ, Forment JV. A meta-analysis of reversion mutations in BRCA genes identifies signatures of DNA end-joining repair mechanisms driving therapy resistance. *Ann Oncol*. 2021;32(1):103-12.
328. Pettitt SJ, Frankum JR, Punta M, Lise S, Alexander J, Chen Y, et al. Clinical BRCA1/2 Reversion Analysis Identifies Hotspot Mutations and Predicted Neoantigens Associated with Therapy Resistance. *Cancer Discov*. 2020;10(10):1475-88.
329. Kim DS, Camacho CV, Kraus WL. Alternate therapeutic pathways for PARP inhibitors and potential mechanisms of resistance. *Exp Mol Med*. 2021;53(1):42-51.
330. Gogola E, Duarte AA, de Ruiter JR, Wiegant WW, Schmid JA, de Bruijn R, et al. Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. *Cancer Cell*. 2018;33(6):1078-93 e12.
331. Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Drean A, Song F, Aleksandrov R, et al. Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat Commun*. 2018;9(1):1849.
332. Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S, Suzuki N, Ohta T, et al. NF-kappaB signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. *Oncotarget*. 2015;6(6):3825-39.
333. Arora S, Balasubramaniam S, Zhang H, Berman T, Narayan P, Suzman D, et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy or in Combination with Bevacizumab for the Maintenance Treatment of Patients with Advanced Ovarian Cancer. *Oncologist*. 2021;26(1):e164-e72.
334. Smith G, Alholm Z, Coleman RL, Monk BJ. DNA Damage Repair Inhibitors-Combination Therapies. *Cancer J*. 2021;27(6):501-5.
335. Lheureux S, Oaknin A, Garg S, Bruce JP, Madariaga A, Dhani NC, et al. EVOLVE: A Multicenter Open-Label Single-Arm Clinical and Translational Phase II Trial of Cediranib Plus Olaparib for Ovarian Cancer after PARP Inhibition Progression. *Clin Cancer Res*. 2020;26(16):4206-15.

336. Domchek SM, Postel-Vinay S, Im SA, Park YH, Delord JP, Italiano A, et al. Olaparib and durvalumab in patients with germline BRCA-mutated metastatic breast cancer (MEDIOLA): an open-label, multicentre, phase 1/2, basket study. *Lancet Oncol.* 2020;21(9):1155-64.
337. Bajrami I, Kigozi A, Van Weverwijk A, Brough R, Frankum J, Lord CJ, et al. Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med.* 2012;4(10):1087-96.
338. Heske CM, Davis MI, Baumgart JT, Wilson K, Gormally MV, Chen L, et al. Matrix Screen Identifies Synergistic Combination of PARP Inhibitors and Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2017;23(23):7301-11.
339. Canada OC. OvCAN Priorities: Major Goals & Progress to Date : 2021 [cité le 2022-01-12]. Disponible: <https://ovariancanada.org/Research/OvCAN-initiative/OvCAN-Priorities>
340. Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tetrault M, Manderson EN, Wang JC, et al. Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36(6):357-61.
341. Kim S, Kim S, Kim J, Kim B, Kim SI, Kim MA, et al. Evaluating Tumor Evolution via Genomic Profiling of Individual Tumor Spheroids in a Malignant Ascites. *Sci Rep.* 2018;8(1):12724.
342. Ford CE, Werner B, Hacker NF, Warton K. The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *Br J Cancer.* 2020;123(1):9-16.
343. Kim S, Kim B, Song YS. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2016;107(9):1173-8.
344. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):273-82.
345. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(5):267-82.
346. Karnezis AN, Chen SY, Chow C, Yang W, Hendricks WPD, Ramos P, et al. Re-assigning the histologic identities of COV434 and TOV-112D ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol.* 2021;160(2):568-78.
347. Tonin PN, Hudson TJ, Rodier F, Bossolasco M, Lee PD, Novak J, et al. Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene.* 2001;20(45):6617-26.
348. Hanrahan AJ, Schultz N, Westfal ML, Sakr RA, Giri DD, Scarperi S, et al. Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2012;2(1):56-67.
349. Kannan K, Coarfa C, Rajapakshe K, Hawkins SM, Matzuk MM, Milosavljevic A, et al. CDKN2D-WDFY2 is a cancer-specific fusion gene recurrent in high-grade serous ovarian carcinoma. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004216.
350. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One.* 2014;9(9):e103988.
351. Medrano M, Communal L, Brown KR, Iwanicki M, Normand J, Paterson J, et al. Interrogation of Functional Cell-Surface Markers Identifies CD151 Dependency in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell Rep.* 2017;18(10):2343-58.

352. Papp E, Hallberg D, Konecny GE, Bruhm DC, Adleff V, Noe M, et al. Integrated Genomic, Epigenomic, and Expression Analyses of Ovarian Cancer Cell Lines. *Cell Rep.* 2018;25(9):2617-33.
353. Qi G, Ma H, Li Y, Peng J, Chen J, Kong B. TTK inhibition increases cisplatin sensitivity in high-grade serous ovarian carcinoma through the mTOR/autophagy pathway. *Cell Death Dis.* 2021;12(12):1135.
354. Bourgeois DL, Kabarowski KA, Porubsky VL, Kreeger PK. High-grade serous ovarian cancer cell lines exhibit heterogeneous responses to growth factor stimulation. *Cancer Cell Int.* 2015;15:112.
355. ATCC. OV-90 (CRL-11732) : 2021 [cité le 01-18 2022]. Disponible: <https://www.atcc.org/products/crl-11732>
356. Ghandi M, Huang FW, Jane-Valbuena J, Kryukov GV, Lo CC, McDonald ER, 3rd, et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature.* 2019;569(7757):503-8.
357. Estep AL, Palmer C, McCormick F, Rauen KA. Mutation analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 ovarian cancer cell lines: implications for therapy. *PLoS One.* 2007;2(12):e1279.
358. Yan S, Frank D, Son J, Hannan KM, Hannan RD, Chan KT, et al. The Potential of Targeting Ribosome Biogenesis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
359. Sun CK, Zhang F, Xiang T, Chen Q, Pandita TK, Huang Y, et al. Phosphorylation of ribosomal protein S6 confers PARP inhibitor resistance in BRCA1-deficient cancers. *Oncotarget.* 2014;5(10):3375-85.
360. Kim DS, Camacho CV, Nagari A, Malladi VS, Challa S, Kraus WL. Activation of PARP-1 by snoRNAs Controls Ribosome Biogenesis and Cell Growth via the RNA Helicase DDX21. *Mol Cell.* 2019;75(6):1270-85 e14.
361. Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D1040-6.
362. Cardenas H, Jiang G, Thomes Pepin J, Parker JB, Condello S, Nephew KP, et al. Interferon-gamma signaling is associated with BRCA1 loss-of-function mutations in high grade serous ovarian cancer. *NPJ Precis Oncol.* 2019;3:32.
363. Lowell CA, Mayadas TN. Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol.* 2012;757:369-97.
364. Jin H, He Y, Zhao P, Hu Y, Tao J, Chen J, et al. Targeting lipid metabolism to overcome EMT-associated drug resistance via integrin beta3/FAK pathway and tumor-associated macrophage repolarization using legumain-activatable delivery. *Theranostics.* 2019;9(1):265-78.
365. Zhu X, Tao X, Lu W, Ding Y, Tang Y. Blockade of integrin beta3 signals to reverse the stem-like phenotype and drug resistance in melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;83(4):615-24.
366. Wang C, Wang T, Lv D, Li L, Yue J, Chen HZ, et al. Acquired Resistance to EGFR TKIs Mediated by TGFbeta1/Integrin beta3 Signaling in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(12):2357-67.
367. Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10(10):753-68.
368. Lasinska I, Mackiewicz J. Integrins as A New Target for Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(5):580-6.

369. Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*. 2004;23(48):7928-46.
370. Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, et al. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension*. 2002;39(2):233-8.
371. Chen X, Chen Y, Lin X, Su S, Hou X, Zhang Q, et al. The Drug Combination of SB202190 and SP600125 Significantly Inhibit the Growth and Metastasis of Olaparib-resistant Ovarian Cancer Cell. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(6):506-13.
372. Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep*. 2017;7:45465.
373. Deng YT, Huang HC, Lin JK. Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. *Mol Carcinog*. 2010;49(2):141-51.
374. Hu W, Tian H, Yue W, Li L, Li S, Gao C, et al. Rotenone induces apoptosis in human lung cancer cells by regulating autophagic flux. *IUBMB Life*. 2016;68(5):388-93.
375. Xiao W, Liu Y, Dai M, Li Y, Peng R, Yu S, et al. Rotenone restrains colon cancer cell viability, motility and epithelial-mesenchymal transition and tumorigenesis in nude mice via the PI3K/AKT pathway. *Int J Mol Med*. 2020;46(2):700-8.
376. Qin W, Wu HJ, Cao LQ, Li HJ, He CX, Zhao D, et al. Research Progress on PARP14 as a Drug Target. *Front Pharmacol*. 2019;10:172.
377. Tauber AL, Levonis SM, Schweiker SS. Recent developments in PARP14 research. *Future Med Chem*. 2020;12(18):1657-67.
378. Nicolae CM, Aho ER, Choe KN, Constantin D, Hu HJ, Lee D, et al. A novel role for the mono-ADP-ribosyltransferase PARP14/ARTD8 in promoting homologous recombination and protecting against replication stress. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(6):3143-53.
379. Barbarulo A, Iansante V, Chaidos A, Naresh K, Rahemtulla A, Franzoso G, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 (PARP14) is a novel effector of the JNK2-dependent pro-survival signal in multiple myeloma. *Oncogene*. 2013;32(36):4231-42.
380. Iansante V, Choy PM, Fung SW, Liu Y, Chai JG, Dyson J, et al. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun*. 2015;6:7882.
381. Schenkel LB, Molina JR, Swinger KK, Abo R, Blackwell DJ, Lu AZ, et al. A potent and selective PARP14 inhibitor decreases protumor macrophage gene expression and elicits inflammatory responses in tumor explants. *Cell Chem Biol*. 2021;28(8):1158-68 e13.
382. Schumacher AJ, Mohni KN, Kan Y, Hendrickson EA, Stark JM, Weller SK. The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002862.
383. Callen E, Zong D, Wu W, Wong N, Stanlie A, Ishikawa M, et al. 53BP1 Enforces Distinct Pre- and Post-resection Blocks on Homologous Recombination. *Mol Cell*. 2020;77(1):26-38 e7.
384. Dev H, Chiang TW, Lescale C, de Krijger I, Martin AG, Pilger D, et al. Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nat Cell Biol*. 2018;20(8):954-65.
385. Nacarelli T, Fukumoto T, Zundell JA, Fatkhutdinov N, Jean S, Cadungog MG, et al. NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2020;80(4):890-900.

386. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Dabritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018;553(7686):96-100.
387. Kudo K, Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Morita M, Kawai M, et al. Divergent metabolic responses dictate vulnerability to NAMPT inhibition in ovarian cancer. *FEBS Lett*. 2020;594(9):1379-88.
388. Galli U, Colombo G, Travelli C, Tron GC, Genazzani AA, Grolla AA. Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy. *Front Pharmacol*. 2020;11:656.
389. Pogrebniak A, Schemainda I, Azzam K, Pelka-Fleischer R, Nussler V, Hasmann M. Chemopotentiating effects of a novel NAD biosynthesis inhibitor, FK866, in combination with antineoplastic agents. *Eur J Med Res*. 2006;11(8):313-21.
390. Tateishi K, Higuchi F, Miller JJ, Koerner MVA, Lelic N, Shankar GM, et al. The Alkylating Chemotherapeutic Temozolomide Induces Metabolic Stress in IDH1-Mutant Cancers and Potentiates NAD(+) Depletion-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Res*. 2017;77(15):4102-15.
391. Travelli C, Drago V, Maldi E, Kaludercic N, Galli U, Boldorini R, et al. Reciprocal potentiation of the antitumoral activities of FK866, an inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, and etoposide or cisplatin in neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(3):829-40.
392. Travelli C, Consonni FM, Sangaletti S, Storto M, Morlacchi S, Grolla AA, et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Acts as a Metabolic Gate for Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res*. 2019;79(8):1938-51.
393. Sociali G, Raffaghello L, Magnone M, Zamporlini F, Emionite L, Sturla L, et al. Antitumor effect of combined NAMPT and CD73 inhibition in an ovarian cancer model. *Oncotarget*. 2016;7(3):2968-84.
394. Nahimana A, Aubry D, Breton CS, Majjigapu SR, Sordat B, Vogel P, et al. The anti-lymphoma activity of APO866, an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis, is potentialized when used in combination with anti-CD20 antibody. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(9):2141-50.
395. Thongon N, Zucal C, D'Agostino VG, Tebaldi T, Ravera S, Zamporlini F, et al. Cancer cell metabolic plasticity allows resistance to NAMPT inhibition but invariably induces dependence on LDHA. *Cancer Metab*. 2018;6:1.
396. Cagnetta A, Cea M, Calimeri T, Acharya C, Fulciniti M, Tai YT, et al. Intracellular NAD(+) depletion enhances bortezomib-induced anti-myeloma activity. *Blood*. 2013;122(7):1243-55.
397. Chowdhry S, Zanca C, Rajkumar U, Koga T, Diao Y, Raviram R, et al. NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. *Nature*. 2019;569(7757):570-5.
398. Piacente F, Caffa I, Ravera S, Sociali G, Passalacqua M, Vellone VG, et al. Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase Regulates Cancer Cell Metabolism, Susceptibility to NAMPT Inhibitors, and DNA Repair. *Cancer Res*. 2017;77(14):3857-69.
399. McPherson A, Roth A, Laks E, Masud T, Bashashati A, Zhang AW, et al. Divergent modes of clonal spread and intraperitoneal mixing in high-grade serous ovarian cancer. *Nat Genet*. 2016;48(7):758-67.
400. Nath A, Cosgrove PA, Mirsafian H, Christie EL, Pflieger L, Copeland B, et al. Evolution of core archetypal phenotypes in progressive high grade serous ovarian cancer. *Nat Commun*. 2021;12(1):3039.

401. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015;521(7553):489-94.
402. Zhang AW, McPherson A, Milne K, Kroeger DR, Hamilton PT, Miranda A, et al. Interfaces of Malignant and Immunologic Clonal Dynamics in Ovarian Cancer. *Cell*. 2018;173(7):1755-69 e22.
403. Sauriol SA, Simeone K, Portelance L, Meunier L, Leclerc-Desaulniers K, de Ladurantaye M, et al. Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
404. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol*. 2006;411:134-93.
405. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(W1):W488-W93.
406. Van de Peer Y. Venn Diagram [Web Page]. : VIB-UGent Center for Plant Systems Biology; 2008 [cité le 01-19 2022]. Disponible: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>



# Annexes

## A.1 Liste des publications

### A.1.1 Articles publiés

**Sauriol SA\***, Simeone K\*, Portelance P, Meunier L, Leclerc-Desaulniers K, de Ladurantaye M, Chergui M, Kendall-Dupont J, Rahimi K, Carmona E, Provencher DM, Mes-Masson AM. Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease. 2020. *Cancers*. 12(8):2222. \*Ces auteurs ont contribué également à l'ouvrage. (Article #1)

Fleury H\*, Malaquin N\*, Tu V, Gilbert S, Martinez A, Olivier MA, **Sauriol SA**, Communal L, Leclerc-Desaulniers K, Carmona E, Provencher DM, Mes-Masson AM, Rodier F. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. 2019. *Nature Communications*. 10(1):2556. \*Ces auteurs ont contribué également à l'ouvrage.

St-Georges-Robillard A, Cahuzac M, Péant B, Fleury H, Lateef MA, Ricard A, **Sauriol SA**, Leblond F, Mes-Masson AM. Long-term fluorescence hyperspectral imaging of on-chip treated co-culture tumour spheroids to follow clonal evolution. 2019. *Integrative Biology*. 11(4):130-141.

### A.1.2 Articles en préparation

**Sauriol SA**, Carmona E, Leclerc-Desaulniers K, Provencher DM, Mes-Masson AM. Inhibition of NAD salvage counters acquired PARP inhibitor resistance in high-grade serous epithelial ovarian cancer. 2022. En préparation. (Article #2)

## A.2 Contributions des auteurs

### A.2.1 Article #1

Modeling the Diversity of Epithelial Ovarian Cancer through Ten Novel Well Characterized Cell Lines Covering Multiple Subtypes of the Disease.

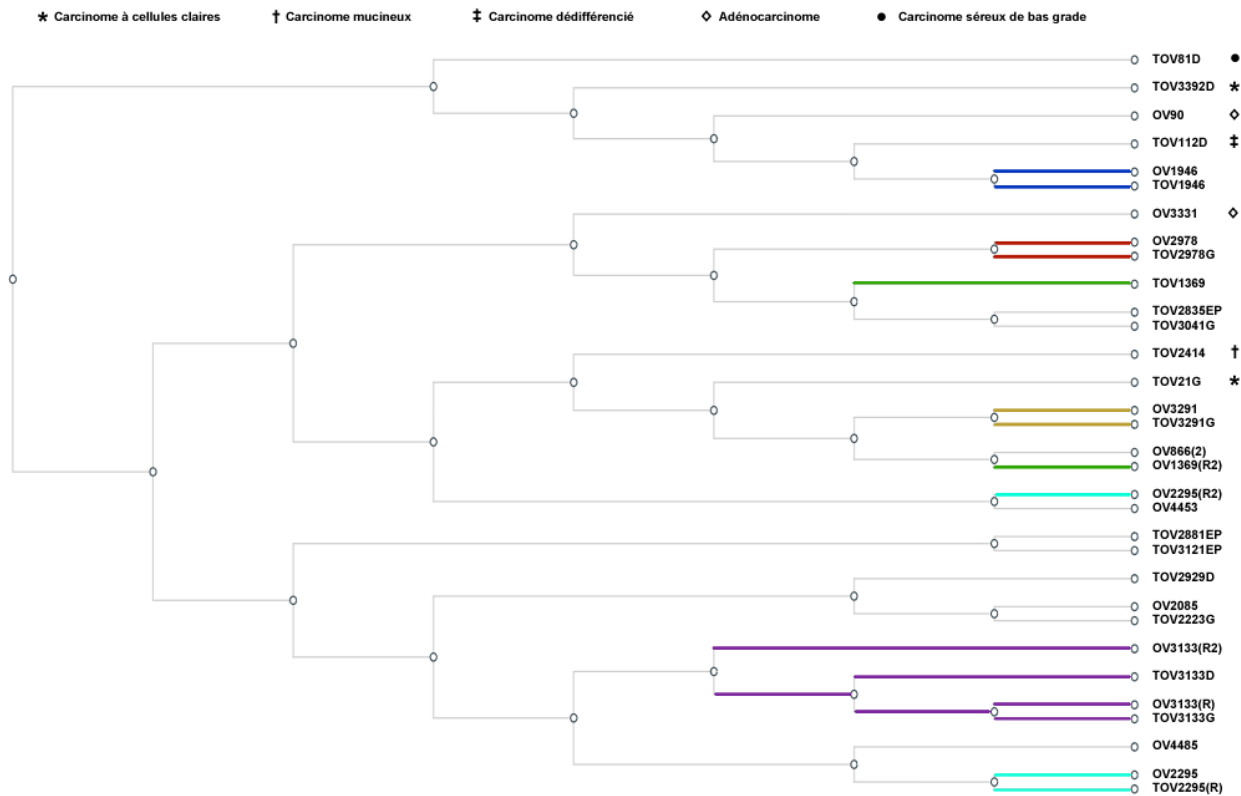
Skye Sauriol :	Méthodologie, analyse formelle, investigation, rédaction du manuscrit original, révision et édition, visualisation, validation
Kayla Simeone :	Investigation, révision et édition, visualisation, validation
Lise Portelance :	Intégration de données, méthodologie
Liliane Meunier :	Méthodologie, investigation
Kim Leclerc-Desaulniers :	Investigation, validation
Manon de Ladurantaye :	Intégration de données, investigation
Meriem Chergui :	Analyse formelle, investigation
Jennifer Kendall-Dupont :	Investigation, validation
Kurosh Rahimi :	Méthodologie, révision et édition, supervision, validation
Euridice Carmona :	Conceptualisation, analyse formelle, investigation, révision et édition, visualisation, supervision, administration de projet
Diane Michèle Provencher :	Conceptualisation, ressources, révision et édition, supervision, acquisition de fonds
Anne-Marie Mes-Masson :	Conceptualisation, révision et édition, supervision, administration de projet, acquisition de fonds

## A.2.2 Article #2

### Inhibition of NAD salvage counters acquired PARP inhibitor resistance in high-grade serous epithelial ovarian cancer.

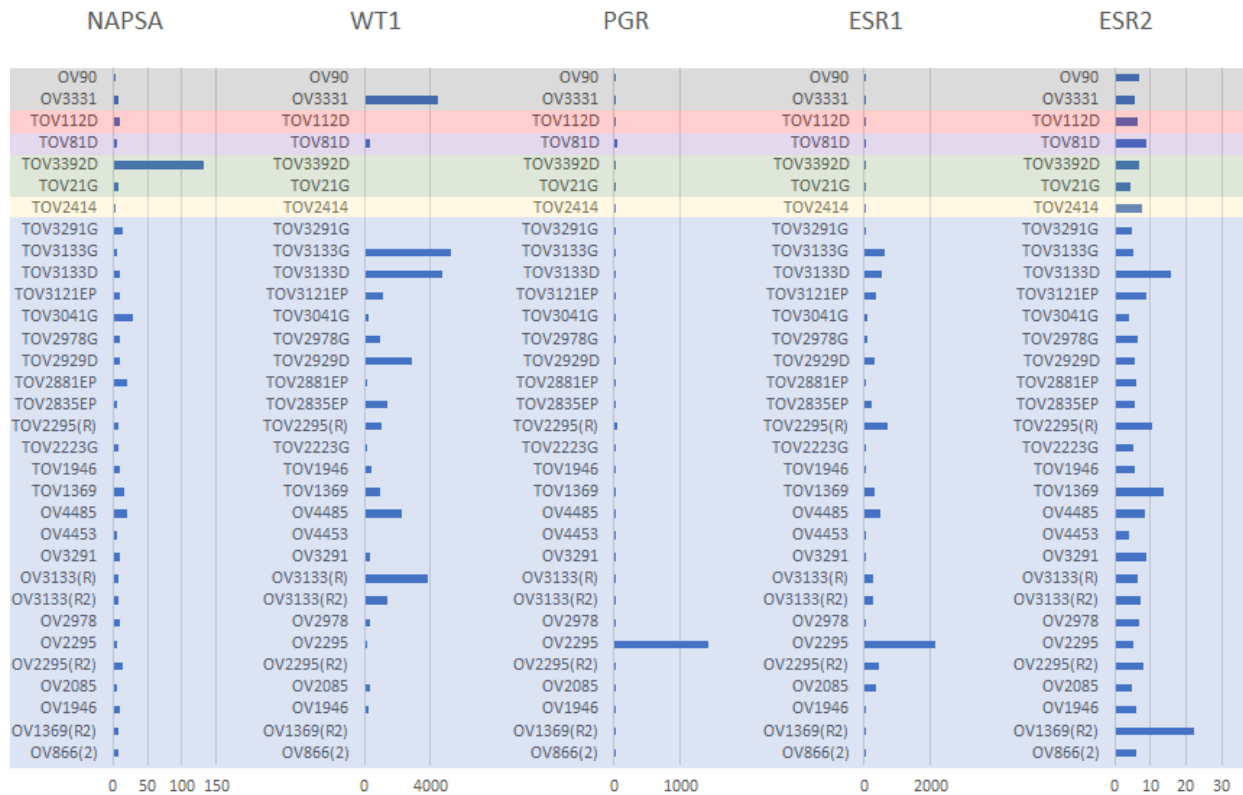
Skye Sauriol :	Conceptualisation, méthodologie, analyse formelle, investigation, rédaction du manuscrit original, révision et édition, visualisation, validation
Euridice Carmona :	Conceptualisation, analyse formelle, investigation, révision et édition, visualisation, supervision, administration de projet
Kim Leclerc-Desaulniers :	Investigation, validation
Diane Michèle Provencher :	Ressources, supervision, acquisition de fonds
Anne-Marie Mes-Masson :	Conceptualisation, révision et édition, supervision, administration de projet, acquisition de fonds

### A.3 Figures non publiées



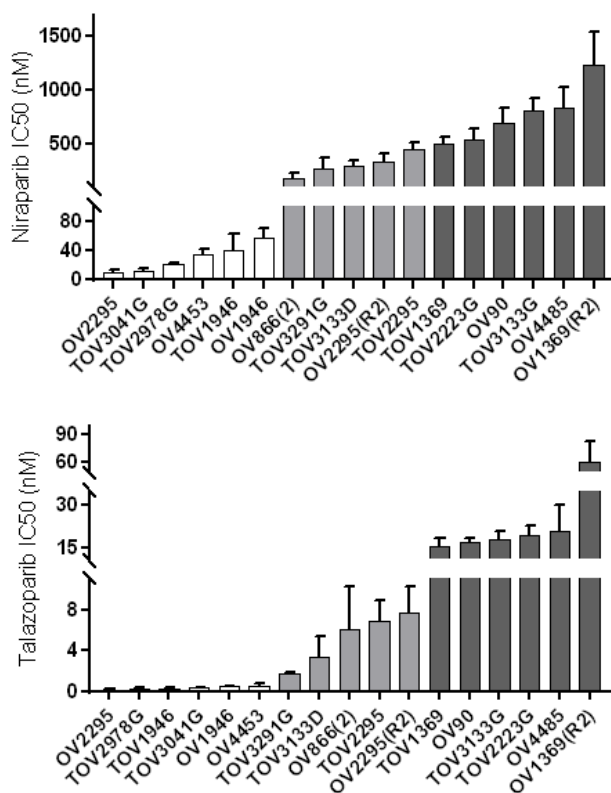
**Figure 8 –** Classification hiérarchique de nos trente-deux lignées cellulaires de CEO.

Les 32 lignées cellulaires de notre laboratoire ont été soumises à une analyse d’expression génique par biopuce de type Affymetrix Clariom S (Applied Biosystems, Santa Clara, CA, USA), effectuée par le Centre d’expertise et de services Génome Québec, tel que décrit précédemment décrit (403). Les données d’expression ont été normalisées à l’aide du programme Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 (Applied Biosystems), et analysées à l’aide du programme librement accessible TM4 MultiExperiment Viewer v3 (MeV) (404). Toutes les lignées indiquées non identifiées par la légende ci-haut sont du sous-type CSHG. Les ensembles de couleurs identiques identifient les lignées cellulaires issues d’une même patiente.



**Figure 9 –** Expression génique de marqueurs par nos lignées de CEO.

Les données d'expression des 32 lignées pour cinq gènes – Napsin A (NAPSA), WT1, PR (PGR) et ER (ESR1, ESR2) – ont été schématisées. Les lignées cellulaires sont séparés selon leur classification : adénocarcinome (gris), carcinome dédifférencié (rouge), CSBG (violet), CCC (vert), CM (jaune) ou CSHG (bleu).



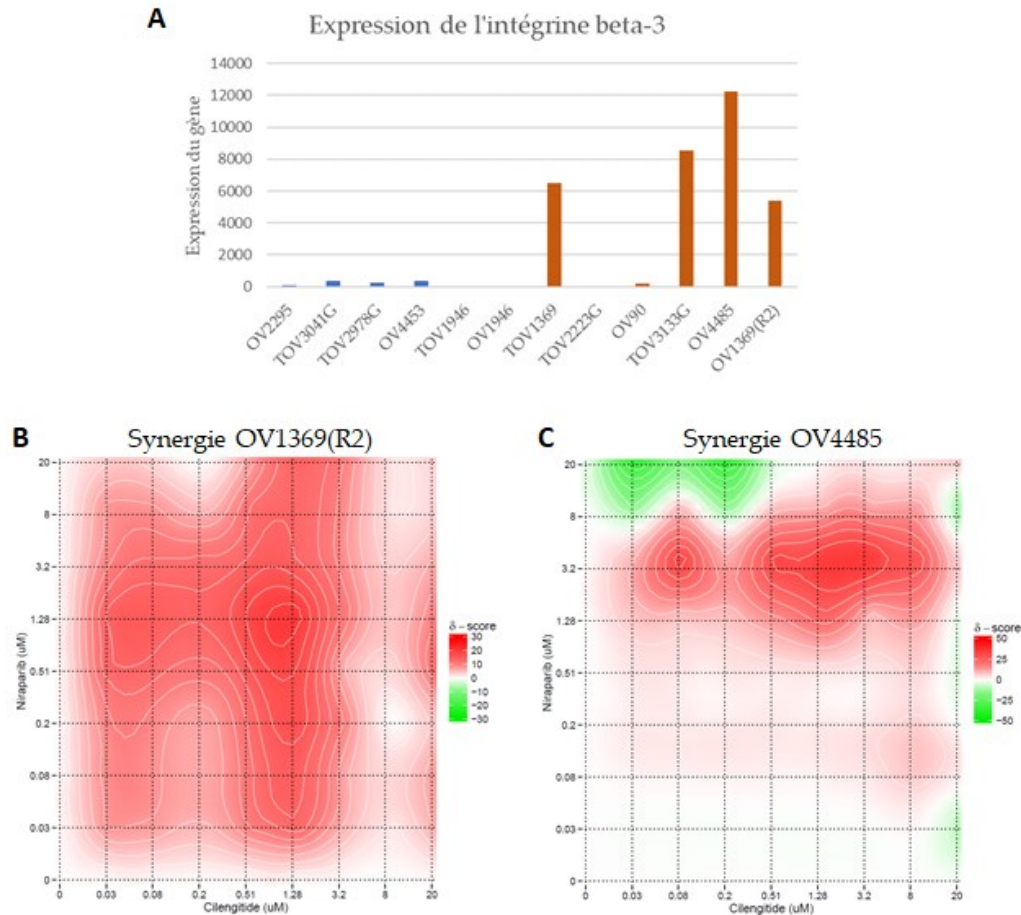
**Figure 10** – Sensibilité de dix-sept de nos lignées de CEO à niraparib et talazoparib.

La  $CI_{50}$  de 17 de nos lignées de CEO à niraparib et talazoparib a été évaluée par essais de survie clonogénique, tel que décrit dans le second article de cette thèse (Chapitre 2.2). Les lignées ont été classées en ordre de sensibilité à chaque inhibiteur; les six premières ont été classifiées comme sensibles (blanc), les six dernières comme résistantes (gris foncé), et les cinq autres comme intermédiaires (gris pâle). Toutes les expériences ont été répétées 3 fois, et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

A	Rank	RESISTANCE-ASSOCIATED PATHWAYS	B	Rank	RESISTANCE-ASSOCIATED GENE	Fold Change	p-value
	1	Ribosome		1	TGFBI	-35.9	0.043
	2	Base excision repair		2	ITGB3	27.9	0.021
	3	Fanconi anemia pathway		3	OAS2	-18.1	0.039
	4	Pancreatic cancer		4	ARHGAP4	14.6	0.020
	5	DNA replication		5	OASL	-12.5	0.037
	6	Nucleotide excision repair		6	SNRPN	12.4	0.038
	7	Fatty acid metabolism		7	ADAM19	-12.3	0.037
	8	Chronic myeloid leukemia		8	GSTT2	-11.7	0.023
	9	Spliceosome		9	CLDN16	11.1	0.041
	10	Small cell lung cancer		10	FGF13	-10.2	0.045
	11	Pyrimidine metabolism		11	GNB4	-9.6	0.041
	12	Cell cycle		12	F3	-9.5	0.035
	13	Homologous recombination		13	SNAI2	-7.9	0.043
	14	Basal transcription factors		14	SP110	-7.9	0.040
	15	Colorectal cancer		15	OAS3	-7.9	0.008
	16	Mitophagy - animal		16	GNG7	7.5	0.014
	17	Vibrio cholerae infection		17	MAP2	-7.0	0.027
	18	Endometrial cancer		18	ELOVL4	-6.6	0.033
	19	Ribosome biogenesis in eukaryotes		19	TSPAN12	6.6	0.020
	20	Mismatch repair		20	ISG15	-6.5	0.003
	21	Valine, leucine and isoleucine degradation		21	HACD4	-6.4	0.040
	22	Other types of O-glycan biosynthesis		22	GSTO2	6.3	0.015
	23	Oxidative phosphorylation		23	NTN4	6.2	0.010
	24	Fatty acid elongation		24	EMB	-6.2	0.049
	25	Biosynthesis of amino acids		25	BST1	-5.8	0.023
	26	Propanoate metabolism		26	RHBDL2	-5.6	0.032
	27	Biosynthesis of cofactors		27	ADA	5.5	0.044
	28	Sphingolipid metabolism		28	IFIT3	-5.4	0.042
	29	N-Glycan biosynthesis		29	KCNQ5	-5.4	0.036
	30	Terpenoid backbone biosynthesis		30	DUSP6	5.2	0.041

**Figure 11 –** Voies et gènes les plus fortement associés à la résistance intrinsèque.

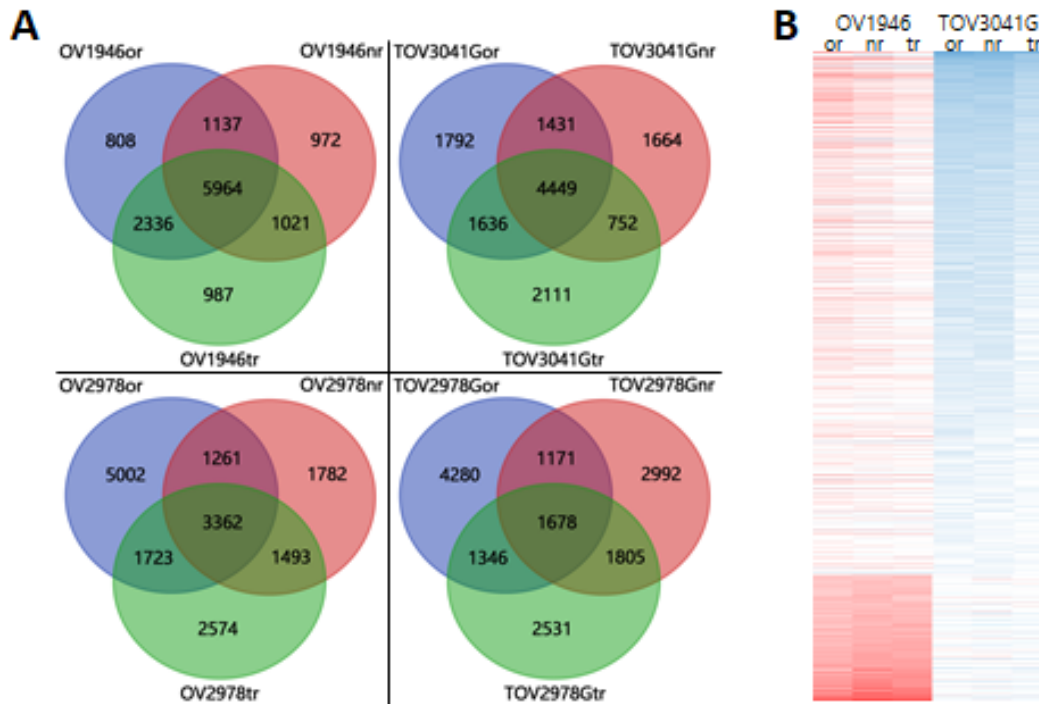
(A) Chacune des six lignées résistantes a été comparée à chacune des six lignées sensibles en termes d'expression pour chaque gène, à partir de nos données de biopuce. Les gènes avec une différence d'expression d'au moins 50% ont été retenus et saisis dans KEGG pour chaque comparaison effectuée. Les voies de signalisation ressorties ont reçu un score selon le nombre de gènes différentiellement exprimés, et les scores pour chaque comparaison ont été combinés. Le rang pour les voies associées à la résistance ci-illustrés prend en compte le nombre de gènes de surexprimés dans les lignées résistantes, et le nombre de gènes sous-exprimés dans les lignées sensibles. (B) L'expression des gènes a été comparée entre le groupe résistant et le groupe sensible, et les 30 gènes significatifs (t-test de Student,  $p < 0.05$ ) les plus fortement affectés en moyenne ont été retenus. Les valeurs positives et négatives indiquent une surexpression et une sous-expression dans les lignées résistantes, respectivement.



**Figure 12 –** Intégrine beta-3 comme facteur de résistance.

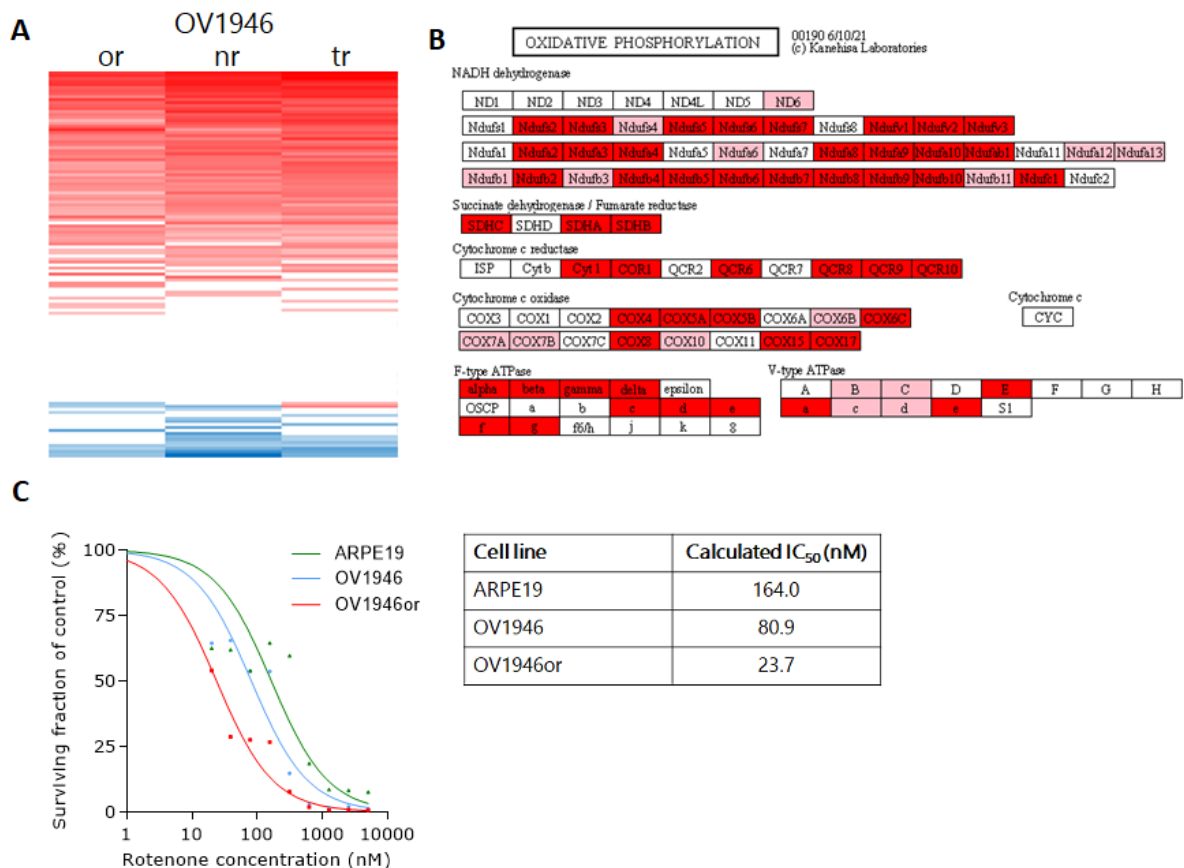
(A) L'expression du gène ITGB3 a été comparée entre les lignées sensibles en bleu, et les lignées résistantes en orange. (B-C) Les lignées résistantes OV1369(R2) et OV4485 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et traitées avec une gamme de concentrations de niraparib (PARPi) et de cilengitide (inhibiteur d'intégrine beta-3), seuls ou en combinaison, et une photo a été prise au début et à la fin de l'expérience après six jours, à l'aide de l'appareil IncuCyte® ZOOM (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI, USA). La confluence des cellules a été mesurée aux deux moments, et le taux d'inhibition a été calculé en rapportant la confluence finale sur la confluence initiale, relativement aux puits non traités. La synergie de type *zero interaction potency* (ZIP) entre les deux inhibiteurs a été calculée à l'aide de l'application en ligne libre d'accès SynergyFinder (405). Les zones rouges marquent les concentrations synergiques, et les zones vertes marquent les concentrations antagonistes. Les essais de synergie ont été répétés 3 (B) ou 2 (C) fois.





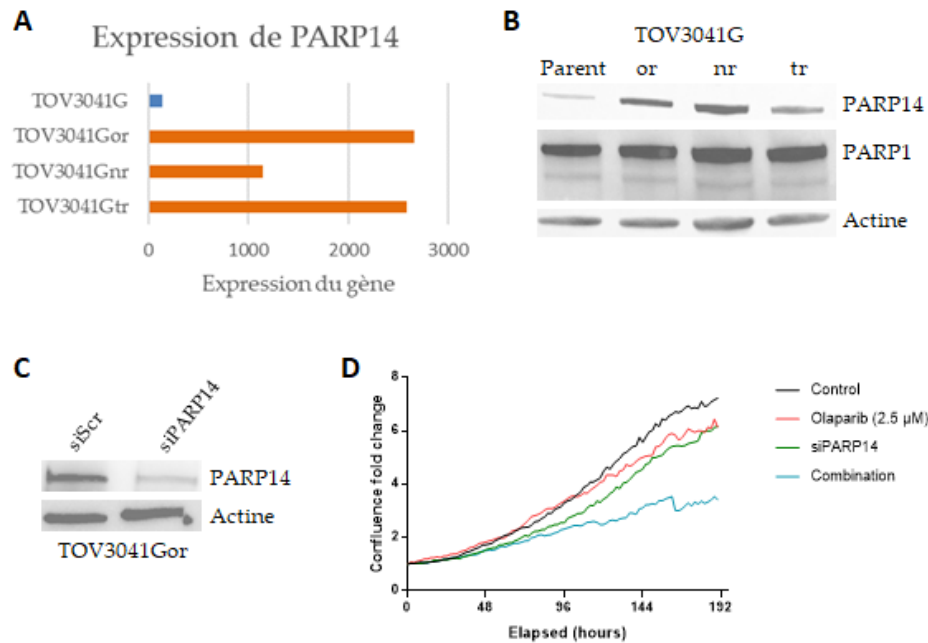
**Figure 13** – Profil des gènes différentiellement exprimés dans nos lignées dérivées.

(A) La totalité des gènes différentiellement exprimés pour chaque groupe de lignées résistantes a été comparée; tous les gènes au moins 50% surexprimés ou sous-exprimés ont été comptabilisés et saisis dans le programme libre d'accès Venn Diagram (406). Les zones qui se recoupent indiquent le nombre de gènes communément affectés entre les lignées. (B) *Heat map* comparative de l'expression des 500 gènes les plus fortement sous-exprimés en moyenne dans les lignées résistantes de TOV3041G (haut), de même que des 100 gènes les plus fortement surexprimés dans les lignées résistantes d'OV1946 (bas). Les gènes en bleu sont sous-exprimés et les gènes en rouge sont surexprimés, avec une intensité variable selon le degré d'expression.



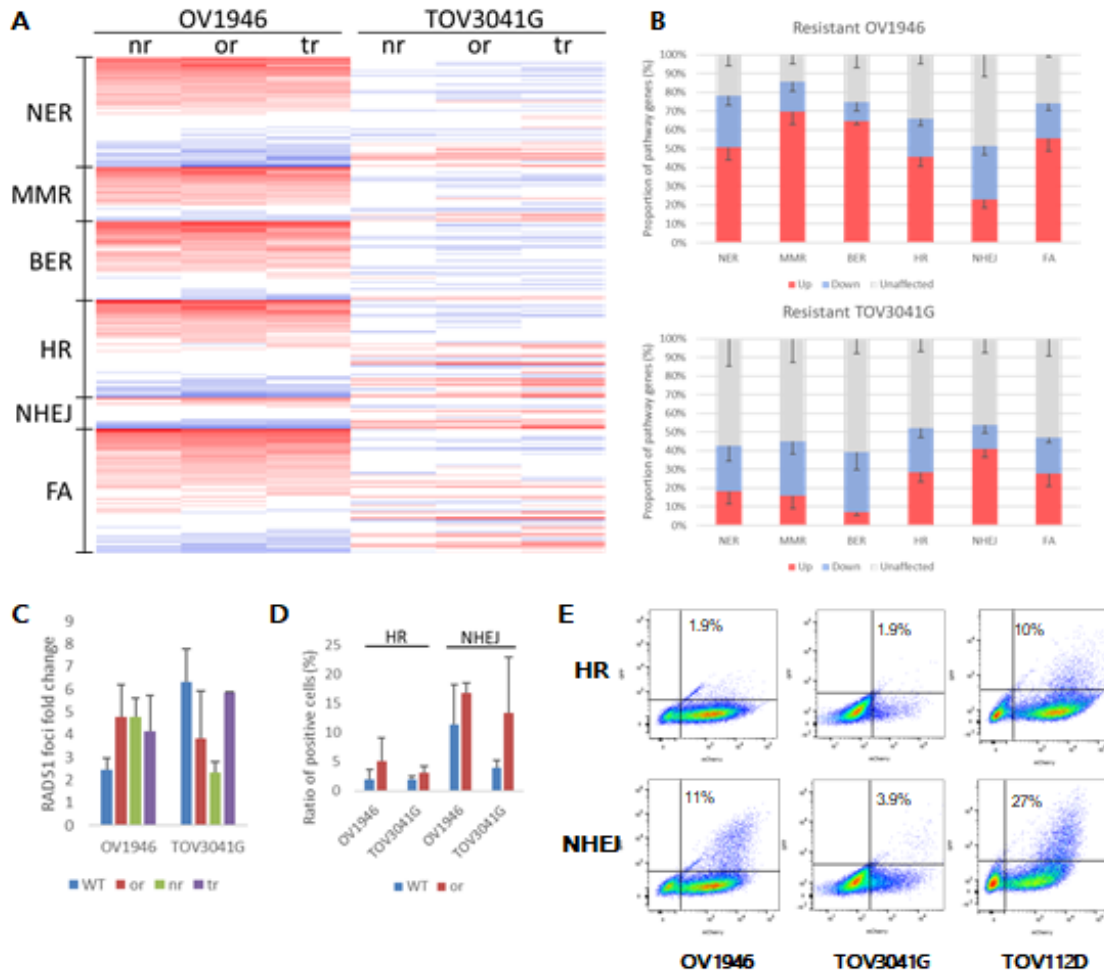
**Figure 14** – Implication de la phosphorylation oxydative dans la résistance d’OV1946.

(A) *Heat map* de l’expression des gènes de la voie KEGG de la phosphorylation oxydative dans les lignées résistantes d’OV1946. Les gènes en bleu sont sous-exprimés et les gènes en rouge sont surexprimés, avec une intensité variable selon le degré d’expression. (B) Les divers gènes de la voie KEGG de la phosphorylation oxydative. Les cases en rouge indiquent les gènes surexprimés dans toutes les trois lignées résistantes d’OV1946, et les cases en rose indiquent les gènes surexprimés dans au moins une des trois lignées. (C) Courbe de dose-réponse et IC<sub>50</sub> à rotenone, un inhibiteur du complexe I de la mitochondrie, des lignées OV1946, OV1946or, et la lignée épithéliale de l’œil normale ARPE19. Les données représentent la viabilité relative des lignées après 6 jours de traitement, tel que mesuré par le changement de confluence. La croissance des cellules a été évaluée à l’aide de l’appareil IncuCyte® ZOOM (Essen BioScience Inc.). Les valeurs d’IC<sub>50</sub> ont été calculées à l’aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Cette expérience a été effectuée une seule fois.



**Figure 15 –** Implication de PARP14 dans la résistance de TOV3041G.

(A) L'expression du gène PARP14 a été comparée entre la lignée TOV3041G et ses trois lignées dérivées résistantes. (B) L'expression de la protéine a été évaluée par *Western blot* pour la lignée TOV3041G et ses trois lignées dérivées résistantes, en comparaison avec PARP1 et la beta-actine comme contrôles. Cette expérience a été répétée trois fois. (C) Efficacité de notre siRNA anti-PARP14 (siPARP14), en comparaison avec un siRNA *Scramble* (siScr) non spécifique. Les siRNA ont été transfectés dans nos cellules par électroporation à l'aide de l'appareil Amaxa® Nucleofector® Device II/2B et le kit de transfection Cell Line Nucleofector™ Kit (Lonza Group, Basel, Suisse), suivant le protocole fourni, en utilisant le programme de transfection T-030. Cette expérience a été effectuée une seule fois. (D) Courbes de réponse représentant la confluence relative de TOV3041Gor suivant le traitement avec un siRNA anti-PARP14 combiné avec 2.5 μM d'olaparib (courbe bleue), avec comme contrôles le siRNA anti-PARP14 seul (courbe verte), un siRNA non spécifique seul (courbe noire), et un siRNA non spécifique en combinaison avec olaparib (courbe rouge). La lignée a été transfectée puisensemencée dans une plaque 96 puits, et traitée 24h plus tard. La confluence a été mesurée par l'appareil l'IncuCyte® ZOOM (Essen BioScience Inc.). Cette expérience a été effectuée deux fois.



**Figure 16** – Profil des voies de réparation de l'ADN de lignées résistantes.

(A-B) *Heat map* et représentation schématique des gènes des voies KEGG de réparation de l'ADN sur- ou sous-exprimés d'au moins 50% dans les lignées résistantes. Les gènes en rouge sont surexprimés, et les gènes en bleu sont sous-exprimés. HR : recombinaison homologue. FA : voie de l'anémie de Fanconi. (C) Nombre de foci RAD51 formés 2 heures après irradiation à 8 Gy, relatif au contrôle non irradié. Cette expérience a été répétée 2 fois. (D-E) Proportion de cellules fluorescentes suite à la transfection de systèmes de plasmide inductibles de plasmide DR-GFP ou EJ5-GFP (382). Les cellules ont été transfectées à l'aide de l'appareil Amaxa® Nucleofector® Device II/2B et le kit de transfection Cell Line Nucleofector™ Kit (Lonza Group), en utilisant le programme X-005 (OV1946, TOV112D) ou T-030 (TOV3041G). Les cellules ont été incubées 24 heures après transfection, et le nombre de cellules fluorescentes, indicateur de la capacité d'une lignée à

réparer la cassure des plasmides DR-GFP (par HR) ou EJ5-GFP (par NHEJ) a été compté par tri cellulaire à l'aide du cytomètre en flux LSRFortessa™ Cell Analyzer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) et du programme FlowJo (BD). (D) Le nombre de cellules ayant réparé le plasmide transfecté DR-GFP (gauche; HR) ou EJ5-GFP (droite; NHEJ) est représenté comme pourcentage de cellules fluorescentes sur le nombre de cellules triées. (E) Les schémas de cytométrie ont été illustrés pour les lignées parentales, avec indication du pourcentage de cellules ayant réparé leur plasmide DR-GFP (haut; HR) ou EJ5-GFP (bas; NHEJ). Le modèle TOV112D est ajouté comme référence en tant que lignée compétente pour la réparation de son ADN via les deux voies analysées.