

Université de Montréal

**Dépistage des événements génétiques impliqués dans le cancer
épithélial de l'ovaire chez la femme**

par

Hafida Lounis

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

**Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire**

septembre, 1998

© Hafida Lounis, 1998



QH
506
U54
1999
v. 004

Université de Montréal

Département des événements généraux impliqués dans le cancer
équivalents de l'ovaire chez la femme

par
Maurice Lussier

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Philosophe Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

septembre, 1999

Maurice Lussier, Ph.D.



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Dépistage des événements génétiques impliqués dans le cancer
épithélial de l'ovaire chez la femme**

Présentée par:

Hafida Lounis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:



Thèse acceptée le: 99-04-29

SOMMAIRE

Le cancer épithélial sporadique des ovaires se situe en quatrième position des causes de décès par cancer chez la femme après ceux du sein, du poumon et du côlon. Nous avons initié et mis au point un modèle pour déterminer les altérations moléculaires dans les cancers ovariens et corréler les résultats aux différentes étapes de la progression clinique de la maladie. Nous avons établi et caractérisé des cultures primaires dérivées d'ovaires normaux et de différentes tumeurs ovariennes qui couvrent différents types histologiques et différentes étapes de la maladie. Plusieurs analyses morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires ont démontré que ces cellules sont représentatives des populations cellulaires du matériel clinique initial. Ces cultures représentent un système unique pour mener des analyses de détection de changements du point de vue génétique ou biologique qui jouent un rôle important dans la progression tumorale du cancer épithélial de l'ovaire. De plus nous avons obtenu à partir des cultures primaires des lignées cellulaires immortalisées de façon spontanée en culture. Ces lignées possèdent plusieurs avantages à savoir qu'elles ont été dérivées de tumeurs de patientes n'ayant pas subi de traitements de chimiothérapie et proviennent dans trois cas (TOV21G, TOV-81D et TOV112D) de tumeurs primaires solides et dans un cas (OV-90) d'ascite malin. Ces lignées représentent différents types histologiques du cancer épithélial de l'ovaire. Ce système nous a permis de faire quelques corrélations entre le comportement des cellules *in vitro* et les paramètres cliniques de la maladie et nous a fourni un indice sur la croissance *in vitro* qui semble épouser les paramètres cliniques de ces tumeurs. En premier lieu le modèle a été utilisé pour étudier et caractériser les altérations géniques au

niveau du bras court du chromosome 3. Nous avons choisi d'étudier ce chromosome en particulier car c'est le plus fréquemment touché dans les cancers d'origine épithéliale, suggérant la présence de gènes suppresseurs de tumeurs dans les régions délétées dont l'inactivation fonctionnelle peut être impliquée dans le cancer épithélial de l'ovaire. Dans cette étude nous avons utilisé 33 biopsies tumorales et 47 cultures primaires ovariennes. Ce large répertoire d'échantillons contient des tumeurs ovariennes bénignes, des tumeurs épithéliales de l'ovaire de faible potentiel de malignité ainsi que des cancers épithéliaux de l'ovaire ou de l'ascite. En utilisant 15 marqueurs polymorphiques nous avons observé des LOH dans 25 (31%) des échantillons analysés: 21 sur 58 échantillons malins, 2 sur 12 de faible potentiel de malignité et 2 sur 10 tumeurs bénignes. Le profil de délétion affiché par ces 25 échantillons a permis la détermination d'au moins deux régions distinctes de délétions communes sur le bras court du chromosome 3 qui s'étendent du marqueur D3S1270 à D3S1597 (Région I) et du marqueur D3S1293 à D3S1283 (Région II). De plus une autre région proximale au marqueur D3S1300 (Région III) est délétée dans certains échantillons. Bien que parmi les tumeurs bénignes et malignes des délétions ont été observées dans les trois régions de délétion (Région I, Région II et Région III) les tumeurs de faible potentiel de malignité ne démontrent de délétions que seulement dans la région III. D'autre part, ces régions minimales de délétions semblent, à l'exception de *RARB* et *THRβ* contenus dans la Région II, exclure les gènes *VHL*, *TGFBR2*, *PTPasey* et *FHIT* comme gènes suppresseurs candidats dans la tumorigénèse du cancer épithélial de l'ovaire.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	III
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	IX
Liste des tableaux.....	XII
Liste des abréviations.....	XIII
Remerciements.....	XIv
CHAPITRE I-Introduction.....	1
1.0 Structure de l'ovaire.....	2
1.1 Carcinogénèse ovarienne.....	4
1.2 Classification histologiques des tumeurs épithéliales de l'ovaire.....	6
1.2.1 Stratification du cancer épithélial de l'ovaire.....	7
1.2.2 Mode de présentation.....	7
1.3 Facteurs de risque ou de protection du cancer de l'ovaire sporadique.....	9
1.3.1 Facteurs reproducteurs.....	9
1.3.2 Facteurs environnementaux.....	9
1.4 Prédispositions héréditaires au cancer de l'ovaire.....	10
1.5 Anomalies génétiques dans le cancer de l'ovaire.....	12
1.5.1 Les oncogènes et les gènes suppresseurs.....	12
1.5.2 Les gènes suppresseurs.....	12
1.5.2.1 Le gène <i>Rb</i>	15
1.5.2.2 Le gène <i>P53</i>	15
1.5.3 Les oncogènes.....	18

1.5.4	Proto-oncogènes impliqués dans le cancer de l'ovaire...	19
1.6	Chromosome 3 et le cancer.....	21
1.6.1	Gènes suppresseurs candidats localisés sur le bras court du chromosome 3.....	24
1.6.1.1	Le gène du Von Hippel-Lindau (<i>VHL</i>).....	24
1.6.1.2	Le gène du récepteur type II de <i>TGFβ</i>	25
1.6.1.3	<i>THRβ</i> et <i>RARβ2</i>	26
1.6.1.4	<i>FHIT</i> et <i>PTPaseγ</i>	28
1.7	Anomalies génétiques dans le cancer épithélial de l'ovaire....	30
1.8	Modèle utilisé pour l'étude du cancer épithélial de l'ovaire....	32
1.9	But de la thèse.....	33
CHAPITRE II-Article 1.....		36
	Primary Cultures of Normal and Tumoral Human Ovarian Epithelium: A Powerful Tool For Basic Molecular Studies.....	37
	Abstract.....	38
	Introduction.....	39
	Materials and Methods.....	41
	Results.....	45
	Discussion.....	49
	Acknowledgements.....	51
	References.....	52
CHAPITRE III-Article 2.....		65

Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines.....	66
Abstract.....	67
Introduction.....	68
Results.....	69
Discussion.....	76
Materials and Methods.....	80
Acknowledgements.....	86
References.....	87
CHAPITRE IV -Article 3.....	109
Mapping of Chromosome 3p Deletions in Human Epithelial Ovarian Tumors.....	110
Abstract.....	111
Introduction.....	113
Results.....	115
Discussion.....	118
Materials and Methods.....	122
Acknowledgements.....	124
References.....	125
CHAPITRE V -Discussion.....	135
5.0	
Discussion.....	136
5.1 Culture des cellules primaires dérivées de biopsies	

	VIII
ovariennes.....	136
5.2 Établissement et caractérisation de lignées cellulaires dérivées de tumeurs épithéliales de l'ovaire.....	140
5.3 Cartographie des délétions au niveau du bras court du chromosome 3 dans des tumeurs épithéliales de l'ovaire chez la femme.....	143
5.4 L'analyse des délétions du chromosome 3 dans les tumeurs d'ovaire de faible potentiel de malignité.....	147
5.5 Conclusion et perspectives.....	149
BIBLIOGRAPHIE DES CHAPITRES I ET V.....	153
ANNEXE	
I.....	190

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1. Structure histologique de l'ovaire normal.....3

CHAPITRE II

Figure 1. Histogram showing the growth potential of NOV, BOV,TOV,
and OV derived primary cell cultures.....59

Figure 2. A-D. Morphological aspects and growth pattern of primary
cultures60

Figure 3. Morphology of immortalized cell lines. (A) TOV21D was
established from a grade III malignant adenocarcinoma of the ovary
(B) OV90 was derived from a malignant ovarian ascites and (C)
commercially available NIH:OVCAR3, a cell line derived from a
malignant ovarian ascites.....61

Figure 4. Keratin immunofluorescence in cell cultures derived from:
(Top panel) normal ovary (NOV) and (bottom panel) malignant
ovarian tumor (TOV).....62

Figure 5. Comparison of RFLP patterns seen in fresh clinical ovarian
samples and in the corresponding primary cell
cultures.....63

Figure 6. Comparison of p53 mutational patterns seen in fresh clinical ovarian samples (T) and in the corresponding primary cell cultures (C).....	64
--	----

CHAPITRE III

Figure 1. Morphological aspect of cell lines.....	103
Figure 2. Growth of cells in soft agarose.....	104
Figure 3. Growth rate of ovarian cell lines in culture.....	105
Figure 4. RT-PCR analysis of <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> expression.....	106
Figure 5. Histopathological appearance of ovarian tumors and their respective mouse xenografts.	107
Figure 6. Growth rate of parental cell lines and derivative xenografts cell lines.....	108

CHAPITRE IV

Figure 1. LOH analysis of chromosome 3p in ovarian specimens....	132
Figure 2. LOH Analysis of chromosome 3p loci in malignant, borderline and benign tumors.....	133
Figure 3. Schematic presentation of chromosome 3p LOH associated with ovarian tumor samples.....	134

ANNEXE I

Figure 1. SSCP analysis of exon 6 of the *P53* gene

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE I**

Table 1. Classification anatomo-cliniques du cancer de l'ovaire.....	8
--	---

CHAPITRE II

Table 1. Establishment of ovarian primary cultures.....	58
--	----

CHAPITRE III

Table 1. Characteristics of original tumor and clinical data.....	99
---	----

Table 2.. Antigen presentation by ovarian cancer cell lines.....	100
--	-----

Table 3. Biological Chararacteritics of Spontaneously Transformed Cell lines.....	101
--	-----

Table 4. Molecular Characteristics and Karyotype of Spontaneously Transformed Cell lines.....	102
--	-----

CHAPITRE IV

Table 1. LOH and histopathology of ovarian specimens.....	131
---	-----

ANNEXE I

Table1. P53 mutations in epithelial ovarian cancers and ascites	
---	--

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
cDNA:	complementary deoxyribonucleic acid
DCC:	deleted in colon carcinoma
DNA:	deoxyribonucleic acid
EGF:	epidermal growth factor
EGF-R:	epidermal growth factor receptor
GDP:	guanosine 5'-diphosphate
GTP:	guanosine 5'-triphosphate
kb:	kilobase ou mille bases
mRNA:	messenger ribonucleic acid
PCR:	polymerase chain reaction
Rb:	rétinoblastome
RNA:	ribonucleic acid
RNase:	ribonuclease
RT-PCR:	reverse transcription and polymerase chain reaction
RER+	absence dans une cellule de l'activité de réparation des désappariement des bases de l'ADN.
SSCP	Polymorphisme de conformation des simples brins
HNPCC	cancer du côlon héréditaire non polypeux
SCLCC	cancer du poumon à petites cellules
NSCLC	cancer du poumon à non petites cellules

RCC carcinome du cancer du rein
LOH perte d'hétérozygotie

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier en premier lieu ma directrice de thèse, le Dr. Anne-Marie Mes-Masson, pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée pour sa patience et la liberté qu'elle m'a accordée tout au long de la réalisation de mon projet.

Je voudrais également exprimer ma profonde gratitude au Dr. Diane Provencher, qui a toujours manifesté beaucoup d'intérêt à l'égard de mon projet et dont les conseils et les encouragements ont été grandement appréciés.

Je tiens à remercier aussi le Dr. Patricia Tonin pour sa disponibilité, ses encouragements et ses conseils judicieux.

Je souhaite remercier aussi mes collègues de travail qui ont participé à la réalisation de ce projet de recherche, principalement Louise Champoux, France Dion et Claude Godbout.

CHAPITRE I

Introduction: revue bibliographique

1.0 Structure de l'ovaire

L'ovaire est un organe complexe composé de populations de cellules hétérogènes avec deux fonctions importantes: la production d'hormones stéroïdiennes et l'ovulation. La structure histologique de l'ovaire souligne les rôles physiologiques de l'épithélium de surface, de la zone périphérique ou corticale et de la zone centrale ou médullaire (Figure 1). Chaque tissu composant l'ovaire peut être sujet à une néoplasie maligne. La zone corticale est un tissu conjonctif constitué de cellules stromales et d'ovocytes entourés de la granulosa et des cellules thécales. Deux unités fonctionnelles sont étroitement liées dans cette zone: l'appareil folliculaire en remaniement continu et l'appareil thécale dont les cellules extrafolliculaires représentent la source la plus importante de sécrétion d'oestradiol. La zone médullaire ou zone centrale de l'ovaire est sans limite précise. Elle comprend deux parties distinctes: une zone spongieuse parenchymateuse vasculaire contigüe au stroma cortical contenant les follicules et une zone hilaire fibreuse contenant de gros vaisseaux et les cellules de Berger, homologues aux cellules Leydig du testicule. L'épithélium de surface consiste en une unique couche de cellules cuboïdales aplaties en continuité avec l'épithélium péritonéal. Les cellules sont recouvertes de microvillosités et une lame conjonctive les sépare du stroma sous-jacent. Il existe des glandes d'inclusion intra-corticale provenant d'invaginations de l'épithélium de surface ayant perdu ses connections avec la surface. Ces glandes d'inclusion peuvent être à l'origine de kystes ou de néoplasies.

Figure 1: Structure histologique de l'ovaire normal

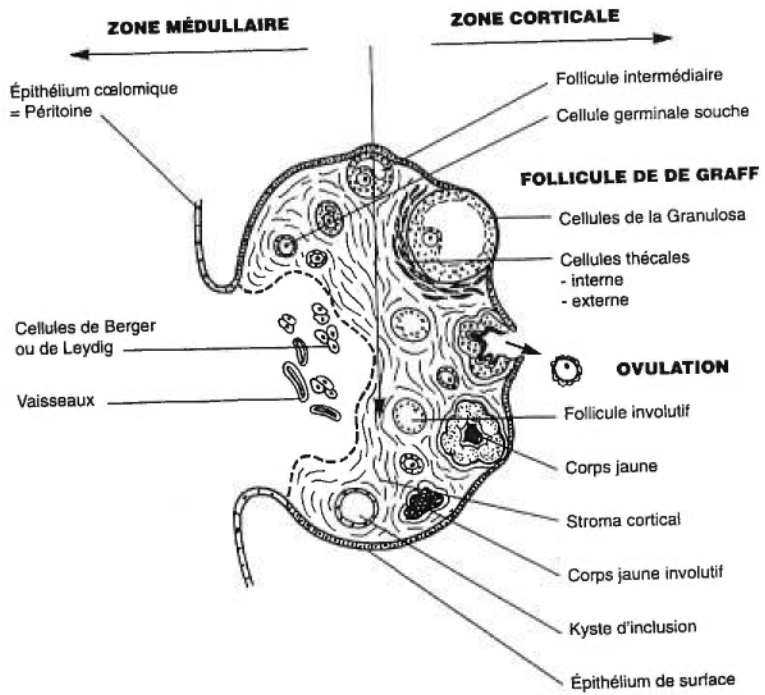


Figure tirée du livre Cancer de l'Ovaire (Dauplat et Guastalla; 1996)

1.1 Carcinogénèse ovarienne

Approximativement 90% des cancers de l'ovaire dérivent de l'épithélium de surface alors qu'il ne représente qu'une fraction mineure de la masse ovarienne totale. Cet épithélium est relié du point de vue embryologique à l'épithélium coelomique d'où dérivent les couches de cellules qui recouvrent les trompes de Fallope, et le péritoine. Dans l'ovaire, les tumeurs épithéliales prennent naissance dans les cellules de l'épithélium de surface ou dans les kystes d'inclusion qui se retrouvent à l'intérieur de l'ovaire probablement par un mécanisme qui permet l'invagination de la surface épithéliale dans le stroma ovarien puis détachement de la surface et formation de kystes. Malheureusement la détection précoce du cancer épithélial de l'ovaire reste très rare malgré l'utilisation de plusieurs méthodes, à savoir les ultrasons ou les biomarqueurs (CA125). La cytoréduction chirurgicale, suivie de chimiothérapie reste le traitement de choix mais seulement 20% à 30 % des patientes vont avoir une rémission complète.

Vu que la majorité des tumeurs de l'ovaire sont épithéliales un des débats concernant la carcinogénèse ovarienne se concentre sur la compréhension des mécanismes qui gouvernent la biologie des cellules épithéliales de surface. Il y a eu plusieurs spéculations pendant des années amenant à penser que l'ovulation est au centre de ce processus. Une hypothèse fut avancée spéculant que les ovulations incessantes pour la femme constitueraient un facteur important dans la carcinogénèse de l'épithélium de surface ovarien (Fathalla, 1971). Plusieurs expérimentations et études épidémiologiques (sections 1.3) tendent à soutenir la validité de ce concept. Ces études ont démontré la relation entre la nulliparité et le risque de

cancer de l'ovaire (Negri et al., 1991; Whittemore et al., 1992) ainsi qu'elles ont montré que le risque diminue avec la durée de l'utilisation de contraceptifs oraux. De plus des études cliniques ont montré que le risque de cancer de l'ovaire est augmenté chez les femmes ayant utilisé des médicaments fertilisants, c'est à dire l'induction d'ovulations pendant des périodes prolongées (Rossing et al., 1994; Whittemore et al., 1992). Le fait que le cancer de l'ovaire se manifeste plus fréquemment à la fin de la vie reproductive, après un nombre maximal d'ovulation, a également été cité pour supporter l'hypothèse du rôle de l'ovulation dans l'initiation de la maladie; de même a été évoqué le fait que l'ovulation se fait plus souvent sur l'ovaire droit et lorsque le cancer est diagnostiqué au stade unilatéral il est plus fréquent sur cet ovaire (Lowry et al., 1991).

La question est de savoir quel est l'impact de l'ovulation sur les cellules de l'épithélium de surface et comment elle influence leur transformation maligne. Il y a maintenant de plus en plus d'évidences qui suggèrent que ces cellules, à travers la production d'enzymes protéolytiques, participent à la rupture du follicule pour l'ovulation. La plaie ainsi créée à la surface de l'ovaire va être réparée par des cycles contrôlés de mitoses des cellules de surface. Il va sans dire que la réplication de l'ADN est à la base d'accumulation de mutations dont certaines vont mener à la transformation maligne (Testa et al., 1994). De plus, quand les cellules épithéliales se trouvent enfouies dans le cortex ovarien où elles peuvent proliférer pour former des inclusions kystiques, elles se trouvent plus proches des composantes qui produisent des hormones et des facteurs de croissance. Ces molécules peuvent être des mitogènes ou des morphogènes qui peuvent influencer l'activité mitotique répétée de l'épithélium de surface (Radisavljevic, 1977). Il est aussi intéressant de noter

que l'épithélium de surface de l'ovaire ne prolifère pas de manière caractéristique des cellules souches, donnant lieu à des cellules différenciées qui ont perdu leur potentiel de division. Les divisions des cellules épithéliales de l'ovaire vont plutôt produire des cellules filles avec un potentiel de croissance ultérieure identique. Par conséquent, si une mutation somatique survient dans un gène donné, cette anomalie est transmise à une population cellulaire dont l'expansion est presque exponentielle. Il s'en suit que plus une population de cellules est importante plus il y aura de probabilités qu'une deuxième mutation survienne dans l'autre allèle du gène ce qui rejoint le scénario classique de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur.

1.2 Classification histologiques des tumeurs épithéliales de l'ovaire

Parmi les sous-types histologiques des tumeurs épithéliales de l'ovaire, on retrouve le type séreux qui représente 46% des tumeurs primaires de l'ovaire (50% sont bénignes, 17% borderlines et 33% malignes), le type mucineux constituant 36% des tumeurs primaires, (80% sont bénignes, 16% borderlines et 5% malignes). Le type endométrioïde représente 8%des tumeurs primaires de l'ovaire, alors que les tumeurs à cellules claires se retrouvent dans 3% des tumeurs primaires et sont généralement malignes. Les tumeurs de Brenner sont plutôt rare (1% des tumeurs de l'ovaire) et rarement malignes. Viennent ensuite les tumeurs indifférenciées qui sont des carcinomes primaires qui ne démontrent aucune évidence de différenciation. (Ozols et al., 1992).

1.2.1 Stratification du cancer épithélial de l'ovaire

Actuellement la stratification la plus souvent utilisée est celle de la Fédération internationale des gynécologues obstétriciens (FIGO). Le cancer épithélial de l'ovaire est classifié selon: 1) le type cellulaire qui donne lieu à un sous-type histologique 2) le grade et 3) la quantité de maladie résiduelle.

Le grade des tumeurs est défini par l'état de différenciation cellulaire qui amène à des tumeurs malignes qui peuvent être bien différenciées: (grade I), modérément différenciées: (grade II) ou peu différenciées: (grade III). Le stade de la maladie ainsi que la maladie résiduelle au moment de la chirurgie confèrent une valeur pronostique clinique (voir Table 1).

1.2.2 Mode de présentation

La manifestation clinique la plus commune du cancer épithélial de l'ovaire est qu'il atteint les femmes post-ménopausées, se manifeste par des symptômes très vagues et s'étend dans la cavité péritonéale aboutissant à des implantations sur les surfaces péritonéales avec formation d'ascite (Morrow and Townsend, 1987). Cet ascite apparaît dans 1/3 des cas et consiste en un exsudat volumineux constitué d'une fraction cellulaire épithéliale se détachant de la tumeur solide avec laquelle elle partage des marqueurs antigéniques de surface cellulaire, et d'une fraction riche en facteurs de croissance (Provencher et al., 1993; Rubin et al., 1991). Depuis quelques années on reconnaît une forme familiale du cancer épithélial de l'ovaire qui concerne 5 à 10% des cas qu'on va aborder dans les sections suivantes.

Table 1 Classifications anatomo-cliniques des cancers des ovaires

Stades FIGO	Caractéristiques
I	Tumeur limitée aux ovaires
IA	Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte
IB	Tumeurs des deux ovaires, capsules intactes
IC	Rupture capsulaire ou tumeur à la surface ovarienne ou cellules malignes dans le liquide de l'ascite ou du lavage péritonéal
II	Tumeur ovarienne étendue au pelvis
IIA	Extension à l'utérus et/ou trompe
IIB	Extension aux autres organes pelviens
IIC	Extension pelvienne avec cellules malignes dans le liquide de l'ascite ou de lavage péritonéal
III	Métastases péritonéales au-delà du pelvis et /ou adénopathie métastatiques régionales
IIIA	Métastases péritonéales microscopiques
IIIB	Métastases macroscopiques <2cm
IIIC	Métastases macroscopiques >2cm et/ou adénopathies métastatiques régionales
IV	Métastases à distance (autres que les métastases péritonéales)

1.3 Facteurs de risque ou de protection du cancer de l'ovaire sporadique

1.3.1 Facteurs reproducteurs

Des études épidémiologiques ont démontré que les grossesses diminuent l'apparition de cancer de l'ovaire alors que la nulliparité l'augmente (Adami et al., 1994; Harris et al., 1992; Negri et al., 1991; Whittemore et al., 1992). D'autres données ont démontré une diminution du risque pour les femmes ayant allaité (Gwinn et al., 1990; Whittemore et al., 1992). La ménopause tardive serait un facteur de risque car, comme la puberté précoce, elle augmente le nombre d'années d'ovulation (Hall et al., 1992). Par contre la prise de contraceptifs oraux serait un facteur protecteur. Cette protection semble augmenter avec la durée de la prise de pilule contraceptive (Booth et al., 1989; Franceschi et al., 1991; Hankinson et al., 1992; Hankinson et al., 1994; Harris et al., 1992; Whittemore et al., 1992). Des données récentes telles que des traitements de l'infertilité indiquent un risque accru de développer un cancer de l'ovaire (Harris et al., 1992; Whittemore et al., 1992).

1.3.2 Facteurs environnementaux

L'alimentation a fait l'objet de nombreuses études pour déterminer l'implication de la nutrition comme facteur de risque dans la survenue du cancer épithélial de l'ovaire. Une diète riche en matières grasses d'origine animale a été associée à une élévation du facteur de risque (La Vecchia et al., 1987; Mori et al., 1988). À l'opposé l'apport en légumes et fibres diminue le risque (La Vecchia et al., 1987; Shu et al., 1989) en particulier le bêta-

carotène (Engle et al., 1991; Slattery et al., 1989). D'autres facteurs ont également été examinés tels le café, le thé, et, l'alcool alors qu'aucune association n'a été établie pour le café ou le thé (Polychronopoulou et al., 1993), pour l'alcool les résultats restent variables (Hartge et al., 1989; La Vecchia et al., 1987).

Il y a peu de données dans la littérature traitant sur les antécédents pathologiques personnels et leur lien avec le cancer épithélial de l'ovaire. Cependant certaines données semblent attribuer un effet protecteur à l'hypothyroïdie et l'asthme (ou son traitement) alors que des antécédents d'irradiation pelvienne et la présence de polypes du col de l'utérus augmentent le risque de développement du cancer ovarien (Cramer, 1990; Hartge et al., 1989; Tzonou et al., 1984)

Le tabac a été considéré comme un facteur de risque. Cependant plusieurs études menées sur ce sujet n'ont pu établir de lien entre l'exposition au tabac et le cancer de l'ovaire (Booth et al., 1989; Hartge et al., 1989; Polychronopoulou et al., 1993). Par contre l'utilisation du talc dans l'aire génitale est considérée comme un facteur de risque qui augmente avec la fréquence d'utilisation (Booth et al., 1989; Chen et al., 1992).

1.4 Prédispositions héréditaires au cancer de l'ovaires

La majorité des cas de cancer épithélial de l'ovaire surviennent en absence d'histoire familiale ou de relation avec un syndrome donné. Cependant les antécédents familiaux de cancer sont un facteur de risque établi. Lorsqu'une parente du premier ou deuxième degré est atteinte de

cancer de l'ovaire le risque de développer ce cancer est élevé (Parazzini et al., 1992; Schildkraut et al., 1989; Schildkraut and Thompson, 1988). Le risque est encore plus important si le cancer de l'ovaire apparaît avant 55 ans (Houlston et al., 1992). Le cancer du sein semble également augmenter ce risque (Schildkraut et al., 1989). D'autres cancers ont été associés avec une augmentation du risque de développement du cancer de l'ovaire tels que le cancer de l'endomètre (Hartge et al., 1989; Houlston et al., 1992) et les cancers digestifs (Houlston et al., 1992).

10% des cancers de l'ovaire se trouvent en association avec des syndromes héréditaires. Ces syndromes correspondent à des prédispositions héréditaires aux cancers ovariens à site spécifique (Liede et al., 1998; Sobol et al., 1993) définies par l'existence dans une branche familiale d'au moins trois cas de cancers de l'ovaire. Ces syndromes ne sont que très rarement décrits, et dans certains cas attribués à une mutation germinale dans le gène *BRCA1*. Le deuxième syndrome associé au cancer de l'ovaire constitue une prédisposition héréditaire aux cancers sein/ovaires (HBOC) défini par l'existence dans une famille du cancer du sein (3 cas de cancers du sein chez des femmes jeunes) de deux cancers primaires de l'ovaire ou plus (Narod et al., 1991). C'est une prédisposition dominante aux cancers du sein et de l'ovaire attribuée à des mutations germinales dans les gènes de susceptibilité au cancer du sein *BRCA1* (Ford et al., 1994; Miki et al., 1994; Tonin et al., 1995) et *BRCA2* (Gayther and Ponder, 1997). Le syndrome de Lynch de type II associe au cancer du colon non polypeux (HNPCC) des cancers de l'endomètre, des voies biliaires, de l'appareil urinaire, de l'estomac, de l'intestin grêle mais aussi des ovaires (Lynch et al., 1991). Finalement les tumeurs de l'ovaire ont également été associées à des maladies héréditaires et des

syndromes plus rares. L'étude moléculaire de tous ces syndromes révèle qu'à l'exception de *p53*, des mutations dans les gènes impliqués dans le HBOC et HNPCC sont rarement décrites dans le cancer de l'ovaire sporadique (Foster et al., 1996; Futreal et al., 1994; Hosking et al., 1995) laissant penser que ces gènes ne jouent pas un rôle significatif dans le développement de la maladie sporadique de l'ovaire.

1.5 Anomalies génétiques dans le cancer de l'ovaire

1.5.1 Les oncogènes et les gènes suppresseurs

Les gènes responsables du cancer peuvent être divisés en deux catégories. Les gènes qui agissent de façon dominante pour la transformation cellulaire sont les oncogènes. Par exemple, il peut s'agir d'une augmentation de l'expression ou l'expression d'une version mutée ou plus active du gène. Le cancer peut également résulter de la perte de l'expression d'un gène. Ces gènes sont décrits comme des gènes suppresseurs de tumeurs généralement impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire.

1.5.2 les gènes suppresseurs

Une façon d'identifier des gènes suppresseurs a été l'utilisation d'études génétiques de certains cancers héréditaires et syndromes tumoraux humains ou des mutations germinales dans ces gènes prédisposant les membres de la même famille au même type de cancers. Ces événements génétiques peuvent également survenir de façon sporadique en raison de mutations somatiques. Les premières évidences de l'existence de gènes

suppresseurs sont apparues en 1970 par Knudson lors de l'analyse statistique sur 48 rétinoblastomes héréditaires. En se basant sur cette étude, il émet l'hypothèse que le rétinoblastome et possiblement d'autres cancers héréditaires résultent de l'inactivation des deux copies d'un gène récessif dans une cellule donnée. Une copie est inactivée par une mutation somatique ou germinale, et la copie restante subit une mutation durant la vie de l'individu. C'est ce qu'on appelle l'hypothèse de "two hits".

Plusieurs approches sont utilisées maintenant pour identifier des gènes suppresseurs. Deux approches ont été utilisées de façon usuelle pour détecter des délétions dans les cellules tumorales (qui sont une indication de localisation de gènes suppresseurs): l'analyse de karyotype et l'analyse de perte d'hétérozygotie (LOH). Les karyotypes démontrent généralement plusieurs anomalies structurales et numériques qui peuvent varier d'une cellule à une autre au sein de la même tumeur. Cependant la présence d'anomalies clonales de façon consistante communes à plusieurs spécimens tumoraux identifie un événement considéré comme primaire dans le développement du cancer. Dans le cas de délétions, la présence de gènes suppresseurs est soulevée. L'avenue de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), avec utilisation de plusieurs fluorochromes a amélioré la détection et la définition des anomalies chromosomiques de façon précise (Speicher et al., 1996).

Les analyses de LOH en utilisant des sondes ou des marqueurs polymorphiques pour détecter des pertes alléliques dans l'ADN tumoral comparé à celui des tissus normaux a été utilisé depuis longtemps pour détecter des délétions chromosomiques (Cavenee et al., 1983). Quand un

marqueur démontre une perte d'hétérozygotie dans la tumeur ceci est considéré comme une délétion du locus de ce marqueur au niveau du chromosome. Cette technique contrairement à la précédente, ne nécessite pas de cellules mitotiques parfois difficiles à obtenir des spécimens tumoraux, et évite l'analyse de réarrangements chromosomiques souvent très complexes dans les tumeurs. La disponibilité maintenant d'un nombre considérable de marqueurs polymorphiques de type microsatellites pour tous les chromosomes a grandement augmenté la résolution de l'analyse par LOH et a permis l'identification de régions délétées de façon homozygote dans les cancers. Les délétions homozygotes sont souvent considérées comme des régions cibles de localisation de gènes suppresseurs où les deux allèles de ces gènes sont perdus par délétion. Des efforts considérables ont été par la suite déployés pour améliorer différentes techniques de biologie moléculaires et les adapter à l'analyse ou à la détection de gènes suppresseurs de tumeurs. On retrouve la réaction de polymérase en chaîne (PCR) médiée par des marqueurs microsatellites, et la technique d'étagage différentiel.

Une approche alternative de localiser un gène suppresseur est de procéder à la technique de fusion cellulaire, dans laquelle on observe la perte du caractère tumorigénique de la cellule lorsqu'elle est fusionnée à une cellule normale. Au début de l'utilisation de cette technique bien que la suppression de la tumorigénicité était bien établie, il était difficile de localiser les gènes responsables de cette suppression car les hybrides cellulaires utilisés étaient constitués de cellules entières. Cette technique a été améliorée par l'utilisation de "microcellules" qui permettent le transfert d'un unique chromosome ou même des fragments chromosomiques dans les cellules tumorales (Fournier and Ruddle, 1977). L'abolition de la tumorigénicité de la cellule est étroitement

liée à la présence de chromosomes spécifiques qui portent des gènes suppresseurs de tumeurs.

1.5.2.1 Le gène *Rb*

Le gène *Rb* est le premier gène suppresseur identifié. *Rb* est localisé sur la bande 13q14, s'étale sur 200Kb et code pour une phosphoprotéine nucléaire de 105 à 110 Kd. En plus du rétinoblastome des mutations dans ce gène ont été détectées dans les ostéosarcomes, dans les cancers de la vessie, de la prostate, du sein, du poumon à petites cellules, des leucémies et du cancer du col de l'utérus. La fréquence de mutation dans ces cancers varie considérablement; cependant des mutations dans le gène *Rb* sont retrouvées dans tous les rétinoblastomes (Kloss et al., 1991) et la plupart des cancers pulmonaires à petites cellules (Mori et al., 1990) suggérant que l'inactivation de la fonction de ce gène est une étape obligatoire dans le développement de ces cancers. En revanche, dans le cancer de l'ovaire, les analyses d'expression ont démontré que la perte de l'expression du gène *Rb* n'est pas un événement fréquent ce qui lui confère un rôle seulement secondaire qui ne peut être considéré comme essentiel dans le développement du cancer de l'ovaire (Kim et al., 1994; Sasano et al., 1990).

1.5.2.2 Le gène *P53*

Le gène *P53* se localise sur la bande 17p13.1, s'étale sur 20 Kb et code pour une phosphoprotéine nucléaire qui lie l'ADN à des sites spécifiques. La protéine est constituée de trois régions importantes. La région N-terminale qui comprend le domaine d'activation, la région centrale responsable de la

liaison à l'ADN qui renferme la majorité des mutations rencontrées dans les cancers humains (Hollstein et al., 1991) et une région C-terminale qui est responsable de l'homo-oligomérisation nécessaire à son activité. Dans les cellules normales les taux de *P53* sont tenus à des bas niveau. Par contre en réponse à différents dommages à l'ADN incluant les brisures double brins produites par des irradiations γ , la présence dans l'ADN d'intermédiaires de réparation causés par les ultraviolets et des dommages causés par des agents chimiques, il en résulte une rapide augmentation des niveaux de *P53* et de son activation comme facteur de transcription. Il se produit alors un arrêt des cellules en G1 où les cellules vont réparer l'ADN avant de passer à la phase S, ou si les dommages sont trop importants il y a déclenchement de l'apoptose. En revanche les cellules dépourvues en *P53* ne font pas cette pause en G1 et rentrent dans la phase S avec de l'ADN endommagé. Ceci aura des répercussions sur le taux de mutations dans le génome et l'instabilité génétique avantagera l'initiation de la tumorigénèse. Ainsi par sa fonction comme point-contrôle dans la phase G1, *P53* a été considéré comme le gardien du génome (Lane, 1992). Il existe plusieurs gènes qui sont la cible de l'activation transcriptionnelle par *P53* dont la fonction est soit reliée au cycle cellulaire et/ou la réparation de l'ADN ou à l'apoptose comme *p21/WAF*, *GAD45*, *CyclineG*, *BAX*, *IGFBP3*, *Rb* et *MDM2* (Levine et al., 1994).

L'inactivation de *P53* représente l'altération génétique la plus commune retrouvée dans les cancers humains. Plusieurs mécanismes différents peuvent aboutir à l'inactivation de *P53* et parmi les plus communs dans les cancers sont les mutations dans le gène *P53*. Des mutations en *P53* sont généralement des mutations ponctuelles et mènent à l'altération de la structure protéique et confèrent à la protéine une surexpression et une demi-

vie plus longue. De plus la protéine mutante peut former un complexe avec la protéine de type sauvage et inhiber sa fonction, ce qui suggère que la forme mutante peut agir comme dominant négatif (Levine et al., 1994). Les mutations en *P53* ont été retrouvées dans 90% des cancers pancréatiques, 60% des cancers du colon, 50% dans les cancers bronchiques et 25% des cancers du sein (Hollstein et al., 1991). Dans le cancer des ovaires les mutations dans le gène *P53* ont été observées à différentes fréquences allant de 30% à 70% (Eccles et al., 1992; Kohler et al., 1993; Marks et al., 1991; Mazars et al., 1991; Okamoto et al., 1991). Aucune de ces études, vu le nombre limité d'échantillons, n'a établi de corrélation entre *P53* et les aspects clinicopathologiques du cancer de l'ovaire. Par contre des mutations et la surexpression de *P53* ont rarement été retrouvées dans les tumeurs bénignes ou de faible potentiel de malignité, ce qui en fait un événement tardif dans la maladie (Berchuck et al., 1994; Kohler et al., 1993).

Deux groupes ont pris avantage des mutations en *P53* pour déterminer la clonalité du cancer épithélial de l'ovaire. Dans les deux études, ils ont démontré que les tumeurs primaires bilatérales de l'ovaire et les implants métastatiques au niveau du péritoine de la même patiente révèlent le même profil de mutations au niveau du gène *P53*. Ceci a conduit les deux groupes à conclure que le cancer de l'ovaire épithélial est monoclonal (Jacobs et al., 1992; Mok et al., 1994). Nous avons aussi pris avantage de l'apparition des mutations dans le gène *P53* pour déterminer la relation entre les cellules dans la tumeur solide et l'ascite ovarien chez la même patiente comme décrit par les autres groupes. Nous avons observé d'abord les mêmes mutations dans les deux ovaires de la même patiente, ce qui supporte l'idée de clonalité des tumeurs solides. Par contre nous avons noté une discordance dans le profil

des mutations dans les ascites ovariens et leurs tumeurs solides correspondantes. Dans deux cas les cellules épithéliales d'ascite portent des mutations en *P53* alors que les tumeurs solides correspondantes n'en ont pas, et le cas opposé a également été observé. Ceci suggère que le profil des mutations en *P53* peut être différent dans les tumeurs solides et les ascites correspondants. Ces données suggèrent également que les mutations en *P53* peuvent se produire après l'émergence des ascites puisque leur profil de mutations en *P53* ne concorde pas avec celui des tumeurs solides correspondantes (Provencher et al., 1997).

1.5.3 Les oncogènes

Au début, connaissances acquises sur les oncogènes ont été prises à partir des études sur les rétrovirus. Dans plusieurs cas la tumorigénèse a été attribuée à un ou plusieurs gènes transformants, les oncogènes, appartenant au génome viral dont l'activation est responsable de l'initiation et le maintien de la transformation néoplasique induite par l'infection virale. Ceci a commencé lors de la découverte que le gène transformant v-src (virus du sarcome Rous) partage des séquences communes avec le gène cellulaire normal c-src, qu'on appelle proto-oncogène. Plusieurs études moléculaires ont généré des informations concernant les oncogènes et leurs mécanismes d'activation/inactivation comme étant les bases moléculaires dans le modèle de carcinogénèse à plusieurs étapes (Bishop, 1991). Le mode d'action des oncogènes peut être divers, les protéines codées par ces gènes peuvent être groupées en un nombre limité de catégories définies par la localisation cellulaire et leur fonction biochimique. Ces groupes incluent les protéines kinase, les facteurs de croissance, les récepteurs de facteur de croissance, les

protéines liant le GTP, les protéines nucléaires tels que les facteurs de transcriptions et d'autres. Les oncogènes peuvent être activés entre autre par une mutation ponctuelle, un réarrangement chromosomique, une amplification génique ou une surexpression.

1.5.4 Proto-oncogènes impliqués dans le cancer de l'ovaire

Plusieurs groupes ont analysé les oncogènes qui sont susceptibles de jouer un rôle important dans le cancer de l'ovaire. Cependant il n'est toujours pas claire si des oncogènes particuliers sont impliqués, à quel stade de la maladie sont-ils activés et la relation entre le pronostique et l'activation d'oncogènes particuliers. Bien que leur importance reste encore controversée, quelques oncogènes ont été impliqués dans la progression tumorale du cancer épithélial de l'ovaire par l'identification de mutations ou des expressions aberrantes.

La majorité des oncogènes comprennent des gènes qui codent pour des protéines kinase. Ces protéines sont capables d'altérer la fonction de plusieurs protéines à travers la phosphorylation. Il existe deux familles de kinases, celle spécifique aux serine et thréonine (*raf* et *mos*) et celle spécifique au résidu tyrosyl (*abl*, *Neu/HER-2* et *src*). Une simple surexpression par exemple d'un récepteur avec une activité tyrosine kinase est suffisante à induire le phénotype transformé dans une culture cellulaire immortelle. C'est le cas de *Neu/HER-2* dans les cellules NIH3T3, qui fait partie de la famille de récepteur de EGF. Le proto-oncogène *Neu/HER-2*, également appelé *erbB-2*, code pour une protéine tyrosine kinase sous forme de récepteur de la famille EGF caractérisé par la présence d'un domaine transmembranaire unique. Ce

gène a été identifié par son amplification dans le cancer mammaire (King et al., 1985) et sa parenté avec les récepteurs de la famille EGF (Schechter et al., 1985; Semba et al., 1985). Plusieurs études ont établi un lien entre la surexpression et /ou l'amplification de *Neu* et la transformation néoplasique ainsi que le développement de cancer à partir de différents tissus comprenant le sein (Kraus et al., 1987; Slamon et al., 1989; van de Vijver et al., 1987) et l'ovaire (Slamon et al., 1989). Cette amplification se manifeste au niveau du cancer de l'ovaire à une fréquence de 9% à 32% (Goff et al., 1996; Meden and Kuhn, 1997) De plus cette surexpression semble être associée à un mauvais pronostic (Meden et al., 1997) quoique ces conclusions restent encore controversées.

Le proto-oncogène *c-myc* est l'homologue du gène *v-myc* du virus myelocytomatose et code pour une phosphoprotéine nucléaire qui semble avoir plusieurs fonctions cellulaires, entre autre la régulation transcriptionnelle et la régulation de la croissance cellulaire. *c-Myc* est un membre de la famille multigène qui compte comme membre *N-,L-,P-,R-,B-myc* qui sont reliés en terme de structure et de fonction (Boles and Hogan, 1987). Dans plusieurs tumeurs l'activation de *c-myc* a été attribuée à des mutations ponctuelles, des amplifications ou des translocations. L'amplification de ce gène a été identifiée dans plusieurs types de tumeurs tel que le cancer du sein (Watson et al., 1996), le poumon (Garte, 1993) et les neuroblastomes (Feng et al., 1997). Cette amplification est particulièrement commune aux cancers du sein et du poumon où elle se produit à une fréquence de 30% (Demoly et al., 1994; Gazzeri et al., 1991; Tavassoli et al., 1989). Deux groupes ont rapporté l'amplification du gène *c-Myc* dans le cancer de l'ovaire à une fréquence de 20% à 37% (Berchuck et al., 1994; Schreiber and Dubeau, 1990).

Les gènes *ras* (*Hras*, *Kras*, *Nras*) codent pour des protéines liant le GTP qui transduisent des signaux mitogéniques des récepteurs tyrosine kinase. Les analyses du gène *ras* dans différents cancers ont établi que les mutations ponctuelles qui activent le gène de façon constitutive sont fréquentes dans les cancers humains. Ces mutations constituent un mode universel de l'activation de *ras* qui se manifeste à une fréquence de 25% dans les leucémies myéloïdes et cancer du poumon, 50% dans le cancer du colon, et 90% dans le cancer du pancréas (Bos, 1989). Des amplifications ou des mutations somatiques de *Hras* ou *Kras* ont été détectées à des fréquences allant de 20% à 50% dans les tumeurs d'ovaire à faible potentiel de malignité (Mok et al., 1993; Teneriello et al., 1993).

1.6 Chromosome 3 et le cancer

De multiples aberrations numériques et structurales ont été identifiées en cytogénétique au niveau du chromosome 3 dans une grande variété de cancers humains. Des analyses moléculaires basées soit sur des LOH ou des transferts de gènes ont confirmé ces aberrations. Il devient de plus en plus évident que le chromosome 3 est le plus affecté dans les tumeurs d'origine épithéliale. En effet une étude extensive menée sur l'analyse des changements génétiques dans les néoplasies d'origine épithéliale démontre que 47% des délétions observées dans ces différents cancers se retrouvent sur le bras court du chromosome 3. Les altérations sur le chromosome 3 viennent juste après le chromosome 17 qui contient entre autre le gène *P53* impliqué dans une grande variété de cancers humains (Rodriguez et al., 1994). Beaucoup d'efforts ont été investis durant les dernières années pour

distinguer différentes régions de délétions au niveau du bras court du chromosome 3 au sein de différentes tumeurs.

Dans le cancer du poumon la majorité des délétions semblent être interstitielles, impliquant les régions 3p14-p23 et affectent aussi bien les tumeurs de type SCLC que celle de type NSCLC (Hibi et al., 1992). En plus de la haute fréquence de perte d'allèles dans les différents types histologiques du cancer du poumon, cet événement semble être précoce dans la pathogénèse du cancer du poumon (Chung et al., 1995; Gazdar et al., 1994).

Différentes régions de délétions ont également été révélées dans le cancer rein (RCC) où on dénotait plusieurs translocations à savoir la translocation t(3;11) avec un point de cassure en 3p13 (Pathak et al., 1982), la translocation t(3,8) avec un point de cassure en 3p14.2 (Wang and Perkins, 1984) et la translocation t(3;6) avec un point de cassure défini entre 3p13 et 3p14.2 (Kovacs and Frisch, 1989) . Récemment le gène *FHIT* a été cloné à partir de cette région de point de cassure (Ohta et al., 1996). L'implication de ce gène comme gène suppresseur de tumeur sera discutée dans les sections suivantes. Des régions minimales de délétions ont été identifiées dans le cancer rein au niveau de 3p12 (Lubinski et al., 1994), 3p13-14 (Lubinski et al., 1994; Yamakawa et al., 1991) 3p21 (Anglard et al., 1992; Foster et al., 1994; van der Hout et al., 1991) et 3p25-pter (Foster et al., 1994). D'après les analyses de LOH dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou, il semble que le chromosome 3p est l'un des bras chromosomique le plus fréquemment impliqué (Ah-See et al., 1994; Nawroz et al., 1994). Les pertes d'hétérozygoties sont détectées dans 50% à 80% des cas (Ah-See et al., 1994; Ishwad et al., 1996; Maestro et al., 1993; Nawroz et al., 1994). Le profil

des pertes alléliques ressemblent étroitement à celui observé dans le cancer du rein où trois des régions impliquées sont 3p12-p14.3, 3p21 et 3p25 (Maestro et al., 1993; Partridge et al., 1996; Wu et al., 1994).

L'analyse de pertes d'hétérozygotie dans les adénocarcinomes de l'estomac et de l'œsophage démontre une fréquence de perte d'allèles de 33% en 3p21 et 35% en 3p25 (Ogasawara et al., 1995). De plus ces délétions semblent survenir dans tous les grades histologiques du cancer de l'oesophage (Mori et al., 1994). Ces délétions ont également été observées dans les lésions pré-néoplasiques de l'œsophage (Shimada et al., 1996).

En général les pertes d'allèles sur le chromosome 3p ont été détectées dans 30% à 56% des tumeurs informatives du sein (Ali et al., 1989; Chen et al., 1994; Devilee et al., 1989; Devilee et al., 1991). Deux régions de délétions ont également été définies: la première en 3p13-14.3 (Chen et al., 1994; Sato et al., 1991) et la deuxième en 3p24-26 (Chen et al., 1994). Ces altérations qui se manifestent également dans certains cas de tumeurs bénignes prolifératives sont considérées comme des événements précoces dans le cancer du sein. De haute fréquence de perte d'allèles sur le chromosome 3p ont aussi été observées dans tous les stades du cancer du col de l'utérus (Chung et al., 1992; Mitra et al., 1994; Yokota et al., 1989)

Toutes ces données suggèrent que le chromosome 3p peut contenir un ou plusieurs gènes suppresseurs qui seraient importants dans le processus de plusieurs cancers humains.

1.6.1 Gènes suppresseurs candidats localisés sur le bras court du chromosome 3

Plusieurs gènes localisés sur le bras court du chromosome 3 ont été suggérés pour agir comme des gènes suppresseurs dans le développement du cancer. Ceci est basé sur plusieurs observations: (1) leur localisation dans une région de délétion commune; (2) la réduction significative des niveaux d'expression, en combinaison avec la présence de transcrits de tailles anormales; (3) la capacité d'abolir la tumorigénécité après transfection dans les cellules tumorales (4) la fonction du produit du gène. Le gène du syndrome de Von Hippel-Lindau (*VHL*) localisé sur le bras court du chromosome 3 est formellement considéré comme étant un gène suppresseur de tumeurs. D'autres gènes localisés sur le chromosome 3 constituent des gènes suppresseurs candidats.

1.6.1.1 Le gène du Von Hippel-Lindau (*VHL*)

La maladie de *VHL* est un syndrome héréditaire qui se présente chez les patients avec des angiomatoses de la rétine, hémangioblastomes cérébraux et spinaux et des cancers du rein (Maher et al., 1990). La principale cause de mortalité dans cette maladie est le cancer du rein (Maher et al., 1990). Le gène *VHL* est localisé sur la bande 3p25 (Maher et al., 1991; Seizinger et al., 1988). Des analyses de tumeurs de différents patients ont démontré la présence de mutations germinales (Chen et al., 1995; Crossey et al., 1994; Crossey et al., 1994; Whaley et al., 1994). De plus l'autre allèle du gène, chez les patients atteints semble perdu dans la plupart des tumeurs (Crossey et al., 1994; Tory et al., 1989) ou inactivé par hyperméthylation

(Herman et al., 1994). Des mutations, pour la plupart survenant dans l'exon 2 du gène *VHL*, ont été identifiées certains cas sporadiques du cancer rein (Foster et al., 1994; Shuin et al., 1994; Whaley et al., 1994) et dans les lignées cellulaires du cancer du rein (Gnarra et al., 1994; Whaley et al., 1994). D'autre part l'introduction de la version sauvage de ce gène dans les lignées cellulaires du cancer rénal démontre qu'il est capable d'inhiber la formation de tumeur dans les souris nues (Iliopoulos et al., 1995).

1.6.1.2 Le gène du récepteur type II de TGF β

Le gène codant pour le récepteur type II de TGF β est localisé sur le chromosome 3p22 (Mathew et al., 1994) Il s'agit d'un récepteur serine thréonine kinase qui, ensemble avec le récepteur type I, forment un complexe auquel se lie le TGF β . Le TGF β est un inhibiteur potentiel de la croissance des cellules épithéliales et joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire (Fynan and Reiss, 1993). Ainsi il est capable de supprimer la croissance de certains cancers et lignées cellulaires. Les rôles variés attribués à TGF β dans la régulation de la prolifération et différenciation cellulaire sont généralement médiés à travers les récepteurs type I et II. Par ailleurs la majorité des cancers d'origine épithéliale sont insensibles à l'effet de TGF β . On a en effet remarqué que des lignées cellulaires du cancer de l'estomac résistantes à l'effet inhibiteur de croissance de TGF β , expriment soit des formes tronquées ou des niveaux non détectables d'ARNm du récepteur type II alors que le récepteur type I est normal (Park et al., 1994). Ceci implique que l'altération du gène du récepteur type II est la cause primaire à l'insensibilité à l'égard de TGF- β . Des résultats similaires ont été obtenus avec des lignées cellulaires et des xénogreffes de cancer de côlon humain où on a

observé une réduction significative des niveaux d'expression du récepteur type II associé au phénotype d'absence de réparation des désappariement (RER+) dans l'ADN (Markowitz et al., 1995). Des analyses subséquentes de ces lignées cellulaires ont identifié des mutations causant un changement de cadre de lecture dans le gène du récepteur type II (Parsons et al., 1995). Ces mutations ont également été observées dans des tumeurs RER+ de cancer de côlon non polypeux et du cancer de l'estomac (Lu et al., 1995; Myeroff et al., 1995; Parsons et al., 1995). D'autre part la restauration de l'expression de la version sauvage du gène *TGFBR2* dans la lignée cellulaire MCF7 du cancer du sein restaure la réponse de la lignée à TGF β et réduit la formation de colonies dans l'agarose mou (Sun et al., 1994). Des résultats similaires ont été obtenus avec une lignée du cancer côlon (Wang et al., 1995). Tous ces résultats pris ensemble en plus de sa localisation dans une région chromosomique démontrant une fréquence élevée de perte allélique convergent vers l'idée que *TGFBR2* agit comme un gène suppresseur de tumeur.

1.6.1.3 *THR β* et *RAR β 2*

Le gène *THR β* codant pour l'isoforme β du récepteur de l'hormone thyroïdienne et *RAR β 2* codant pour l'isoforme β 2 du récepteur de l'acide rétinoïque sont localisés sur le chromosome 3p24. Cette région est fréquemment altérée dans les cancers en particulier dans le cancer du sein (Chen et al., 1994) et le cancer de l'ovaire (Ehlen and Dubeau, 1990; Zheng et al., 1991). Bien qu'il n'y ait pas d'évidence moléculaire impliquant le gène *THR β* dans un processus de suppression de tumeur, il reste que c'est un gène candidat intéressant à exploiter dans le cancer du sein et de l'ovaire. En effet

les analyses de LOH dans le cancer de l'ovaire effectuées dans notre laboratoire (Lounis et al., 1998), ainsi que des travaux d'autres groupes au niveau de la région où se situe ce gène (Dodson et al., 1993; Ehlen and Dubeau, 1990; Zheng et al., 1991) semblent indiquer que cette région peut abriter des gènes suppresseurs de tumeur.

Le gène *RARB2* est un membre de la famille de gène récepteur de l'acide rétinoïque. Son expression est induite par l'acide rétinoïque. Ce dernier a depuis longtemps été impliqué dans la suppression du processus de transformation maligne induite par des agents chimiques (Sporn et al., 1977). La découverte des récepteurs de l'acide rétinoïque a de plus en plus éclairé les mécanismes d'action des rétinoïdes car ce sont les principaux médiateurs de ses effets. Un candidat potentiel pour l'exécution de ces effets est le *RARB2*. En effet les niveaux d'expression se trouvent altérés dans plusieurs lignées cellulaires dérivées de différents cancers. Ceci est vrai pour le cancer du sein (Jing et al., 1996; Swisshelm et al., 1994), le cancer pulmonaire de type épidermoïde (Gebert et al., 1991; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991), le cancer de la tête et du cou (Zou et al., 1994) et le cancer rénal (Hoffman et al., 1996). De plus d'autres travaux ont démontré que la restauration de l'expression du gène *RARB2* dans des cellules de cancer de poumon épidermoïdes a pour conséquence la réduction de la croissance cellulaire *in vitro* et la tumorigénèse *in vivo* (Houle et al., 1993). D'autre part l'expression de constructions antisens de *RARB2* dans des souris transgéniques semble contribuer à la formation de tumeurs pulmonaires (Berard et al., 1994). Le gène *RARB2* reste particulièrement intéressant dans la perspective du cancer épithélial de l'ovaire car il se trouve localisé dans une région qui démontre un

taux élevé de LOH dans ce cancer (Dodson et al., 1993; Ehlen and Dubeau, 1990; Lounis et al., 1998; Zheng et al., 1991).

1.6.1.4 *FHIT* et *PTPasey*

Ces deux gènes candidats se situent sur une région chromosomique très particulière du chromosome 3: la bande 3p14. Cette dernière contient le point de cassure t(3;8) (Cohen et al., 1979) associé avec le cancer du rein et le site fragile FRA3B. La région de translocation t(3;8) n'a pas encore été associée à un gène particulier (Boldog et al., 1993). Les sites fragiles représentent des régions qui vont démontrer des élongations, des trous et des brisures dans des cultures cellulaires (Sutherland, 1991). Le site fragile en 3p14.2 est le plus commun des sites fragiles chez l'humain et semble cerner une région de 200 Kb (Boldog et al., 1994). Il ne semble pas y avoir des séquences spécifiques qui seraient responsables de cette fragilité. Il a été suggéré que les sites fragiles pourraient être préférentiellement impliqués dans des événements de translocation ou de délétion chromosomiques et ceci peut jouer un rôle dans le développement du cancer (Glover and Stein, 1988; Yunis and Soreng, 1984). Le gène *FHIT* (Fragile histidine triad) s'étalant sur 500 Kb a été cloné dans cette région. Le site fragile coïncide avec le 5^{ème} exon et 5^{ème} intron alors que le point de translocation t(3;8) coïncide avec le 3^{ème} intron du gène *FHIT*. Sur la base de sa localisation, le gène *FHIT* a été au début avancé comme étant un solide candidat impliqué dans le développement de différents types de cancers. Les analyses des niveaux d'expression de ce gène dans différents types de cancers ont démontré la présence de transcrits de tailles irrégulières mais généralement accompagnés du transcrit normal. De plus la présence de ces transcrits de tailles irrégulières

est aussi retrouvée dans les lignées cellulaires non tumorigéniques ou non immortelles (van den Berg et al., 1997). Des résultats similaires ont été obtenus dans l'analyse de l'expression de *FHIT* dans le cancer épithélial de l'ovaire (Manning et al., 1998). Ceci n'est pas surprenant puisque ce gène contient des séquences du site fragile FRA3B, qui serait responsable de cette instabilité ou d'un épissage irrégulier donnant lieu à des ARNm de tailles différentes. Il semble donc de plus en plus évident à reconsidérer ce gène comme suppresseur de tumeur. Des évidences expérimentales dans des essais fonctionnels comme la réintroduction de la version sauvage de ce gène dans des lignées cellulaires ayant perdu son expression normale sont indispensables pour démontrer son rôle de gène suppresseur dans la pathogénèse du cancer (Le Beau et al., 1998).

Le gène *PTPasey* code pour une protéine de type récepteur tyrosine phosphatase (Kaplan et al., 1990) localisé au niveau 3p14.2 (Tory et al., 1992). Les protéines tyrosine phosphatase sont des enzymes qui déphosphorylent des résidus tyrosine des protéines et donc vont inverser l'effet des protéines kinase qui généralement agissent comme des oncogènes. Les phosphatases sont donc conceptuellement soupçonnées d'être des gènes suppresseurs. Les niveaux d'expression de ce gène dans certaines lignées cellulaires de cancer de poumon se sont avérés très bas ou même non-déTECTABLES alors que les niveaux d'expression dans le tissu normal du poumon sont très élevés (Tsukamoto et al., 1992). Cependant l'analyse des mutations dans ce gène n'a pas révélé de mutations dans les domaines catalytiques des phosphatases.

1.7 Anomalies génétiques dans le cancer épithélial de l'ovaire

L'analyse des karyotypes du cancer épithélial de l'ovaire a permis d'identifier des aberrations numériques et structurales très fréquentes au niveau des chromosomes 1, 3, 6, 17 et 19 accompagnées d'altérations moins fréquentes dans les chromosomes 2, 4, 5 et 21 (Bello and Rey, 1990; Gallion et al., 1995; Huber et al., 1990; Pejovic et al., 1992; Roberts and Tattersall, 1990; Tanaka et al., 1989; Trent and Salmon, 1981; Whang-Peng et al., 1984). Bien que ces karyotypes se sont révélés souvent complexes et hétérogènes des délétions et réarrangements ont été identifiés de façon consistante au niveau des chromosomes 1, 3 et 6 avec des points de cassure au niveau 1p34p36, 1q21-23, 3p12-p21 et 6q15-q23. Une translocation spécifique, t(6;14) (q21;24) a été observée dans une série d'adénocarcinomes séreux de l'ovaire (Trent and Salmon, 1981). D'autres anomalies ont également été mentionnées pour les chromosomes 7 et 19 (Pejovic et al., 1992).

Le développement des marqueurs génétiques polymorphiques a fourni de plus en plus de sondes précises pour détecter des altérations génétiques. L'identification de pertes d'hétérozygotie à des loci alléliques spécifiques a été rapporté dans plusieurs cancers humains. L'analyse d'allelotype dans le cancer épithélial de l'ovaire a démontré une fréquence de LOH de plus de 30% pour les chromosomes 3p, 6p, 6q, 7p, 8q, 11p, 12q, 13q, 16p, 17p, 17q, 18q, 19p et Xp (Dodson et al., 1993; Ehlen and Dubeau, 1990; Foulkes et al., 1993; Kiechle-Schwarz et al., 1993; Zheng et al., 1991). Le profil de la perte d'hétérozygotie semble dans certains cas corrélérer avec le grade des tumeurs. Par exemple, les pertes d'hétérozygotie au niveau du chromosome 11p15.1-11p15.5 ont été observées dans 47% des cas de tumeurs malignes et

fortement associées à des tumeurs pauvrement différenciées (Kiechle-Schwarz et al., 1993). Les délétions au niveau des chromosomes 13q et 15 q ont été associées à des tumeurs de grade avancé alors que les délétions au niveau des chromosomes 6q, 13q et 19q semblent corrélérer avec un type histologique de type séreux, suggérant que les pertes d'hétérozygotie peuvent affecter un type histologique spécifique (Dodson et al., 1993). Des délétions microscopiques en 3p dans le cancer de l'ovaire ont été reportées initialement par des analyses cytogénétiques (van der Riet-Fox et al., 1979). Par la suite il a été démontré que les anomalies structurales du chromosome 3 se plaçaient en deuxième position parmi les anomalies les plus fréquemment impliquées dans le cancer de l'ovaire (Bello and Rey, 1990; Whang-Peng et al., 1984). Les analyses de LOH sur le bras court du chromosome 3, avec un nombre limité de marqueurs et de spécimens ont donné lieu à des fréquences de LOH allant de 15% à 27% (Dodson et al., 1993; Sato et al., 1991; Yang-Feng et al., 1993; Zheng et al., 1991). Les délétions en 3p ont été associées en premier lieu à des grades avancés des tumeurs (Zheng et al., 1991), mais par la suite des pertes d'allèles en 3p dans des grades précoces du cancer de l'ovaire ont été rapportées (Dodson et al., 1993) . Cependant aucune étude dans le cancer de l'ovaire n'a établi de façon claire une région de délétion commune bien définie; en revanche ce qui ressort des différentes études de LOH est que les pertes d'hétérozygotie semblent plutôt fréquentes au locus *THRB* au niveau 3p24 (Dodson et al., 1993; Yang-Feng et al., 1993; Zheng et al., 1991).

1.8 Modèle utilisés pour l'étude du cancer épithélial de l'ovaire

Bien que le cancer épithélial de l'ovaire est l'un des cancers gynécologiques le plus étudié, il souffre d'une grande lacune en ce qui

concerne les modèles expérimentaux. Malgré la mise au point de plusieurs méthodes permettant la culture de cellules de l'épithélium de surface de l'ovaire de rat (Adams and Auersperg, 1985) et de lapin (Nicosia et al., 1984), les modèles animaux ont très peu contribué à la compréhension des cancers dérivés de l'épithélium de surface de l'ovaire car les cancers ovariens chez ces animaux sont rarement d'origine épithéliale (Hamilton et al., 1984). De plus, il existe plusieurs différences physiologiques et pathogéniques entre les ces animaux et l'humain. D'autre part l'habileté de propager des cultures cellulaires constitue un développement central du point de vue expérimental dans la recherche sur le cancer. Dans l'étude du cancer épithélial de l'ovaire humain, plusieurs analyses ont été réalisées sur des tumeurs fraîches ou des lignées cellulaires dérivées de cancer de l'ovaire humain qui ont été établies généralement d'ascite d'effusions pleurales de patientes qui ont reçu des traitements de chimiothérapie. (Alama et al., 1996; Bast et al., 1981; Buller et al., 1995; DiSaia et al., 1975; Fogh and Trempe, 1975; Golombick and Bezwoda, 1991; Golombick et al., 1990; Grunt et al., 1993; Hamilton et al., 1983; Hirte et al., 1994; Langdon et al., 1988; Provencher et al., 1993; Sinna et al., 1979; Wong et al., 1990; Yamada et al., 1991). Il existe seulement quelques lignées cellulaires établies à partir de tumeurs primaires solides de l'ovaire (Crickard et al., 1989; Langdon et al., 1988; Woods et al., 1979) ou de métastases ovariennes (Buick et al., 1985). La disponibilité d'un plus large répertoire de lignées ou de culture primaires de l'ovaire couvrant un maximum d'étapes et de types histologiques de la maladie semble de plus en plus nécessaire voir même essentielle pour effectuer des analyses moléculaires et des corrélations avec des paramètres cliniques.

1.9 But de la thèse

Il est vrai que la fréquence du cancer de l'ovaire est relativement faible. Aux Etats Unis on compte 20 000 nouveaux cas chaque année par rapport au cancer du sein qui représente environ 180 000 nouveaux cas chaque année. Cependant sur ces 20 000 cas, 15 000 femmes vont mourir chaque année (Brinton, 1992; De Vita, 1993) alors qu'on compte 46 000 décès annuels pour le cancer du sein (Wingo, 1995). Donc le cancer du sein a une fréquence 9 fois plus élevée mais provoque juste 3 fois plus de décès que le cancer de l'ovaire qui se caractérise par une très forte mortalité d'où l'importance de la recherche sur le cancer de l'ovaire. L'étude moléculaire du cancer de l'ovaire et le développement de modèles pour l'étude de cette maladie va permettre de mieux comprendre les différentes étapes requises, nous indiquer les gènes responsables et nous fournir des indications sur les régions chromosomiques qui contiendraient des gènes critiques au développement et à la progression de la pathologie ovarienne. L'élaboration de la recherche surtout fondamentale sur le cancer de l'ovaire épithélial a été limitée par le manque de modèles appropriés.

L'objectif primaire dans cette thèse était de mettre au point un modèle efficace et fiable pour pouvoir mener des études moléculaires et physiologiques à long terme et de façon reproductible. La culture cellulaire s'avère être un outil précieux qui a fourni à la recherche l'habileté d'analyser les besoins essentiels requis pour la croissance cellulaire et le comportement des cellules normales comparé aux cellules qui dérivent de tumeurs sous des conditions contrôlées. La culture cellulaire a également permis de développer des essais quantitatifs et reproductibles pour la transformation cellulaire. J'ai

donc commencé le projet par la mise au point de conditions de culture pour l'établissement et le maintien de cellules épithéliales de l'ovaire normal ou tumoral. Des conditions de culture avaient déjà été établies auparavant pour l'établissement et le maintien de cultures primaires d'ovaires normaux (Kruk et al., 1990; Siemens and Auersperg, 1988). Cependant plusieurs méthodes de cultures ont été avancées pour dériver des lignées cellulaires à partir d'ascite ovarien sans évaluation de l'efficacité de l'établissement en culture et de caractérisation des cultures primaires d'où elles dérivent. De plus il n'existait pas de méthodes bien définies pour établir de façon efficace des cultures primaires de tumeurs solides de l'ovaire.

Nous avons donc développé une méthode rapide et simple pour l'établissement de cultures primaires à partir de tumeurs solides bénignes, malignes et d'ascite d'ovaires. Des cultures cellulaires issues de phases précoces et tardives de la maladie ont été établies et maintenues en culture avec un nombre significatifs de passages. Par la suite nous les avons caractérisées par des critères d'évaluation incluant des paramètres morphologiques, immunologiques en utilisant des anticorps contre les cytokératines 8,18 et 19 et des paramètres moléculaires par des analyses de LOH en comparant le profil de LOH de la culture primaire à celui de la tumeur initiale d'où elles dérivent. Des lignées cellulaires de cancer épithélial de l'ovaire spontanément immortalisées en culture ont été dérivées des cultures primaires. Ces lignées représentent différents types histologiques du cancer épithélial de l'ovaire avec des degrés de malignité variés. Les différentes lignées ont été injectées dans des souris *nu* ce qui a permis de comparer les paramètres cliniques aux caractéristiques biologiques des ces lignées en culture.

Dans un autre volet de mon projet, on s'est intéressé aux réarrangements génétiques du bras court du chromosome 3 dans le cancer épithélial de l'ovaire. En utilisant quinze marqueurs polymorphiques et 80 spécimens de tumeurs ovariennes incluant des tumeurs bénignes, de faible potentiel de malignité et des tumeurs malignes épithéliales de l'ovaire, nous avons détecté une fréquence de LOH de 31% pour toutes les tumeurs analysées et qui atteint un taux de 36% dans les tumeurs malignes. Il est intéressant de noter que trois régions de délétions ont été définies sur le chromosome 3p (région I, II et III). Ces régions semblent exclure les gènes *VHL*, *PTPase γ* *TGFBR2* et *FHIT* alors que les gènes *THR β* et *RAR β* restent inclus dans les régions de délétions communes. De plus la région III semble être particulière aux tumeurs de faible potentiel de malignité appelées aussi tumeurs borderlines.

CHAPITRE II

Article 1. Primary Cultures of Normal and Tumoral Human Ovarian Epithelium: A Powerful Tool For Basic Molecular Studies

**Article publié dans la revue Experimental Cell Research,
volume 215, p. 303-9, 1994.**

Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: A powerful tool for basic molecular studies.

Running title: Primary cultures derived from ovarian epithelium.

H. Lounis¹, D. Provencher^{1,2}, C. Godbout¹, D. Fink¹, M.-J. Milot¹, and A.-M. Mes-Masson^{1,3,4}.

Centre de Recherche Louis-Charles Simard/Institut du cancer de Montréal¹,
1560 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H9H 1R8 and
Département Obstétrique/Gynécologie² and Département de Médecine³,
Université de Montréal, C.P. 6128, succursale A, Montréal, Québec, Canada
H3C 3J7

4 Corresponding author
tel. (514) 876-5496
FAX (514) 876-5476

ABSTRACT:

To begin delineating the cellular and molecular events that are important in ovarian carcinogenesis, we have developed a simple and rapid method for the establishment of primary cultures derived from benign tumors, malignant tumors and ascites of the ovary that are representative of the original clinical material from which they are derived. From 23 ovarian epithelial ascites collected, 13 were successfully established in culture and cells survived an average of seven to eight passages. From 65 solid epithelial ovarian tumors (benign and malignant) 36 were cultured for an average of six passages for cultures derived from benign tumors and 11-12 passages in the case of malignant tumors. Cells were scored as epithelial in nature by morphology and histochemical analysis using anti-cytokeratin antibodies. Cultures, especially those derived from solid tumors, sometimes displayed fibroblastic-like contamination which was quickly resolved. We include limited molecular analyses both to characterize the origin of the populations we have established as well as to demonstrate the usefulness of these cultures in molecular studies.

INTRODUCTION:

The ovary is a complex organ consisting of a heterogeneous population of cells programmed for distinct functions. An epithelial surface of coelomic origin covers the cortex of the ovary. All epithelial ovarian tumors originate from either this ovarian surface epithelium (OSE) or from the crypts or inclusion cysts originating from this surface epithelium [1]. Epithelial ovarian tumors are histologically heterogeneous and have been classified according to their cell type: serous, mucinous, endometrioid, clear cell, Brenner, and undifferentiated or mixed [2]. They are also graded according to the degree of differentiation: borderline or low malignant potential represent minimal deviation from their benign counterpart while well differentiated tumors are grade I, moderately differentiated are grade II, and poorly differentiated are grade III carcinomas.

After breaching the ovarian tumor capsule, the most common behavior of ovarian cancer cells is to seed the peritoneal fluid leading to subsequent implantation over peritoneal surfaces with ascites formation [3]. Present in at least one third of all cases, fresh ascites is in fact a voluminous effusion with a cellular fraction consisting mainly of ovarian epithelial cells that share antigenic cell-surface markers similar to their solid tumor counterpart with some lymphocyte and mesothelial cells [4, 5]. Since ovarian cancers are often diagnosed late in the disease process, cancer cells have generally spread to extra-ovarian sites. In fact, there exists some controversy as to whether ovarian cancer arises exclusively from the ovary, or whether ovarian carcinoma on the peritoneal surface (primary peritoneal disease) reflects a polyclonal disease arising from multiple primary tumors on the peritoneal

mesothelium. However, recent studies have provided evidence for the unifocal origin of ovarian cancers [6, 7].

While ovarian surface epithelium (OSE)-derived carcinomas are the most frequent cause of gynecological cancer deaths, studies to define the cellular and molecular events associated with this cancer have been hampered by the lack of a suitable model. A number of groups have described specific cell lines that have been isolated from biopsy material, but in the majority of cases these cell lines are derived from ovarian ascites [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 4]. The majority of these cell lines are derived from either serous cystadenocarcinomas, cystadenocarcinomas and adenocarcinomas. Only one example of mucinous cystadenocarcinoma [10], clear cell carcinoma [11], papillary cystadenocarcinoma [12], papillary serous cystadenocarcinoma [13] and papillary serous adenocarcinoma [4] have been described. Only one cell line, COLO 110, has been derived from a solid ovarian tumor from a patient with a stage III serous cystadenocarcinoma [16]. While various culture methods are presented in these papers to derive cell lines from ovarian ascites, no attempts have been made to evaluate the efficacy of establishment in culture, and the primary cultures from which the cell lines are derived have not been characterized. A general protocol to efficiently establish primary cultures from ovarian solid tumors has not been described.

The ability to systematically propagate ovarian cancer cells in primary cultures, free from contaminating normal cells, would provide a potent model to study ovarian cancer. This is especially true since the histological heterogeneity of ovarian cancer can be duplicated by these various primary cultures. In addition, these cultures could provide a model for patient based research such as drug resistance and drug screening studies. Excellent studies on the derivation and serial propagation of normal human ovarian

surface epithelium in tissue culture have been described [17, 18]. In addition to establishing primary OSE cultures from normal ovaries, we have developed a simple and rapid method to establish primary cultures derived from benign and malignant ovarian tissue and from ascites. Successful cultures have been obtained from both early and late phase of the disease. Here we describe the derivation and characterization of these cultures. Furthermore, we provide molecular data to demonstrate the link between the primary cells in culture and the original clinical material, and we demonstrate how these cultures can provide a powerful system in which to study ovarian epithelium under normal and pathological conditions.

MATERIALS AND METHODS:

Source of ovarian material:

Fresh material from ovarian tumor and normal ovaries were collected during laparotomies performed at the Hôpital Notre-Dame, Montréal. All specimens were collected aseptically. In the case of ovarian tumors (either benign or malignant) preliminary pathological examinations were performed and representative sections were transported to the laboratory on ice. Histological reports were subsequently obtained. A portion of each sample was snap frozen and stored in liquid nitrogen, a portion was used to extract DNA, and the remainder was used to derive primary cultures. In the case of ascites, specimen were obtained either at the time of laparotomies or from therapeutic paracentesis. The cellular fraction of ascites was collected by centrifugation and stored at -80°C in 90% FBS:10% buffered DMSO solution

(50 ml DMSO, 3.03 gm Tris-base, 1.25 gm dextrose, 1.68 gm sodium citrate, H₂O to 100 ml, pH 6.7).

Culture methods:

Normal OSE cultures were obtained by the scrape method as described by [9] Cultures from normal ovaries were maintained in OSE media consisting of 50:50 medium199:105 (Sigma) supplemented with 15% FBS as previously described [9]. In our studies OSE media was consistently supplemented with 2.5 ug/ml fungizone and 50 ug/ml gentamicin.

To establish cultures from solid tumors (benign and malignant), tissues were minced with scissors into 2-4 mm explants in OSE media (without FBS). Enzymatic dissociation was accomplished by digestion with 1,000 units of collagenase for four to twelve hours. The best results were obtained when a 1:4 ratio of pure (Sigma: C-9407) to crude (Sigma: C-9891) collagenase was added. Addition of even small quantities of trypsin (10 ul of a 0.05% solution) resulted in a greatly diminished plating efficiency. After the collagenase treatment, aggregates were dissociated by gently pipetting and the remaining undigested solid material was allowed to sediment and was discarded. The cellular fraction was diluted 1:5 in OSE media supplemented with 10% FBS, placed in 100 mm dishes (Nunc), and incubated undisturbed at 37°C in 5% CO₂/air for 24-48 hours. After cells had adhered to the plastic they were washed once in PBS (136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 6.6 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ pH 7.4).

For ascites, the cellular fraction was collected by centrifugation. When ascites contained contaminating red blood cells, the pelleted cellular fraction was incubated with mild agitation at 37°C in 25 ml of a lysis solution (10 mM

Tris pH 8.0, 1.44 mM NH₄Cl). Unlysed cells were subsequently collected by centrifugation. Cell pellets devoid of red blood cells were resuspended in 10 ml of OSE media with 10% FBS per 10⁶ cells and plated on 100 mm plastic dishes. Cells were allowed to adhere at 37°C in 5% CO₂/air for 24 hours. Because of the substantial debris in these cultures, cells were washed twice in PBS the following day.

Subsequently, cultures were regularly fed every three to four days and subcultured by a 1:2-3 split ratio by detaching cells after one PBS wash with 1 ml of trypsin solution from Gibco (0.05% Trypsin and 0.53 mM EDTA in Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium). When possible, early passage (3) and late passage (10-12) primary cultures were frozen in buffered DMSO freezing solution.

Evaluation criteria

It has previously been shown that epithelial cells maintained in OSE media maintain their epithelial morphology [18]. Thus cultures were evaluated for the presence of epithelial cells versus atypical/fibroblastic contamination. In addition, cytokeratin immunofluorescence was used to evaluate the epithelial content of various cultures. Briefly, cells were grown on 8 chamber Lab-Tek slides (Nunc) in OSE media supplement with 10% FBS. Slides were washed twice in PBS and cells were fixed by incubation in 2:1 acetone:methanol at -20°C for 15 minutes and air dried for 30 minutes at room temperature. Slides were blocked in 10% FBS/PBS for 30 minutes at room temperature. Anti-cytokeratin antibody (cytokeratin 8, 18, 19; ICN) was diluted 1:50 in PBS and incubated for 30 minutes at 37°C. Immunodetection was subsequently performed using a streptavidin:biotin fluorescein based kit (ICN). Nuclei were

counterstained with ethidium bromide (1 ug/ml) for 15 minutes. Slides were washed in PBS, air dried and mounted with Permount (Sigma).

Two different molecular analyses were performed to evaluate the relationship between the original clinical material and the subsequent primary cell cultures. In all cases DNA was extracted using standard protocols [19].

To assess deletions within chromosome 3, restriction fragment length polymorphism (RFLP) was analyzed using a combined PCR/RFLP technique as described previously [20]. Briefly, primers were used to amplify a portion of genomic DNA which contains the HindIII polymorphism associated with the pBH302 probe [21] mapped to human chromosome 3p24. The 432-bp PCR fragment is cleaved into a 221 and 211-bp fragments if the HindIII site is present. An other set of primers were used to amplify a portion of genomic DNA which contains the MspI polymorphism associated with D3S30 marker mapped on 3p14 [20]. The 293-bp PCR fragment is cleaved into a 224 and 69-bp fragments if the *MspI* site is present. PCR and digestion product were resolved on 2% agarose TBE gels [20].

To address mutations at the *P53* gene locus, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was performed essentially as described in [22]. Samples were subjected to 2 rounds of PCR. First, exons 5 through 9 were amplified for 33 cycles and each sample was purified on a G-25 column and ethanol precipitated. DNA was resuspended in 20 ul, diluted 1:100 and 2 ul of this mixture was used to amplified exon 5 (5'-TATCTGTTCACTTGTGCCCTCAC-3' and 5'-CCACTCGGATAAGATGCTGAGGA-3') and exon 7 (5'-AAGGCGCACTGGCCTCATC-3' and 5'-AGTGTGCAGGGTGGCAAGTGG-3') separately. Reaction conditions were similar to the first amplification except that the PCR mixture contained 5 uCi of [$\gamma^{32}\text{P}$] dCTP (3000 Ci mmol⁻¹). For

SSCP analysis, the PCR product was diluted 3-fold in 0.1% SDS, 10 mM EDTA and 5 μ l was added to 15 μ l of sequencing stop solution (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol), heat denatured at 95°C for 3 min., chilled on ice and 5 μ l was loaded onto a non-denaturing polyacrylamide gels (49:1 acrylamide to bis-acrylamide). Following electrophoresis, gels were dried and exposed to X-ray film at -80°C for one or two days.

RESULTS:

Development of primary cultures

Optimized conditions for the propagation of normal OSE by scraping have been described [18]. We used similar conditions for the growth of OSE-derived cells from benign or malignant ovarian neoplasias. Indeed, in preliminary experiments, it was clear that OSE media was superior to conventional media (RPMI 1640 and Dulbecco's modification of Eagle's Media) in the support of cell growth. In addition, we did not observe significant differences when comparing different types of plasticware for either the initial establishment or the subsequent passage of primary cultures. While fresh biopsy samples were the optimum choice as a starting material, the scheduling of operations sometimes precluded the immediate processing of some samples. We noted that if samples were kept on ice overnight cultures could occasionally be established, but at a reduced success rate.

Primary cell cultures were derived from normal ovary (NOV), benign tumors (BOV), malignant tumors (TOV) and ascites (OV) of ovarian carcinomas. The success with which these cultures could be established using

our protocol are detailed in Table 1. In the case of NOV cultures, our success for growth in culture (51%) correlates well with the findings of [18] who demonstrated that 50% of cultures showed excellent growth in culture when cells were prepared by the scrape method. BOV, TOV and OV cultures were established in culture at frequencies of 45%, 66% and 56% respectively. A portion of early passage cultures were frozen and these cells were easily re-established in culture in greater than 80% of cases.

We also evaluated the average number of passages that various primary cultures could be maintained *in vitro* (Figure 1). BOV cultures were generally more difficult to maintain and could only be passaged on average 6 times. In contrast, TOV cultures generally grew well and were maintained an average of 11-12 passages. NOV and OV cultures averaged 7-8 passages. Numerous histological types were established in culture including serous, mucinous, endometrioid, clear cell, Brenner, and undifferentiated adenocarcinoma. In addition, mixed serous/clear cell and mixed serous/mucinous cultures could be established. We did not observe any difference between the ease of which different histological types could be established in culture. We have also noted that the neoplastic phenotype of the ovarian tumor, either benign, borderline or malignant, did not influence the frequency at which cells could be established in culture. Occasionally, rare NOV, OV and TOV were spontaneously immortalized and have been maintained for over 30 passages. One TOV line (TOV21G) which was established early on has been maintained in culture for greater than 70 passages.

Characterization of primary cultures

Of utmost importance in our studies was to determine whether the cells in culture were representative of epithelial cells from the original tumor. A number of evaluation criteria were utilized. Morphological examination of cultures revealed that the major cellular component of the cultures were epithelial-like (Figure 2). NOV cultures were highly homogeneous and morphologically indistinguishable from cultures described in [9]. BOV cultures and OV cultures were also very homogeneous while in TOV cultures variable levels of fibroblast-like cells were often observed, although the later quickly disappeared after two or three passages. In BOV cultures, cells were characteristically large with abundant cytoplasm while in OV and TOV cultures cells generally smaller and cellular outer membranes had a characteristic ruffled appearance (Figure 2). Spontaneous immortalized TOV and OV cultures had a different appearance which more closely resembled the morphology of the NIH:OVCAR-3 (Figure 3) which was spontaneously derived from a malignant ascites (obtained from ATCC). To address whether the cells in culture were epithelial in origin, immunofluorescence studies using an antibody directed against the epithelial specific cytokeratins were performed (Figure 4). NOV cultures showed well organized keratin filaments while cells from OV, TOV and BOV cultures showed a more diffuse but positive staining with anti-cytokeratin antibodies.

We have proceeded with the molecular characterization of ovarian tumors (benign and malignant) using the primary cultures that were established. We have analyzed the pattern of chromosome 3 deletions and *P53* mutations in these cultures and the results will be presented elsewhere. In this study, we are presenting a limited set of results as they bear directly on

the question of the relationship between the primary cells in culture and the neoplastic cells of the original tumor.

RFLP analysis of chromosome 3 deletions was used to detect loss of heterozygosity at specific regions of chromosome 3. In a subset of samples, we obtained DNA both from the original specimen and from cells in culture. In 37 informative samples, 11 samples were shown to have suffered deletions in chromosome 3 while the remainder were intact for the two regions tested. Significantly, there was 100% correlation between the results from tumor DNA and DNA isolated from the cells in culture. Examples of this correlation in BOV, TOV and OV cultures are presented in Figure 5. Similarly, *P53* mutations were detected by SSCP analysis. While mutations in *P53* were infrequent, we did observe the appearance of the same *P53* mutation in tumor DNA and DNA isolated from the matched cells in culture. In particular, mutant SSCP patterns were observed in exon 5 from a TOV sample and in exon 7 from an OV sample (Figure 6). In both cases, the DNA from the original tumor displayed the corresponding mutant pattern as well as varying degrees of the wild-type SSCP pattern. This wild-type pattern in the original tumor DNA is presumably due to normal cell contamination, since in the TOV and OV samples, mutations in one allele of *P53* were accompanied by loss of the second allele through chromosome deletion. Sequence analysis of *P53* mutations revealed the identical point mutation in the tumor and corresponding cellular sample (data not shown). Thus we have a large body of evidence which supports the concept that the cells in culture are truly representative of the epithelial cancer cells in the original tumor.

DISCUSSION

The establishment of relatively pure ovarian derived cell cultures which represent the cells in the original clinical material was the main goal of our study. In this report we describe a simple and rapid method for the establishment of primary cultures derived from normal ovary or from ovarian benign and malignant tumors and ascites. In approximately 50% of the clinical samples obtained, we were able to derive primary cultures that could be maintained for a significant number of passages *in vitro*. Inability of cells to adhere to the plastic surface was the most frequent cause for culture failure and variation of the plastic tissue cultures dishes did not seem to significantly alter this pattern. We also noted that cultures from solid tumors were adversely affected by the presence of trypsin in the initial enzymatic digestion of minced tumors, although subsequent passage of cells using a trypsin-based protocol was not a problem. We have noted that cultures could be established as easily from clinical material derived from young women as that obtained from women in their 70's and 80's indicating that patient age was not a contributing factor in establishment in culture. In addition, the method we describe is efficient in establishing primary cultures from all the different histological types we tested and cultures can be established equally efficiently from early and late disease. Since primary cultures can be derived from all stages of the disease (including benign tumor) and compared to their normal counterparts in culture our model will be informative in evaluating the temporal appearance and relative importance of specific molecular events in ovarian tumor progression.

Cultures were characterized by a number of evaluation criteria including morphological, immunological and molecular parameters. By all criteria used, the cells in culture seem to be derived and are representative of the original

clinical material. We have noted, however, that early passage of TOV and BOV cultures can contain a variable number of contaminating fibroblast-like cells. The latter usually disappear after a number of passages. This point is illustrated by SSCP analysis of early (P2) versus late (P8) passage cultures of the exon 5 mutated TOV-112D/C sample (data not shown). In this particular case we observed that the normal exon 5 SSCP pattern was predominantly observed in the early passage culture while the mutant pattern was almost exclusively observed in the late passage culture (presented in Figure 6). These results, as well as our morphological observations, suggest that, initially, cultures derived from solid tumors may contain varying amount of contaminating normal cells but this contamination resolves itself over the lifespan of the culture.

The primary cell cultures we have established provide a powerful model system in which to address the cellular and molecular events involved in ovarian tumorigenesis. Our model has a number of specific advantages including: 1) the purity and ease of establishment of the cell population in culture 2) elimination of necrotic material 3) sufficient quantities of DNA, RNA and protein can be extracted for a number of different analyses as the cultures can be maintained over a significant number of passages 4) reflection of clinical heterogeneity of ovarian cancer and 5) ability to correlate with clinical parameters. In addition, these cultures appear to be a suitable substrate for genetic manipulations since we have recently established stable transfectants from some of these cultures (H. Lounis and A.-M. Mes-Masson, unpublished). Based on the transfection of specific oncogenes, we are presently deriving permanent cell lines from particularly informative primary cultures.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Drs. L. Masson and R. Kothary for critical reading of the manuscript and for helpful comments. We are grateful to Drs. P. Audet-Lapointe, P. Drouin, P. Gauthier and J. Dubuc-Lissoir for their assistance in providing clinical material and Drs. P.-P. Turgeon and J. Gauthier for histopathological expertise. R. Duclos is thanked for photography. A.-M.M.-M. is the recipient of a F.R.S.Q. fellowship. This research was supported by an R&D grant to A.-M.M.-M. and D.P.

REFERENCES:

1. Whitman, G.F. Nolan, T.E., and Gallup, D. G. (1993). *Cancer of the Ovary*, p21, Raven Press Ltd., New York.
2. Scully, R.E. (1979). *Tumors of the ovary and maldeveloped gonads. Atlas of Tumor Pathology: Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.*
3. Morrow, C.P., Curtin, J.P., and Townsend, D.E. (1993). *In Synopsis of Gynecologic Oncologic*, Wiley Medical, 4th Ed.
4. Provencher, D.M., Finstad, C.L., Saigo, P.E., Rubin, S.C., Hoskins, W.J., Federici, M.G., Lloyd, K.O., and Lewis, J.L.Jr. (1993). *Gyn. Oncol.* **50**, 78-83
5. Rubin, S.C., Finstad, C.L., Hoskin, W.J., Provencher, D.M., Federici, M.G., Lloyd, K.O., and Lewis, J.L.Jr. (1991). *Am. J. Ob. Gyn.* **164**, 558-563.
6. Jacobs, I.J., Kohler, M.F., Wiseman, R.W., Marks, J.R. Whitaker, R., Kerns, B.A.J., Humphrey, P., Berchuck, A., Ponder, B.A.J. and Bast Jr, R.C. (1992). *J. Natl. Cancer Ins.* **84**, 1793-1798.
7. Mok, C-H., Tsao, S-W., Knapp, R.C., Fishbaugh, P.M., and Lau, C. C. (1992). *Cancer Res.* **52**, 5119-5122.

8. Hamilton, T., Young, R.C., Mckoy, W.M., GROTZINGER, K.R., Green., J. A., Chu, E.W., Whang- Peng, J., Rogan, A, M., Green, W.R., and Ozols R.F.(1983). *Cancer Res.* **43**, 5379-5389.
9. Golombick, T., and Bezwoda, W. R.(1991). *Euro J. Cell. Biol.* **56**, 459-463.
10. Yamada, T., Ueda, M., Otsuki, Y., Ueki, M., and Sugimoto, O. (1991). *Gynecol Oncol.* **40**, 118-128.
11. Wong, W.S.F., Wong, Y.F., Angela, Y.T., Huang, P.D., Chew, E.C., Ho, T.H., and Allan Chang, M.Z.(1990). *Gynecol Oncol.* **38**, 37-45.
12. DiSaia, P.J., Morrow,M., Kanabus, J., Piechal, W., and Towndend, D.E. (1975). *Gynecol Oncol.* **3**, 215-219.
13. Abu Sinna, G., Beckman, G., Lundgren, E., Nordenson., and Roos, G. (1979). *Gynecol Oncol.* **7**, 267-280.
14. Golombick, T., Dansey, R., Bezwoda, W.R., and Rosendorff, J. (1990). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26**, 447-454.
15. Grunt, T.W., Oeller, H., Somay, C., and Dittrich, C.(1993). **53**, 45-50.
16. Woods, L.K., Morgan, R.T., Quinn, L. A., Moore, G.E., Semple, T.U.,and Stedman, K.E. (1979). *Cancer Res.* **39**, 4449-4459.

17. Siemens, C.H. and Auersperg, N. (1988). *J. Cell Physiol.* **134**, 347-351.
18. Kruk, P.A., Maines-Bandiera, S.L., and Auersperg.(1990). *Lab. Inves.* **63**, 132-136.
19. Maniatis, T., Fritsh, E.F., and Sambrook (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
20. Ganly, P.S and Rabbitts.P.H. (1991). *Nucl. Acids. Res.* **19**, 3757-3760.
21. Gareau, J.L.P., Houle, B., Leduc., F., Bradley, W.E.C., and Dobrovic, A.(1988). *Nucl. Acids. Res.* **16**, 1223.
22. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1989). *Genomics .* **5**, 874-879.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Histogram showing the growth potential of NOV, BOV, TOV and OV derived primary cell cultures.

Figure 2. A-D. Morphological aspects and growth pattern of primary cultures derived from: (A) normal ovary (NOV), compact epithelial cells with confluent edges in an orderly cobblestone pattern, (B) benign serous tumor (BOV), flat epithelial cells with larger surface than the compact NOV cell morphology, (C) malignant adenocarcinoma tumor (TOV) with transformed like morphology including refractile cells, (D) cells derived from ovarian adenocarcinoma ascitic fluid (OV) characterized by ruffled membranes (examples are indicated by the arrows) and by little or no fibroblast-like contaminants. Cells were photographed using Tri-pan X-100 film. In all cases magnification was 200X.

Figure 3. Morphology of immortalized cell lines. (A) TOV21D was established from a grade III malignant adenocarcinoma of the ovary (B) OV90 was derived from a malignant ovarian ascites and (C) commercially available NIH:OVCAR3, a cell line derived from a malignant ovarian ascites. Note the similarity of morphology in all three cases. All cells were photographed using Tri-pan X-100 film at a magnification of 200X.

Figure 4. Keratin immunofluorescence in cell cultures derived from: (Top panel) normal ovary (NOV) and (bottom panel) malignant ovarian tumor (TOV). Note that while both NOV and TOV cells are keratin positive, NOV cells show a well organized keratin staining of filaments while TOV cells are characterized by a diffuse staining pattern. Fluorescent labeled-cells were

photographed using Kodak Ektachrome 400 color slide film and negatives were converted to black and white using Ilford Pan F Plus film. Magnification of top and bottom panels is 630X.

Figure 5. Comparison of RFLP patterns seen in fresh clinical ovarian samples and in the corresponding primary cell cultures. Samples represent DNA collected from blood (B), malignant tumors (TOV), ovarian ascites (OV) or from benign tumors (BOV). DNA was either extracted from the fresh clinical samples (t) or from primary cell cultures derived from the corresponding samples (c). The first 11 samples were digested with HindIII following the PCR amplification of the *THRβ* locus (3p24). TOV1 and TOV2 are samples from the left and right ovary from the same patient. Note the loss of heterozygosity that is present in both the original tumor DNA samples and in the DNA isolated from primary ovarian cultures. Retention of heterozygosity is illustrated by TOV3 and the corresponding culture. Primary cultures from ovarian ascites were also representative of the original clinical material as evidenced by the LOH in both OV4(c) and OV4(t). The last three lanes are from a separate experiment and contain samples analyzed by RFLP/PCR and *MspI* digestion for the D3S30 (3p14) locus. Note again the appearance of LOH in both the original clinical sample and the matched cells in culture.

Figure 6. Comparison of *P53* mutational patterns seen in fresh clinical ovarian samples (/T) and in the corresponding primary cell cultures (/C). Detection of *P53* mutations was accomplished by PCR-SSCP analysis of exon 5 for the malignant tumor sample (TOV-112D) and exon 7 for the ascites derived (OV-55) sample. TOV-112D/C and TOV-112D/T samples were run on separate gels but can be compared in both cases to the normal SSCP pattern from the

corresponding gel. OV-55/T-1 and OV-55/T-2 represent ascites that were drained on two separate occasions from the same patient. Note that in the TOV-112D and OV-55 samples, the original tumor DNA shows both the normal and mutant SSCP patterns, while cells in culture display predominantly the mutant *P53* pattern.

Table 1 - Establishment of ovarian primary cultures

Culture type	Received	Established*	% Success
NOV	41	21	51
BOV	35	16	45
TOV	30	20	66
OV	23	13	56

* Could be maintained a minimum of 4 passages

Figure 1, Lounis et al.

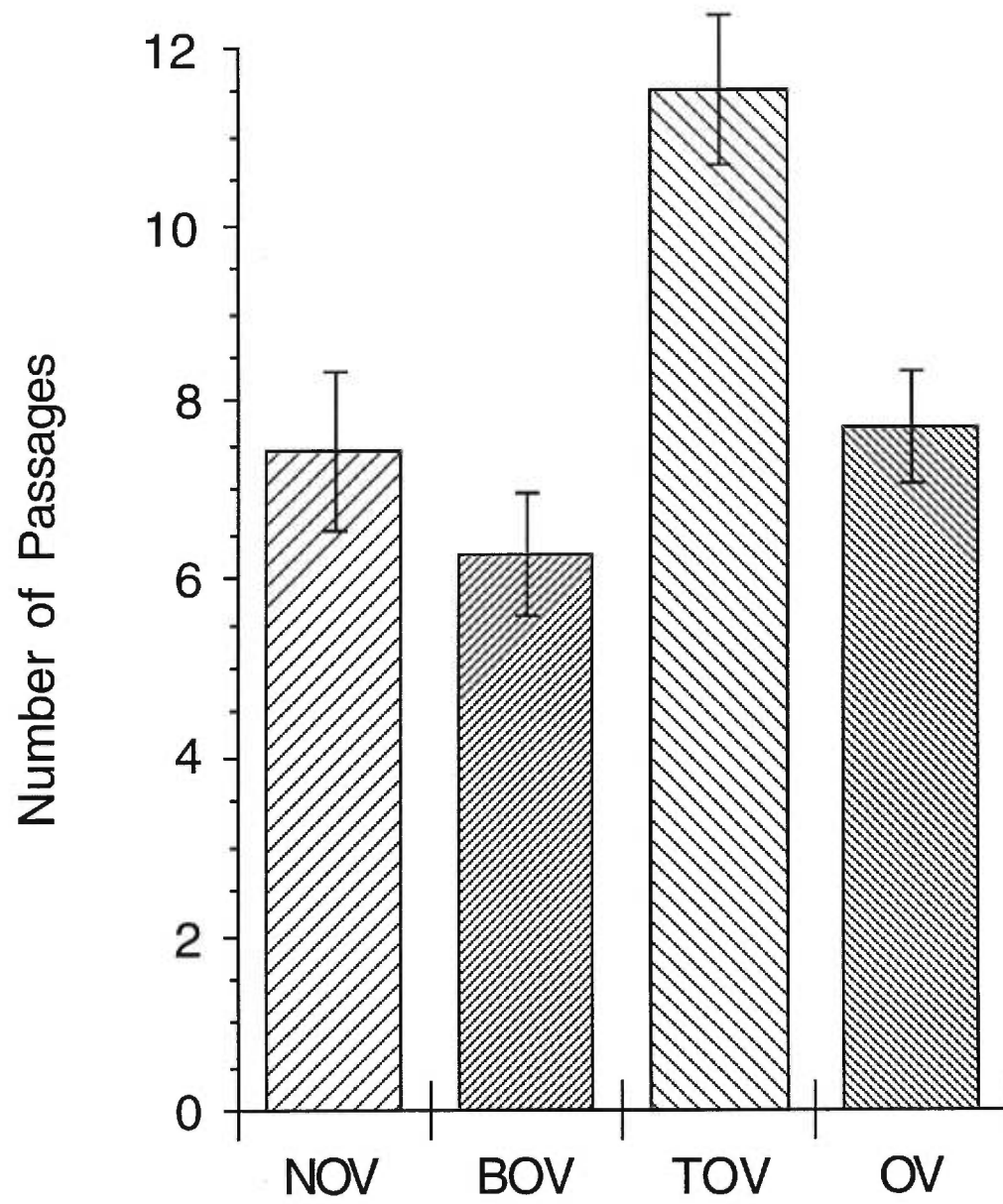
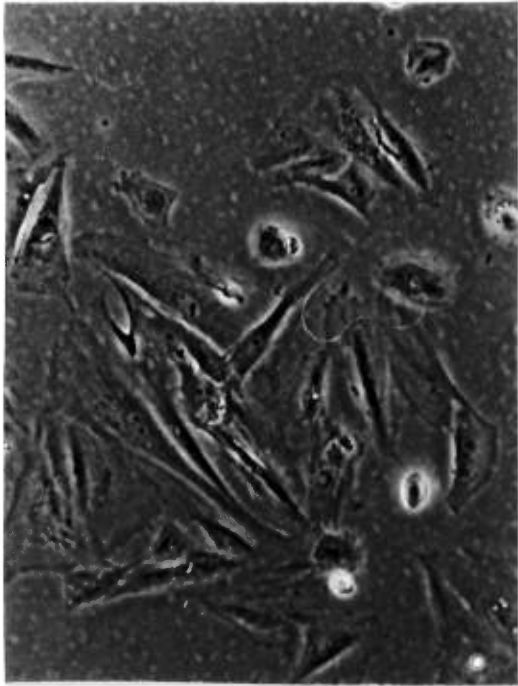
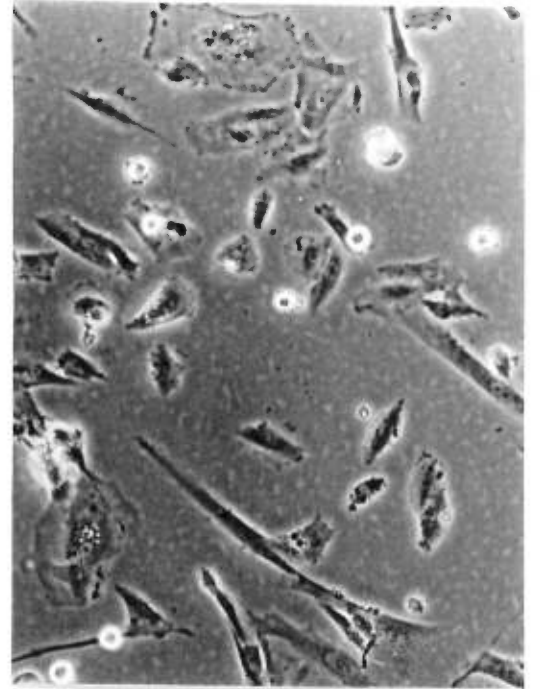


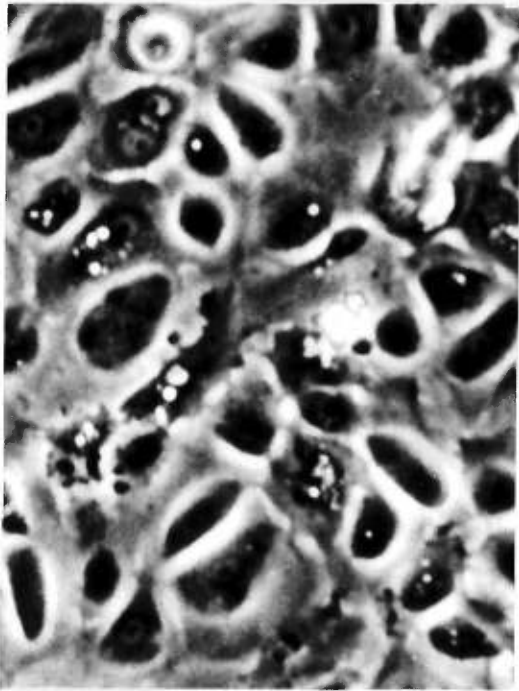
Figure 2, Lounis et al.



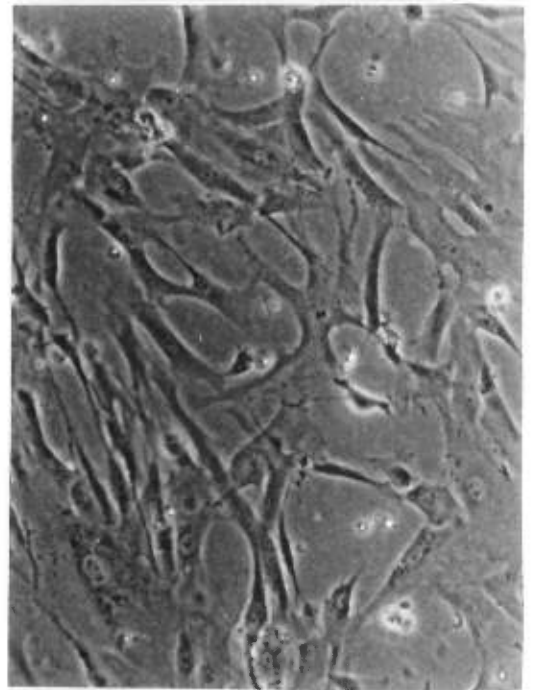
B



D



A



C

Figure 3, Lounis et al.

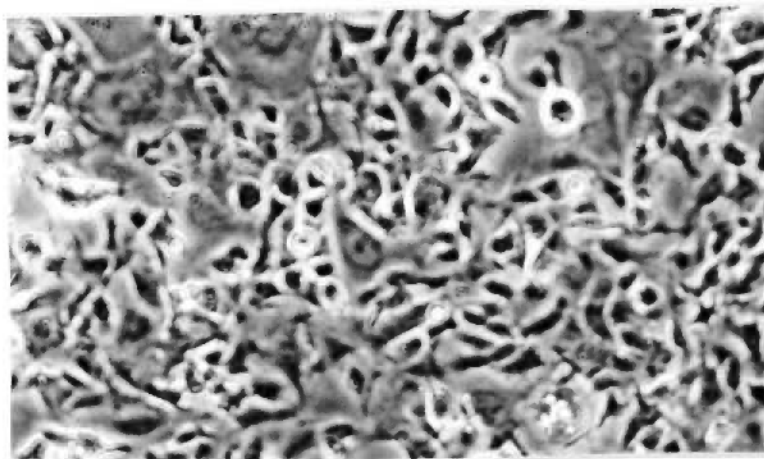
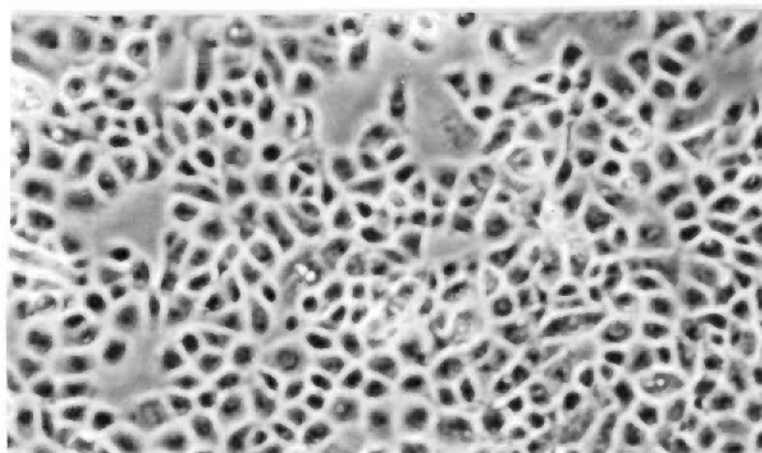
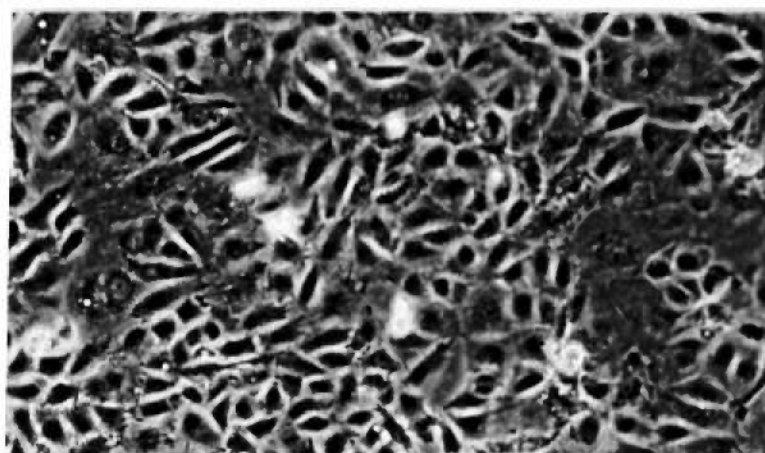
**A****B****C**

Figure 4, Lounis et al.

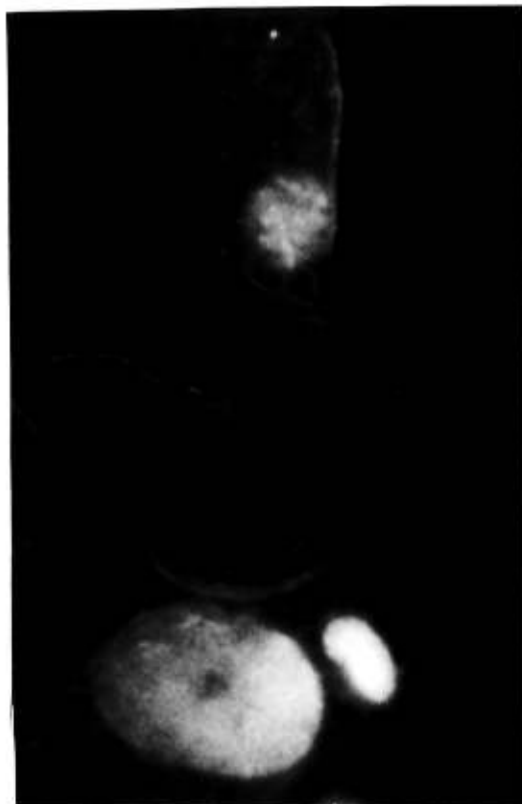
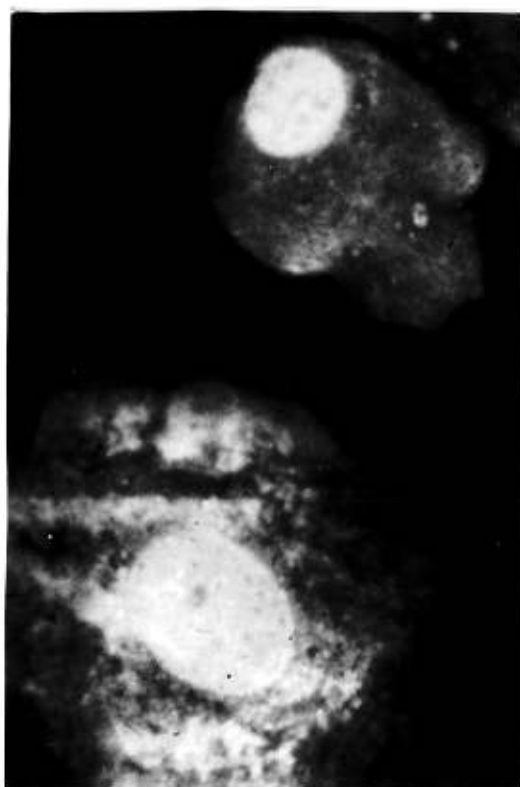
**A****B**

Figure 5, Lounis et al.

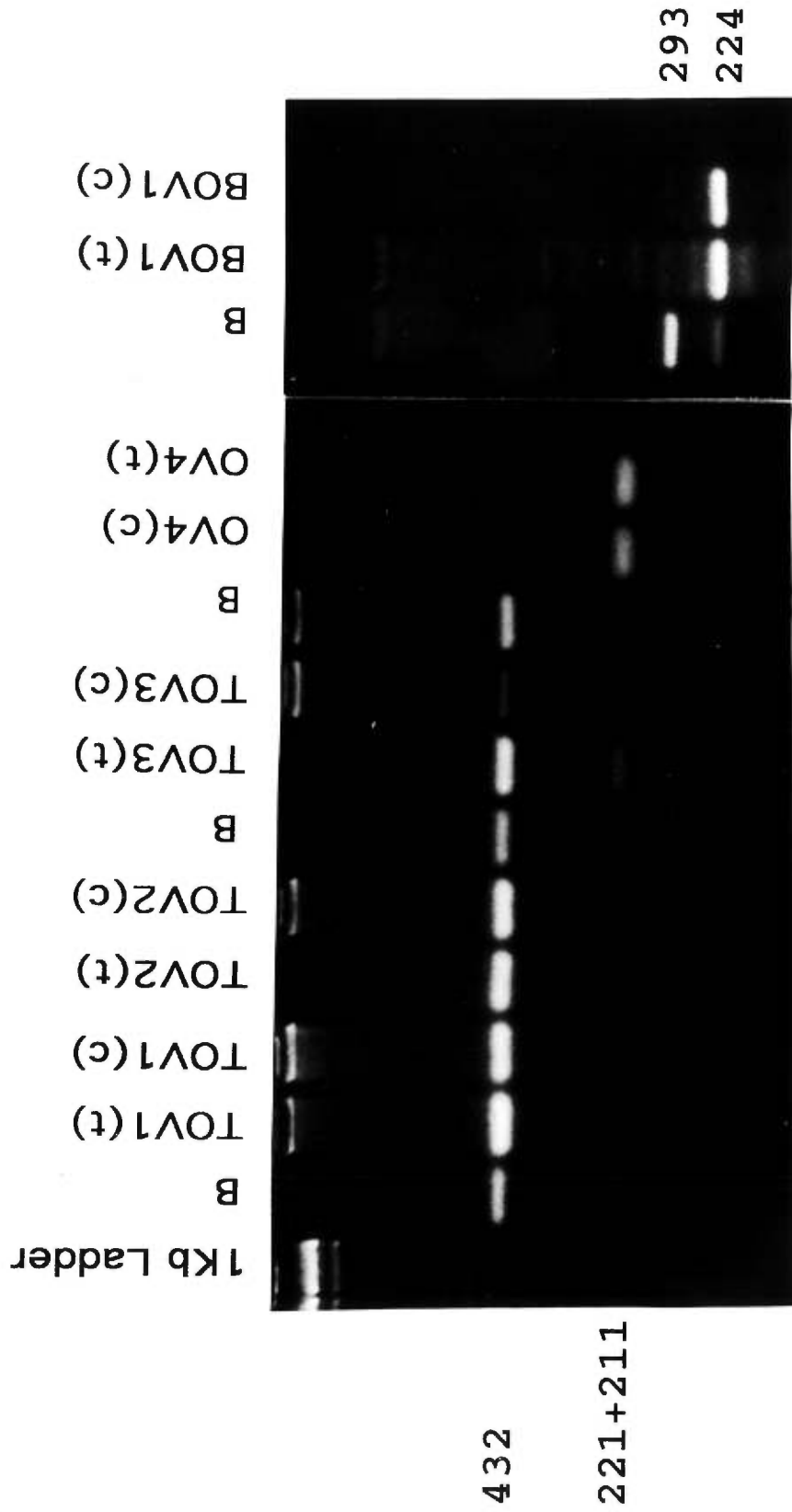
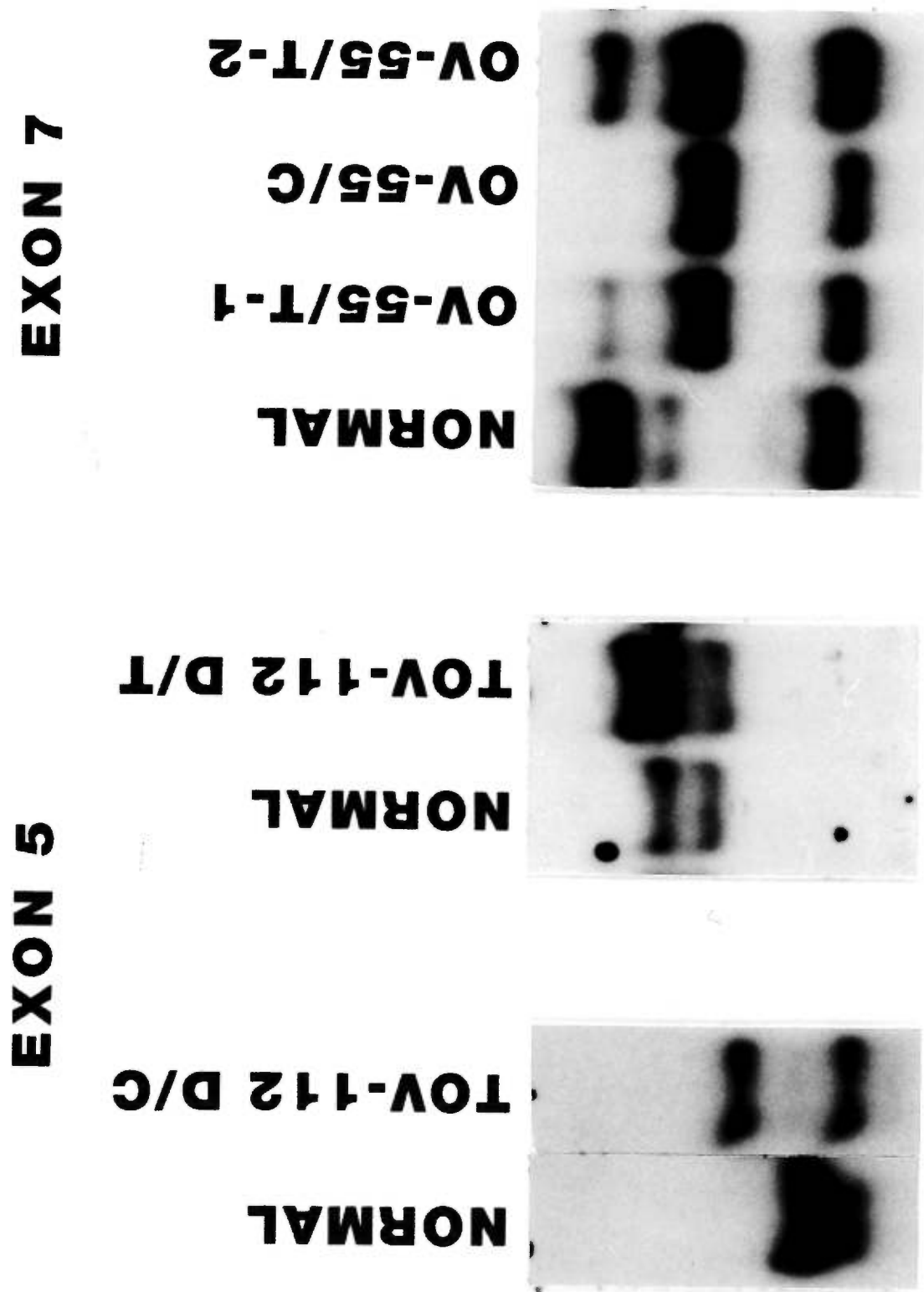


Figure 6, Lounis et al.



CHAPITRE III

Article 2. Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines

Article soumis à la revue Experimental Cell Research.

Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines

Lounis, H. Provencher, D.M.^{1,2,+}, .^{1,+}, Champoux, L.¹, Tétrault, M.¹, Wang J.C.⁴, Eydoux, P.^{4,++}, Savoie, R.², Tonin, P.N.⁵, and Mes-Masson, A-M^{1,3,*}.

¹Institut du cancer de Montréal/Centre de Recherche CHUM-Campus Notre-Dame 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1; ²Département d'obstétrique-gynécologie, ³ Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; ⁴ Department of Pathology, McGill University and Department of Cytogenetics, Montreal Children's Hospital; ⁵Departments of Medicine and Human Genetics, McGill University/Montreal General Hospital Research Institut e, Montreal Quebec, Canada.

+ These authors contributed equally to this paper

++ Present address: Laboratoire de Biologie du Développement
Hôpital Robert Debré, 48 boulevard Sérurier
75019 Paris, France.

* corresponding author: Anne-Marie Mes-Masson
e-mail: mesmassa@ere.umontreal.ca
tel: (514) 281-6000 ext 5496
FAX: (514) 896-4689

ABSTRACT:

Four independent, spontaneously immortalized, human epithelial ovarian cancer cell lines were established from primary cultures derived from fresh excised ovarian tumor material from chemotherapy naive patients. Cell lines were derived from solid primary tumors in three cases (TOV-21G, TOV-81D and TOV-112D) and from malignant ascites for OV-90. The ovarian tumors cell lines represent different histopathologies of ovarian tumors: a clear cell carcinoma (TOV-21G), a papillary serous adenocarcinoma (TOV-81D), an endometrioid carcinoma (TOV-112D) and an adenocarcinoma (OV-90). The TOV-81D cell line was derived from a patient with a germline mutation in the *BRCA2* gene. We have completed an extensive analysis of these cell lines which includes: i) immunohistochemistry analysis of epithelial ovarian specific antigens; ii) karyotype analysis; iii) analysis of *P53* status; iv) analysis of *P16* mutations; v) characterization of *BRCA1* and *BRCA2* expression; vi) determination of growth characteristics in cell culture, including doubling times, saturation densities and growth in soft agar; and vii) tumorigenicity assays in a *nude* mouse xenograft system. In addition to providing a well characterized model for ovarian cancer, these cell lines are particularly interesting since their growth characteristics *in vitro* mimic their clinical behavior.

INTRODUCTION:

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecologic malignancy. EOCs originate from either the surface epithelium itself or from the crypts or inclusion cysts on the surface epithelium of the ovary (1) EOCs are designated according to their cell type: serous, mucinous, endometrioid, clear cell, Brenner, or undifferentiated (2). They are graded according to degree of differentiation: borderline or low malignant potential represent minimal deviation from their benign counterpart while well differentiated tumors are grade I, moderately differentiated are grade II, and poorly differentiated are grade III carcinomas. At surgery EOCs also are classified according to stage, grade and amount of residual disease based on criteria established by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). All of these diagnostic parameters together confer prognostic indices in ovarian cancer. A common behavior of EOC (in one third of all cases) is seeding of the peritoneal fluid leading to subsequent implantation over peritoneal surfaces with ascites formation (3). EOCs can arise sporadically and in rarer instances in association with familial cancer syndromes (4). It is presently unclear whether the underlying molecular events in the development of all EOCs are similar or whether distinct events are associated with particular subtypes.

While EOC is the most frequent gynecological cancer studied, advances in the understanding of this cancer have been hampered by the lack of representative models. Cell culture has become a standard tool for modern molecular and cellular research. We have previously described an efficient and rapid technique for the establishment of primary cultures from EOC (5). While these primary cultures are ideally suited to certain studies, the major drawback is the inability to maintain these cultures over extended periods for long term

experiments and for tumor assays. Most human ovarian cancer permanent cell lines available were derived from ascites or pleural effusion (6-20), with only a few cell lines derived from the primary ovarian solid tumor (12, 21, 22) or metastases (23). In addition, most cell lines originate from tumor material obtained following adjuvant therapy such as chemotherapy or radiation therapy, which could introduce confounding genetic events. cell lines have been described only once and it is unclear whether all cell lines reported were truly immortal in culture. Little attention has been paid to the molecular characterization of these cell lines, and in particular it has not been possible to relate a given molecular event to the primary tumor from which it was derived. Clinical profiles are often lacking thus preventing comparisons between the initial tumor and the cell lines derived thereof. Thus there is a need to develop new cellular tools to address the molecular and cellular events important in the development of EOC. Following the derivation of primary EOC cultures (5), we were able to establish four independent spontaneously immortalized epithelial ovarian cancer cell lines (TOV-21G, TOV-81D, TOV-112D and OV-90) from patients who were never exposed to chemotherapy or radiation therapy. We have proceeded with the extensive characterization of these ovarian cultures by morphological, immuno-histochemical, cytogenetics and molecular analysis.

RESULTS:

Cell line pedigree

Primary cultures derived from ovarian tumor material can generally be maintained for 10-12 passages (5). However, we have observed that a subset

of cultures can be maintained up to 30-40 passages and in rare instances we have been able to establish immortalized cell lines which have been maintained in our laboratory over a period of several years. Four longterm cell lines were derived from ovarian malignant tumors (TOV-21G, TOV-81D and TOV-112D) and from an ovarian malignant ascites (OV-90). The ovarian tumors cell lines are derived from different histopathologies of ovarian tumors: a clear cell carcinoma (TOV-21G), a papillary serous adenocarcinoma (TOV-81D), an endometrioid carcinoma (TOV-112D) and an adenocarcinoma (OV-90).

The clinical information is summarized in Table 1. All patients were diagnosed with advanced disease. All tumors were grade III except for TOV-81D which was classified grade I-II. TOV-112D was derived from a patient with early onset of disease (42 years at the time of diagnosis) who suffered from very aggressive ovarian cancer as survival was less than three months despite an optimal cytoreductive surgical procedure and platinum-based chemotherapy. TOV-81D is particularly interesting since it was derived from a patient with a familial history of breast and ovarian cancer, and in this patient the disease was rather indolent with relapse occurring greater than six years later.

Cell line morphology

Three of the cell lines grow as monolayer cultures on a solid surface (TOV-21G, TOV-81D, and OV-90) while the TOV-112D cell line is loosely adherent and the cells have a tendency to compact and form foci. TOV-81D cells have a very flat morphology and are large surface cells with abundant cytoplasm (Figure 1C). The epithelial morphology is highly similar to the morphology of cell cultures derived from normal ovarian epithelium (5) and

resembles the morphology of a previously described ovarian cell line SKOV-3 (20) which was established from the ascites of a patient with an ovarian adenocarcinoma (Figure 1D). In contrast, the morphology of the TOV-21G (Figure 1E), TOV-112D (Figure 1B) and OV-90 (Figure 1A) cells differ from SKOV-3, with cells being generally smaller and more refractile (Figure 1). In particular, the OV-90 cells maintain a classic morphology, characterized by ruffled membranes (5), which have been observed in primary cultures from ovarian ascites.

Immunodetection of antigens associated with epithelial ovarian cancer cells

The expression of epithelial specific keratins was verified (Table 2). TOV-21G, OV-90 and TOV-112D cell lines show strong immunofluorescence against the keratin specific CAM5.2 antibody. In comparison, the TOV-81D cell line reacted only weakly with the CAM5.2 antibody. Staining was generally diffuse, a staining pattern that is often associated with transformed cells. In addition, we have assessed the expression of antigens MH99 (24, 25) and B72.3 whose expression correlates with epithelial ovarian carcinomas (26). All cell lines showed strong positive immunofluorescent staining for both MH99 and B72.3, and this staining appeared stronger than the staining pattern observed for SKOV-3 (Table 2). Staining for CAM5.2, MH99 and B72.1 was negative for the NIH3T3 fibroblast control cell line (Table 2). The expression of *neu* oncogene has been associated with poor prognosis in ovarian cancer (27). All four ovarian cell lines express *neu* oncogene to some extent as judged by immunohistochemical analysis using CV-1 cells as a negative control (Table 2). TOV-81D, which was isolated from a patient with indolent

disease shows very strong *neu* staining. Western blot analysis of *neu* expression generally confirmed the immuno-histochemical results although using this assay *neu* expression appeared to be stronger in TOV-21G than *neu* expression in TOV-112D (data not included).

Growth characteristics:

To further characterize the isolated cell lines, we assessed their ability to form colonies in soft agarose, a property normally associated with the transformed phenotype (Figure 2). TOV-112D rapidly formed large dense cell foci in semi-solid medium while by comparison TOV-21G showed robust but smaller foci after two weeks in culture. OV-90 produced smaller colonies which required up to three weeks for cell foci to reach diameters comparable to TOV-21G. In contrast, TOV-81D was unable to grow without solid support and cells failed to grow even after six weeks.

Cells lines were characterized for their growth rate in culture (Figure 3). Doubling times and saturation densities were calculated from this data and are summarized in Table 3. Data for SKOV-3 was derived from the results presented in Figure 6.

Cytogenetics:

Analyzable metaphases (minimum 18) were karyotyped for each cell line and all chromosomal abnormalities are reported in Table 4. Cytogenetic analysis was done on primary cultures between passages 23 and 32. TOV-21G appears to be example of more simple karyotypic changes, with trisomy 10 being the only abnormality associated with TOV-21G by GTG-banding.

While the karyotype of TOV-81D was most consistent with a normal chromosome content, an interstitial deletion within chromosome 3 was observed, consistent with our observation that losses at this chromosome contribute to the disease (28). Both OV-90 and TOV-112D display complex karyotypic changes involving rearrangements, translocations, deletions and duplications.

Molecular analysis of *P53* and *P16*

The PCR-based SSCP assay was used to evaluate the presence of small mutations within the coding sequences of two common tumor suppressor genes, *P53* and *P16*, and the results are summarized in Table 4. For the *P53* gene, exons 5 through 9 were analyzed. Mutation in the *P53* gene were found in exon 5 for TOV-112D and exon 6 of OV-90. A missense mutation at nucleotide 215 in OV-90 results in the replacement of serine to arginine. TOV-112D also carries a missense mutation, this time within the codon for amino acid 175 resulting in an arginine to histidine amino acid change. TOV-81D and TOV-21G displayed a wild type mobility shift pattern for exons 5-9. Immunofluorescence studies also revealed a strong *P53* specific signal for OV-90, suggesting that the mutation in this cell line resulted in a more stable mutant form of *P53* (data not included). Sequence analysis of *P53* mutations in both OV-90 and TOV-112D revealed an identical point mutation in the corresponding fresh biopsied samples as compared to their cultured counterparts. The *P16* gene exhibited a wild type SSCP pattern in TOV-81D, TOV-21G and TOV-112D cell lines. OV-90 displayed an abnormal mobility shift pattern for exon 2a of the *P16* gene. Sequence analysis revealed a two base pair deletion at nucleotides 211-212 and the resulting frameshift leads to

a prematurely truncated protein. An additional point mutation was also identified creating an alanine to aspartic acid replacement at amino acid 86.

***BRCA1* and *BRCA2* analysis**

Because of the familial history of cancer in patient #81, she was recruited to a separate study on hereditary breast-ovarian cancers and through these studies it was possible to identify a germline *BRCA2* mutation, a nucleotide 8765 del AG mutation in exon 20, which has previously been described (29). The TOV-81D cell lines carries both the wild-type and mutant allele for *BRCA2*. Although we were unable to obtain a familial cancer history for patient #112, the young age of onset and the tumor histopathology suggested the possibility that the development of ovarian cancer in this patient was related to a hereditary cancer syndrome (30). To date, no mutations have been identified within the *BRCA1* and *BRCA2* genes in the TOV-112D cell lines, although in the absence of the complete characterization of these genes we cannot exclude the possibility of mutations. The four cell lines were further characterized by assessing the pattern of *BRCA1* and *BRCA2* expression by RT-PCR based assays. Although the results are not quantitative, all four cell lines express both *BRCA1* and *BRCA2* RNA transcripts (Figure 4).

Tumorigenicity assay:

One to three million cells of each cell line, including SKOV-3 as a control, were injected both subcutaneously into the left gluteal area and intraperitoneally into *nude* mice (Table 3). None of the TOV-81D cell injections resulted in tumor formation, even after 24 weeks. In contrast, injection of the

TOV-112D cell line resulted in the rapid appearance of tumors in three out of four animals tested, with tumors appearing between three to four weeks. The TOV-21G and OV-90 cell lines produced tumors with comparable latency (5-11 weeks), while tumors with the SKOV-3 cell line were seen between 11-13 weeks post-injection. In these experiments, only the TOV-21G and OV-90 cell lines induced the formation of ascites, which was generally hemorrhagic. In TOV-112D, TOV-21G, OV-90 and SKOV-3 tumor assays, multiple peritoneal surface implants were observed.

Xenograft solid tumors were compared to the original solid tumors from the patients from which the cell lines were derived (Figure 5). For comparative purposes, the xenografts from OV-90 were compared to the solid tumors from that patient. While the histology of xenografts are generally consistent with those of the original primary tumors, the histology of the OV-90 xenografts was less complex and more homogeneous than the original tumor. Although this comparison may not be totally valid, there is evidence that ascites and tumor populations from a given patient can diverge early in the transformation process (31)

Primary cultures were derived from subcutaneous injections (SC lines) or intraperitoneal injections (IP lines) in *nude* mice tumor xenografts from TOV-21G, OV-90 and TOV-112D. Growth of nu-IPTOV-21G-1, nu-SC-TOV-21G-2, nu-SC-OV-90-1, nu-IP-TOV-112D-1 and the nu-IP-TOV-112D-3 cultures were compared to the parental cell line from which they were derived (Figure 6). While there is good concordance between the growth rates of the derived and parental cell lines for OV-90 and TOV-112D, both the sublines derived from the subcutaneous (nu-SC-TOV-21G) and intraperitoneal (nu-IP-TOV-21G) injections appear to grow more slowly than the parental TOV-21G cell line.

DISCUSSION:

Permanent cell lines carry a number of advantages over primary cell cultures or fresh clinical material, namely: the purity of the research material, the elimination of necrotic material, the ability to generate sufficient quantities of DNA, RNA and proteins extracts for numerous studies as well as the ability to genetically manipulate cell lines allowing a wide range of *in vitro* and *in vivo* xenograft studies. It can be argued that spontaneously immortal cell lines may be more closely related to the original starting tumor material than transformed cell lines where clearly additional genetic events are required for continued growth in culture. Thus, the derivation of additional well characterized ovarian cell lines both at the cellular and molecular level would be beneficial to ovarian cancer research.

Clinical heterogeneity is the hallmark of human epithelial ovarian cancer both at the phenotypic and genotypic levels. While ovarian surface epithelium-derived carcinoma is the most frequent gynecological cancer studied, development in the knowledge of this cancer has been hampered by the lack of representative models. Despite the development of ovarian cancer cell lines, the full spectrum of the disease is still not completely represented and thus the derivation of additional cell lines is needed to complement those already available.

While specific ovarian cancer cell lines have been isolated from biopsy material, in fact most human ovarian cancer permanent cell lines available are derived from ascites or pleural effusion. (6-20, 32). Only a few cell lines were derived from either primary solid tumor (12, 21, 22, 32, 33) or metastatic solid tumors (23). Additionally, most cell lines originate from tumor material

obtained following adjuvant therapies such as chemotherapy or radiation therapy which may have a profound genetic effect on the evolution of the primary tumor. Some cell lines have been described only once and the lack of further investigations may be due to the limited lifespan of some of these cultures suggesting the need for a better definition of long term versus short term culture (34). Indeed, even recent reports (32) continue to be published where cultures have only undergone limited passages (less than 40) putting in doubt whether these cells are truly immortal. We have observed that it is possible to derive long-term primary cultures from a significant number of samples without full immortalization (unpublished results), consistent with published estimates indicating that non-immortalized long-term cultures occur in approximately 10% of primary cultures (34). Finally, many cell lines have been partially characterized, both at the molecular and cellular level, and often details related to the clinical course of the disease are lacking. Ideally, clinical profiles accompanied by a detailed molecular characterization would make cell lines a more attractive model.

Little is known on the acquired genetic changes occurring *in vitro* or the selection process allowing the establishment of a cell line (27, 35-38). This raises the question of the relationship of the ultimate cell lines with the initial starting material. The molecular studies comparing the genetic make up of our permanent cell lines with the original tumor material supports the concept that the cells in culture are representative of the epithelial cancer cells in the original tumor (5, 31). In particular, while an early passage (P2) culture displayed both a wild-type and mutant SSCP pattern for exon 5 of the *P53* gene, indicating normal cell contamination, a later passage (P8) showed almost exclusively the mutant pattern, while in the permanent cell line only the mutant pattern is observed (unpublished). Certain disadvantages of permanent

cell lines have been raised, including the fact that a sub-set of tumor cells may be selected for in culture and that over time these cell lines display some genetic instability. This need not be a serious criticism since a particular genetic event, once identified, can be assessed in fresh frozen tissue tumor banks to validate its importance in ovarian cancer progression.

Chromosomal aberrations in ovarian cancer can involve either simple or complex karyotypic changes in which it is possible to observe multiple numerical and structural abnormalities of chromosomes. OV-90 and TOV-112D display complex karyotypes in sharp contrast to the simple karyotypic change (ie. trisomy 10) seen in TOV-21G and the near normal karyotype of TOV-81D. Because TOV-21G carries only a simple karyotypic change, in contrast with most of the frequently studied commercially available ovarian cancer cell lines which all present complex changes, it may represent a good cellular model for identifying and characterizing genes implicated in ovarian carcinogenesis.

It is important to note that the growth characteristics of the cells in culture parallel the prognosis of the patient. In particular, patient #112 had an extremely aggressive disease and the corresponding TOV-112D cell line is the cell line with the fastest doubling time, grows to the highest saturation densities, forms large colonies in soft agarose and produces tumors rapidly (as early as 2 weeks) in xenograft experiments. In contrast, patient #81 is still alive (>7 year survival) despite the fact that she was diagnosed with advanced disease. The TOV-81D cell line has a morphology similar to that of normal ovarian cell cultures and is unable to form colonies in soft agarose or to form tumors in *nude* mouse xenografts. Interestingly, normal ovarian cultures tend to undergo mesenchymal conversion and express low levels of keratin (39, 40) as seen in TOV-81D. This contrasts with a published report which suggests

that ovarian surface epithelial cells derived from women having a family history of ovarian cancer and ovarian carcinomas are more resistant to mesenchymal conversion and express higher levels of keratin (41). Since TOV-81D was derived from a patient with a positive familial history it might be expected to express high levels of keratin. However, the association between high levels of keratin expression and a familial history was assessed in cultures principally derived from patients harboring mutations in the *BRCA1* gene. It may be that similar high levels of keratin expression are not associated with mutations in *BRCA2*, the gene mutated in TOV-81D. This results is not unexpected since *BRCA1* and *BRCA2* confer different susceptibilities for ovarian cancers and thus the underlying biology of cancer in these two contexts may be different (42-44).

The extensive molecular characterization we have performed makes these four different cell lines an attractive model to pursue research in ovarian cancer research. In addition, they clearly have different genetic anomalies and are thus useful to address different questions. In particular, *P53* mutations are observed in both TOV-112D and OV-90 while only OV90 has been shown to carry a mutation in the one remaining copy of the *P16* gene. Moreover, the fact that all cell lines were derived prior to any adjuvant chemotherapy or radiation therapy avoids complicating secondary effects related to treatment. As TOV-81D was derived from a patient with a familial history of breast and ovarian cancer, this cell line may be a good model for the development of ovarian cancer in the context of *BRCA2* mutations. Interestingly, the intra-peritoneal tumorigenesis assay of these cell lines also offers a very interesting animal model of ovarian carcinoma in that the tumor material remains intra-peritoneal and propagates along the surfaces of the peritoneum, with occasional formation of ascites, mimicking disease progression in human ovarian cancer.

Thus the four new cell lines we describe herein provide an interesting new resource to study some of the dynamics and differential aspects of ovarian cancer biology.

MATERIALS AND METHODS:

Source of ovarian material:

Biopsy material from ovarian tumors (TOV) and ascites (OV) were collected following surgeries performed at the CHUM-Campus Notre-Dame. Fresh ovarian tumors, ascites and blood were obtained following appropriate consent. Portions of the solid tumors were selected following macroscopic assessment by both a gynaecologic-pathologist as well as a gynaecologic-oncologist. Histology reports were obtained, and the disease was graded and staged according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics criteria. Individual patients were assigned a numerical code respecting confidentiality.

Clinical characteristics:

Familial and clinical history, as well as survival data were obtained from medical records. Results are summarized in Table 1.

Establishment of cell lines:

Primary cell cultures were established as described previously (5). Primary cultures were frozen at early passages as described (5). In four cases

(TOV-21G, TOV-81D, TOV-112D, and OV90) primary cultures failed to enter crisis and gave rise to spontaneously immortalized cell lines. Cell lines were maintained in OSE media consisting of 50:50 medium 199:105 (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) as previously described (45) supplemented with 2.5 ug/ml fungizone and 50 ug/ml gentamicin. nu-IPTOV-21G-1, nu-SC-TOV-21G-2, nu-SC-OV-90-1, nu-IP-TOV-112D-1, nu-IP-TOV-112D-3 were derived from subcutaneous injections (SC lines) or intraperitoneal injections (IP lines) in *nude* (nu) mice tumor xenografts from the corresponding parental cell line (TOV-21G, OV-90 and TOV-112D) and were established in culture using the same protocol.

Immunodetection:

Cells were grown on eight-chamber Lab-Tek slides (Nunc) in OSE media supplement with 10% FBS or directly on Corning slides. Slides were washed twice in PBS and then fixed by incubation in 2:1 acetone-methanol at -20°C for 15 min. and air-dried for 30 min at room temperature. Slides were blocked in 10% FBS/PBS for 30 min at room temperature. For immunodections antibodies were diluted appropriately in PBS and incubated for 30 min at 37°C . Immunofluorescence was performed with the following antibodies: CAM5.2 cytokeratins 8, 18, 19 antibody (Becton-Dickinson), MH99 (24, 25), and B72.3 (26). Immunodetection was subsequently performed using a streptavidin-biotin fluoresceine-based kit (ICN). Nuclei were counterstained with ethidium bromide (1 ug/ml) for 15 min. Slides were washed in PBS, air-dried, and mounted with Permount (Sigma). Immuohistochemistry was performed using the AB-3 *neu* oncoprotein specific antibody (Oncogene

Science). Detection of *neu* reactivity was via horseradish peroxidase reaction as described previously (46).

Growth characteristics:

The growth characteristics of the individual cell lines were determined in duplicate by plating cells at an initial density of 1×10^5 cells/60 mm plates in OSE media supplemented with 10% FBS. Growth curves were generated by monitoring cell growth by trypsinizing and counting cells using an hemacytometer at 2 days intervals for 12 to 15 days. Doubling times were determined by analysis of the growth curves using data from the exponential phase of growth. Saturation densities were determined by analysis of the growth curves.

Cell lines were also assayed for their ability to grow with anchorage independence by plating 1×10^5 cells in 0.33 % (w/v) agarose in complete medium (OSE, 10% FBS) on a bed of 0.66 % (w/v) agarose also in complete medium (OSE, 10% FBS). After two to four weeks colonies were visualized and counted.

Conventional cytogenetics:

Short-term cultures of cell lines were maintained in 25 cm plastic flasks in minimal essential medium supplemented with 20% FBS, 1% glutamine and 1% antibiotics. After culturing for 44 hours at 37°C, cells were exposed to Colcemid (0.3 ug/ml) for three hours. Cells were harvested with trypsin-EDTA followed by hypotonic treatment in 0.28% KCl and repeatedly fixed in methanol: acetic acid (3:1). GTG banding was obtained and 18-37 analyzable

metaphases were karyotyped for each cell line and described according to the ISCN (47). All clonal abnormalities were identified at least in two different flask preparations.

DNA extraction:

DNA extractions were performed on fresh and cultured specimens from solid tumors and ascites. Tissues were cut into small pieces using surgical scissors and suspended in 500 ul of extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA and 400 mM NaCl). In the case of ascites, cell pellets were collected by centrifugation and resuspended in 100 ul of extraction buffer. Cultured cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 100 ul of extraction buffer. All subsequent samples received the same treatment. Ten micrograms of RNase was added and the solution was incubated at room temperature for 15 minutes. Following the addition of proteinase K and SDS (400 ng and 0.5% respectively) the mixture was incubated at 55°C overnight and extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). The DNA was then precipitated and resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 and 0.1 mM EDTA prior to polymerase chain reaction (PCR) amplification.

PCR-SSCP Analysis of *P53* and *P16*:

For the analysis of *P53*, oligonucleotides primers used for exons 5-9 and PCR conditions have been described previously (31). In the case of *P16* gene, exons 1 and 2A/B were amplified from 2 ug of genomic DNA using previously published primers (48). In a final reaction volume of 50 ul were added the following: 5 ul 10x Taq buffer (Pharmacia), 8 ul 1.25 mM dNTPs, 2 ul

of a 20 μ M stock of appropriate *P16* primers, 0.5 units of Taq polymerase (Pharmacia) and 1 uCi [32 P]-dCTP. Templates were denatured 2 minutes at 94°C. Each sample was then subjected to 35 cycles at 94°C, 60°C, 72°C, each 1 minute. Extension at 72°C was increased to 10 minutes for the last cycle. For SSCP analysis, 10 μ l of the PCR product was diluted 5-fold in 0.1% SDS, 10 mM EDTA and 5 μ l was added to 15 μ l of loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol), heat denatured at 95°C for 3 min. and chilled on ice. 5 μ l was loaded onto a 6% non-denaturing polyacrylamide gel (49:1 acrylamide to bis-acrylamide) containing 5% (v/v) glycerol and 0.5 X TBE (49). Gels were run with constant power (25-30W) at room temperature. Following electrophoresis, the gels were dried and exposed to X-ray film at -80°C for one or two days. All samples were tested in duplicate.

DNA Sequencing:

For DNA sequencing, 2 μ l of the appropriate *P53* exon were amplified as described. Internal primers were labeled with [γ - 32 P] ATP and the PCR product was subsequently diluted 10-fold and sequenced directly following a modification of the Sanger dideoxy method (50) using Sequenase 2.0 (United States Biochemical, Cleveland, OH). The altered *P16* SSCP-PCR products ligated to a EcoRV digested TA tailed SP6-Bluescript plasmid (Stratagene) and appropriate clones were sequenced using commercial primers. The reactions were analyzed on a 6% acrylamide sequencing gel (51). After electrophoresis, gels were dried and exposed to Kodak XAR film overnight.

***BRCA1* and *BRCA2* expression analysis.**

BRCA1 and *BRCA2* RNA expression was analyzed by RT-PCR: Total RNA extracted from the cell lines was reverse transcribed using the random primer pd(N)₆ and M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL). An internal control for expression of β -actin gene was performed in every cDNA sample synthesized (52). RT-PCR reactions for *BRCA1* were carried out in a final volume of 50 μ l using 300 ng of cDNA and oligonucleotides 947 and 621 which have been described previously (53). The reaction mixture was submitted to 35 cycles of the following: 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute, completed by a final extension at 72°C for 7 minutes. RT-PCR products were visualized on 2% agarose gel with ethidium bromide staining and UV light fluorescence. *BRCA2* specific oligonucleotides for RT-PCR have been described (54). For the *BRCA2* RT-PCR, 300 ng of cDNA was used and submitted to a first round of amplification: 20 cycles of 95°C, 55°C, 72°C each for 45 seconds in a final volume of 20 μ l. The samples were then diluted 10-fold and 2 μ l of the dilution was submitted to a second round of amplification with 1 μ Ci of (α^{32} P) dCTP: 18 cycles of 95°C, 55°C, 72°C for 45 seconds each, in a final volume of 20 μ l. RT-PCR products were revealed on 5% non-denaturing acrylamide gel and by autoradiography at -80°C with intensifying screens.

Tumorigenicity assay:

Tumor formation in young female athymic *nude* mice was performed by subcutaneous left gluteal and intra-peritoneal injection for each cell lines. Both subcutaneous and intra-peritoneal sites were injected with $1-3 \times 10^6$ cells

suspended in phosphate-buffered saline. Animals were housed under clean conditions in a laminar flow environment with *ad lib* access to food and water. Tumor formation was measured over time. Animals were sacrificed after two to 24 weeks or before neoplastic masses reached >1 cm. Standard light microscopy of the original tumor and their xenografts counterparts (subcutaneous and intra-peritoneal) were compared.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank C. Godbout, M.-J. Milot, F. Dion and M.-C. Faucher for technical assistance. We thank D. Fink, A. Pilon and F. Brabant for help with the molecular analysis. We are grateful to Dr. P. Drouin for providing clinical specimen TOV21-G , Dr. P. Gauthier for TOV-81D, Drs. R. Vauclair and J. Gauthier for pathology and N. Belanger for clerical assistance with pathology reports. We thank Dr. K.O. Lloyd and M.G. Federici (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) for the SKOV-3 cell lines and antibodies CAM5.2, B72.3 and MH99. We thank Drs. L. Masson and R. Kothary for critical reading of the manuscript. This research was partially funded by NCI and MRC grants to P.N.T., A.-M.M.-M. and D.P. A.-M.M.-M. is the recipient of an F.R.S.Q. senior fellowship. P.N.T. is an CRS-MRC scholar.

REFERENCES:

1. Whitman, G., Nolan, T., and Gallup, D. Normal ovarian development and function. New York: Raven Press Ltd, 1993.
2. Serov, S. F., Scully, R., and Sobin, L. H. Histological typing of ovarian tumours., Vol. 9: World Health Organization., 1973.
3. Morrow, C. P. and Curtin, J. P. Synopsis of gynecologic oncology, Fifth edition edition, p. 584. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone, 1998.
4. Easton, D. F., Bishop, D. T., Ford, D., and Crockford, G. P. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 amilies. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 678-701, 1993.
5. Lounis, H., Provencher, D., Godbout, C., Fink, D., Milot, M. J., and Mes-Masson, A. M. Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp. Cell Res.* 215: 303-9, 1994.
6. Buller, R. E., Niemann, T., Connor, J. P., Squatrito, R. C., Skilling, J. S., and Anderson, B. Isolation and preliminary characterization of an ovarian carcinoma cell line from a patient with familial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 56: 39-44, 1995.

7. Hamilton, T. C., Young, R. C., McKoy, W. M., Grotzinger, K. R., Green, J. A., Chu, E. W., Whang-Peng, J., Rogan, A. M., Green, W. R., and Ozols, R. F. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* 43: 5379-89, 1983.
8. Alama, A., Barbieri, F., Favre, A., Cagnoli, M., Noviello, E., Pedulla, F., Viale, M., Foglia, G., and Ragni, N. Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol. Oncol.* 62: 82-8, 1996.
9. Bast, R. C., Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L. M., Colvin, R. B., and Knapp, R. C. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* 68: 1331-7, 1981.
10. Hirte, H. W., Kaiser, J. S., and Bacchetti, S. Establishment and characterization of four human epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Cancer.* 74: 900-6, 1994.
11. Provencher, D. M., Finstad, C. L., Saigo, P. E., Rubin, S. C., Hoskins, W. J., Federici, M. G., Stockert, E., Lloyd, K. O., and Lewis, J. L., Jr. Comparison of antigen expression on fresh and cultured ascites cells and on solid tumors of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 50: 78-83, 1993.
12. Langdon, S. P., Lawrie, S. S., Hay, F. G., Hawkes, M. M., McDonald,

- A., Hayward, I. P., Schol, D. J., Hilgers, J., Leonard, R. C., and Smyth, J. F. Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 48: 6166-72, 1988.
13. Golombick, T. and Bezwoda, W. R. *In vitro* maintenance of a new ovarian cancer cell line in protein-free media: a potential model for autonomous growth and tumor progression. *Eur. J. Cell Biol.* 56: 459-63, 1991.
 14. Golombick, T., Dansey, R., Bezwoda, W. R., and Rosendorff, J. Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cell lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth characteristics, biochemical, and cytogenetic studies. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26: 447-54, 1990.
 15. Yamada, T., Ueda, M., Otsuki, Y., Ueki, M., and Sugimoto, O. Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol.* 40: 118-28, 1991.
 16. Wong, W. S., Wong, Y. F., Ng, Y. T., Huang, P. D., Chew, E. C., Ho, T. H., and Chang, M. Z. Establishment and characterization of a new human cell line derived from ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 38: 37-45, 1990.

17. DiSaia, P. J., Morrow, M., Kanabus, J., Piechal, W., and Townsend, D. E. Two new tissue culture lines from ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 3: 215-9, 1975.
18. Sinna, G. A., Beckman, G., Lundgren, E., Nordenson, I., and Roos, G. Characterization of two human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* 7: 267-80, 1979.
19. Grunt, T. W., Oeller, H., Somay, C., and Dittrich, C. Different propensity for spontaneous differentiation of cell clones isolated from the human ovarian surface epithelial cell line HOC-7. *Differentiation.* 53: 45-50, 1993.
20. Fogh, J. and Trempe, G. *New human tumor cell lines.* New York: Plenum Press, 1975.
21. Woods, L. K., Morgan, R. T., Quinn, L. A., Moore, G. E., Semple, T. U., and Stedman, K. E. Comparison of four new cell lines from patients with adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Res.* 39: 4449-59, 1979.
22. Crickard, K., Niedbala, M. J., Crickard, U., Yoonessi, M., Sandberg, A. A., Okuyama, K., Bernacki, R. J., and Satchidanand, S. K. Characterization of human ovarian and endometrial carcinoma cell lines established on extracellular matrix. *Gynecol. Oncol.* 32: 163-73, 1989.

23. Buick, R. N., Pullano, R., and Trent, J. M. Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 45: 3668-76, 1985.
24. Mattes, M. J., Cairncross, J. G., Old, L. J., and Lloyd, K. O. Monoclonal antibodies to three widely distributed human cell surface antigens. *Hybridoma.* 2: 253-64, 1983.
25. Mattes, M. J., Look, K., Furukawa, K., Pierce, V. K., Old, L. J., Lewis, J. L., Jr., and Lloyd, K. O. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. *Cancer Res.* 47: 6741-50, 1987.
26. Thor, A., Gorstein, F., Ohuchi, N., Szpak, C. A., Johnston, W. W., and Schlom, J. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) in ovarian carcinomas defined by monoclonal antibody B72.3. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 995-1006, 1986.
27. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 244: 707-12, 1989.
28. Lounis, H., Mes-Masson, A.-M., Dion, F., Bradley, W. E., Seymour, R. J., Provencher, D., and Tonin, P. Mapping of chromosome arm 3p deletions in unselected human epithelial ovarian cancers.. *Oncogene.* 17: 2359-2366, 1998.

29. Phelan, C. M., Lancaster, J. M., Tonin, P., Gumbs, C., Cochran, C., Carter, R., Ghadirian, P., Perret, C., Moslehi, R., Dion, F., Faucher, M. C., Dole, K., Karimi, S., Foulkes, W., Lounis, H., Warner, E., Goss, P., Anderson, D., Larsson, C., Narod, S. A., and Futreal, P. A. Mutation analysis of the *BRCA2* gene in 49 site-specific breast cancer families. *Nat. Genet.* 13: 120-2, 1996.
30. Narod, S., Tonin, P., Lynch, H., Watson, P., Feunteun, J., and Lenoir, G. Histology of *BRCA1*-associated ovarian tumours. *Lancet.* 343: 236, 1994.
31. Provencher, D. M., Lounis, H., Fink, D., Drouin, P., and Mes-Masson, A. M. Discordance in *P53* mutations when comparing ascites and solid tumors from patients with serous ovarian cancer. *Tumor Biol.* 18: 167-74, 1997.
32. Yuan, Y., Kim, W.-H., Han, H. S., Lee, J.-H., Park, H.-S., Chung, J.-K., Kang, S.-B., and Park, J.-G. Establishment and characterization of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* 66: 378-387, 1997.
33. Rubin, S. C., Kairemo, K. J., Brownell, A. L., Daghighian, F., Federici, M. G., Pentlow, K. S., Finn, R. D., Lambrecht, R. M., Hoskins, W. J., Lewis, J. L., Jr., and et al. High-resolution positron emission tomography of human ovarian cancer in nude rats using ¹²⁴I-labeled monoclonal antibodies. *Gynecol. Oncol.* 48: 61-7, 1993.

34. Crickard, K., Crickard, U., Yoonessi, M., and Caglar, H. Extracellular matrix-coated culture dishes: an *in vitro* model for primary human gynecologic tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 19: 51-6, 1986.
35. Simon, W. E., Albrecht, M., Hansel, M., Dietel, M., and Holzels, F. Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 839-45, 1983.
36. Rose, P. G., Koolemans-Beynen, A., Boutselis, J. G., Minton, J. P., and Milo, G. E. An improved human tumor stem cell assay in ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156: 730-4, 1987.
37. Mills, G. B., May, C., McGill, M., Roifman, C. M., and Mellors, A. A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization, and mechanism of action. *Cancer Res.* 48: 1066-71, 1988.
38. Karlan, B. Y., Baldwin, R. L., Cirisano, F. D., Mamula, P. W., Jones, J., and Lagasse, L. D. Secreted ovarian stromal substance inhibits ovarian epithelial cell proliferation. *Gynecol. Oncol.* 59: 67-74, 1995.
39. Auersperg, N., Maines-Bandiera, S. L., Dyck, H. G., and Kruk, P. A. Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab. Invest.* 71: 510-8, 1994.

40. Maines-Bandiera, S. L., Kruk, P. A., and Auersperg, N. Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenetic responses to extracellular matrix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 729-35, 1992.
41. Dyck, H. G., Hamilton, T. C., Godwin, A. K., Lynch, H. T., Maines-Bandiera, S., and Auersperg, N. Autonomy of the epithelial phenotype in human ovarian surface epithelium: changes with neoplastic progression and with a family history of ovarian cancer. *Int. J. Cancer.* 69: 429-36, 1996.
42. Easton, D. F., Narod, S. A., Ford, D., and Steel, M. The Genetic Epidemiology Of *BRCA1*, *Lancet.* 344: 761, 1994.
43. Narod, S. A., Feunteun, J., Lynch, H. T., Watson, P., Conway, T., Lynch, J., and Lenoir, G. M. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet.* 338: 82-3, 1991.
44. Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A., Goldgar, D. E., Haites, N., Milner, B., Allan, L., Ponder, B. A. J., Peto, J., Smith, S., Stratton, M., Lenoir, G. M., Feunteun, J., Lynch, H., Arason, A., Barkardottir, R., Egilsson, V., Black, D. M., Kelsell, D., Spurr, N., Devilee, P., Cornelisse, C. J., Varsen, H., Birch, J. M., and et al. Risks Of Cancer In *BRCA1*-Mutation Carriers. *Lancet.* 343: 692-695, 1994.

45. Kruk, P. A., Maines-Bandiera, S. L., and Auersperg, N. A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab. Invest.* 63: 132-6, 1990.
46. Gu, K., Mes-Masson, A. M., Gauthier, J., and Saad, F. Overexpression of her-2/neu in human prostate cancer and benign hyperplasia. *Cancer Lett.* 99: 185-9, 1996.
47. ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger, 1995.
48. Zhang, S. Y., Klein-Szanto, A. J., Sauter, E. R., Shafarenko, M., Mitsunaga, S., Nobori, T., Carson, D. A., Ridge, J. A., and Goodrow, T. L. Higher frequency of alterations in the *P16/CDKN2* gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res.* 54: 5050-3, 1994.
49. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Vol. 1-3. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
50. Meltzer, S. J., Mane, S. M., Wood, P. K., Johnson, L., and Needleman, S. W. Sequencing products of the polymerase chain reaction directly, without purification. *Biotechniques.* 8: 142-8, 1990.
51. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-7, 1977.

52. Alonso, S., Minty, A., Bourlet, Y., and Buckingham, M. Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.* **23**: 11-22, 1986.
53. Wilson, C. A., Payton, M. N., Elliott, G. S., Buaas, F. W., Cajulis, E. E., Grosshans, D., Ramos, L., Reese, D. M., Slamon, D. J., and Calzone, F. J. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of *BRCA1* and the splice variant *BRCA1*-delta11b. *Oncogene*. **14**: 1-16, 1997.
54. Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J. F., Goldgar, D. E., and et al. The complete *BRCA2* gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat. Genet.* **12**: 333-7, 1996.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. Morphological aspect of cell lines. Three of the cell lines (TOV-21G, panel A; TOV-112D, panel B; OV-90, panel C) show a highly rounded and refractile morphology characteristic of highly transformed cell lines, similar to the morphology of the commercially available NIH:OVCAR3 cell line derived from a malignant ovarian ascites (not shown). Both the TOV-81D cell line (panel D) and the commercially available SKOV-3 line (panel E), derived from a malignant ovarian ascites, appear as flat epithelial cells with larger surfaces. In all cases magnification was 200X.

Figure 2. Growth of cells in soft agarose. Three cell lines (TOV-21G, OV-90 and TOV-112D) readily formed colonies in a semi-solid environment. Note especially the rapid growth of TOV-112D colonies. TOV-81D was unable to grow in soft agarose and remained as single cell suspensions. TOV-21G and TOV-112D were photographed after two weeks of growth while OV-90 and TOV-81D cells were photographed after three weeks. Cells were photographed through a dissecting microscope at a magnification of X15.

Figure 3. Growth rate of ovarian cell lines in culture. Growth curves were generated by monitoring cell numbers at two days intervals for 14 days. Data points represent the average of duplicates.

Figure 4. RT-PCR analysis of *BRCA1* and *BRCA2* expression. *BRCA1* primers (panel A) revealed a 327 and 207 bp product in all cell lines. The larger PCR product represent full-length message while the smaller product results from a splice variant which removes exons 9-10 as described previously (Wilson et

al., 1997). The *BRCA2* product (panel B) was ^{32}P -labeled and a single 204 bp fragment was seen in all cell lines. The intensity of signals in panel A and B varied over different experiments and is not meant to be quantitative. β -actin served in all cases as a control for the PCR reaction (not shown).

Figure 5. Histopathological appearance of ovarian tumors and their respective mouse xenografts. The architectural and cytological features of the mouse xenografts are consistent with those of the primary human tumors. (X200).

Figure 6. Growth rate of parental cell lines and derivative xenografts cell lines. While cell lines derived from mouse xenografts from TOV-112D (panel A) and OV-90 (panel B) showed essentially the same growth pattern as the parental lines, lines isolated from TOV-21G xenografts (panel C) displayed a slower growth pattern as compared to the parental cell line. For comparison, panel D illustrates the growth rates of the cell lines capable of generating tumors in nude mice.

Table 1: Characteristics of original tumor and clinical data

Cell line	Established*	Age+	Source	Histopathology	Stage	Grade	Survival	Familial history
TOV-21G	10-91	62	tumor	Clear cell carcinoma	III	III	N/D**	no
TOV-81D	07-92	66	tumor	Papillary serous adenocarcinoma	IIIc	II	7 yrs++	yes
TOV-112D	10-92	42	tumor	Endometrioid carcinoma	IIIc	III	3 months****	unknown
OV-90	08-92	64	ascites	Adenocarcinoma	IIIc	III	18 months	no

* month and year sample was received

+age of diagnosis

**ND no data, patient died of post-operative complications

++ time to relapse

*** in spite of early initiated platinum-based chemotherapy

Table 1, Lounis et al.

Table 2, Lounis et al.

Table 2: Antigen presentation by ovarian cancer cell lines

Cell line	CAM5.2	MH99	B72.3	neu
TOV-21G	+++	+++	+++	+++
TOV-81D	+	+++	+++	+++++
OV-90	+++	+++	+++	+++++
TOV-112D	+++	+++	+++	+++
SKOV-3	+++	++	++	+++
NIH3T3	-	-	-	
CV-1				-

+ weakly positive
 ++ moderately positive
 +++ positive
 +++++ strongly positive

Table 3, Lounis et al.

Table 3: Biological Characteristics of Spontaneously Transformed Cell lines

Cell line	Doubling Time (days)	Relative Saturation Density	Growth in Soft Agar	Nude Mouse Tumor Assay	Time of appearance*
TOV-21G	1.5	+++++	+++	4/4	3-12*
TOV-81D	4-6	+	-	0/4	-**
OV-90	1.5	+++++	++	2/4	3-12
TOV-112D	0.8	+++++++	+++++	4/4	2-5
SKOV-3	1.5	+++	++ ^{***}	4/4	6

ND = not done

* weeks for tumor to reach .5cm

** no tumors seen up to 24 weeks

*** based on results from Buick et al., 1985

Table 4, Lounis et al.

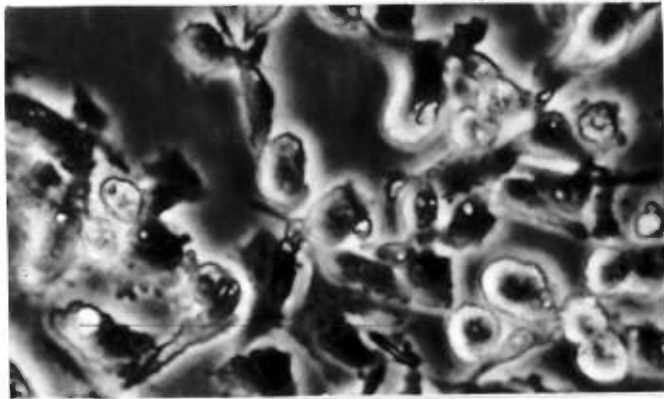
Table 4: Molecular Characteristics and Karyotype of Spontaneously Transformed Cell lines

Cell Line	Mutations*: p53	p16	Karyotype**
TOV-21G	wt	wt	47,XX,+10
TOV-81D	wt	wt	46, XX, del (3) (p14.1:p14.3)
TOV-112D	exon5	wt	52, X, add(X)(p22), +add(1)(p22), +add(1)(p22), +2, +9, +12, add(15)(p11), +17
OV-90	exon6	exon2	46, XX, der(1)t(1:10)(p36:p15), hsr(3)(p11),der(9:17)(q10:q10), der(10)t(10:17)(p15:p12p13), der(13)t(13:13)(p11:q14)

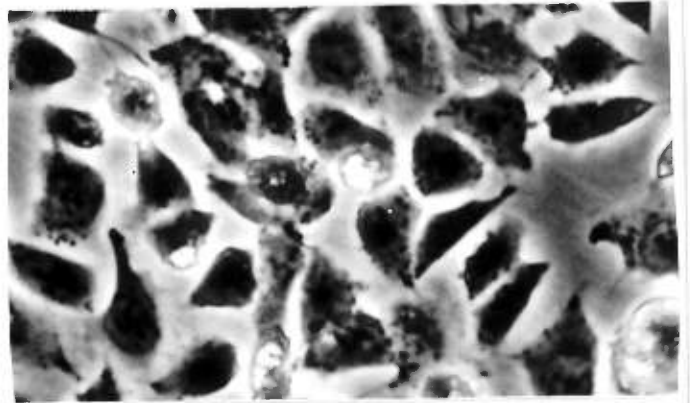
* in all cases where mutations have been observed we have also observed the loss of the wild-type allele

**no less than 18 cells were analyzed; results represent major composite karyotype of primary cultures between passages 23-32

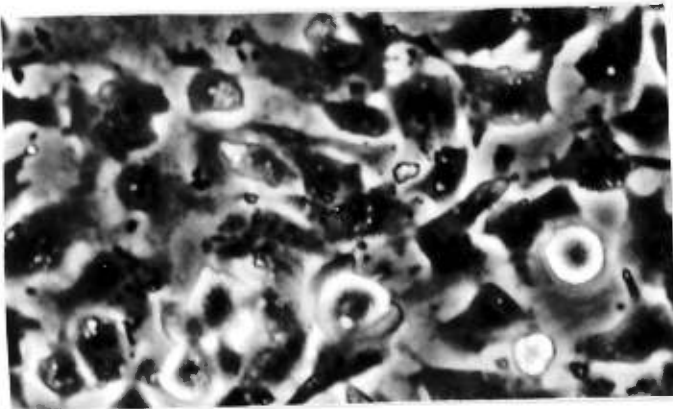
Figure 1, Lounis et al.



(A)



(B)



(C)



(D)



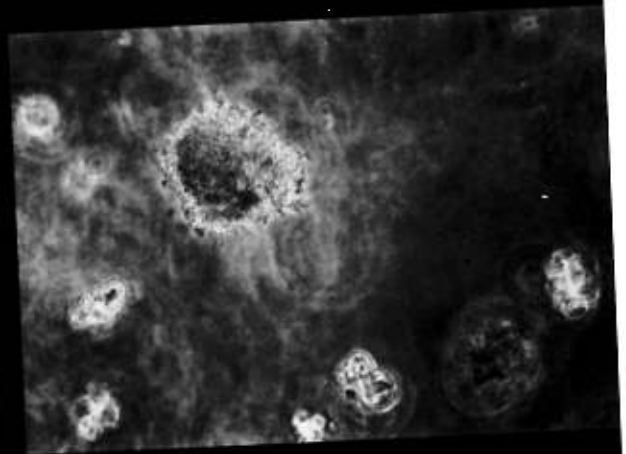
(E)

Figure 2, Lounis et al.

TOV-112D



TOV-21G



OV-90



TOV-81D

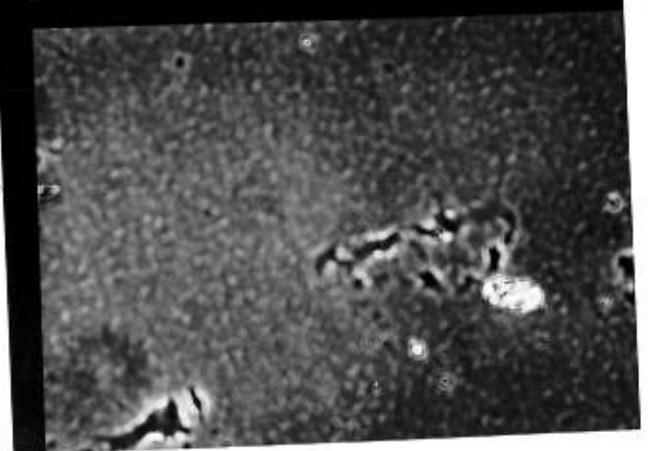


Figure 3, Lounis et al.

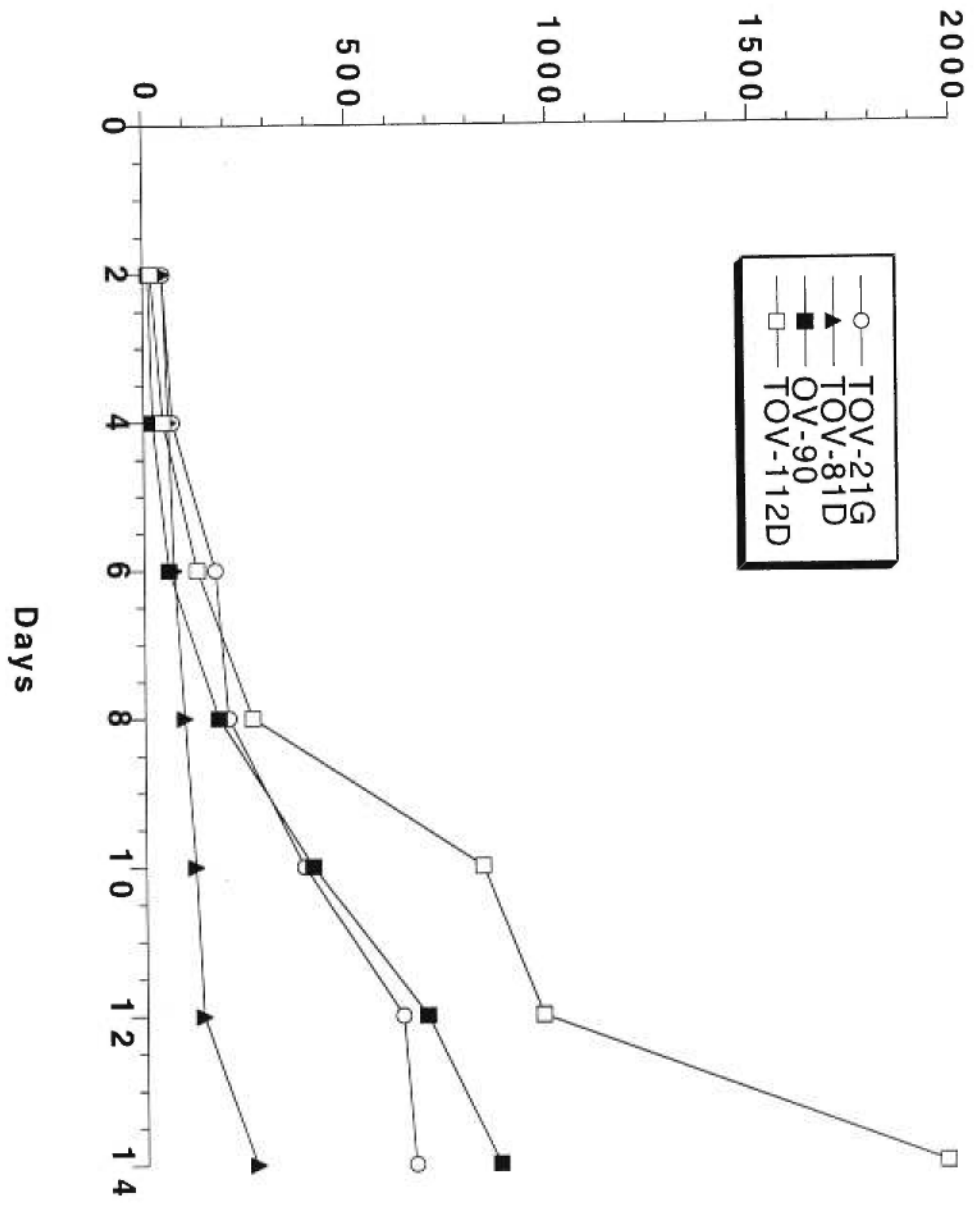


Figure 4, Lounis et al.

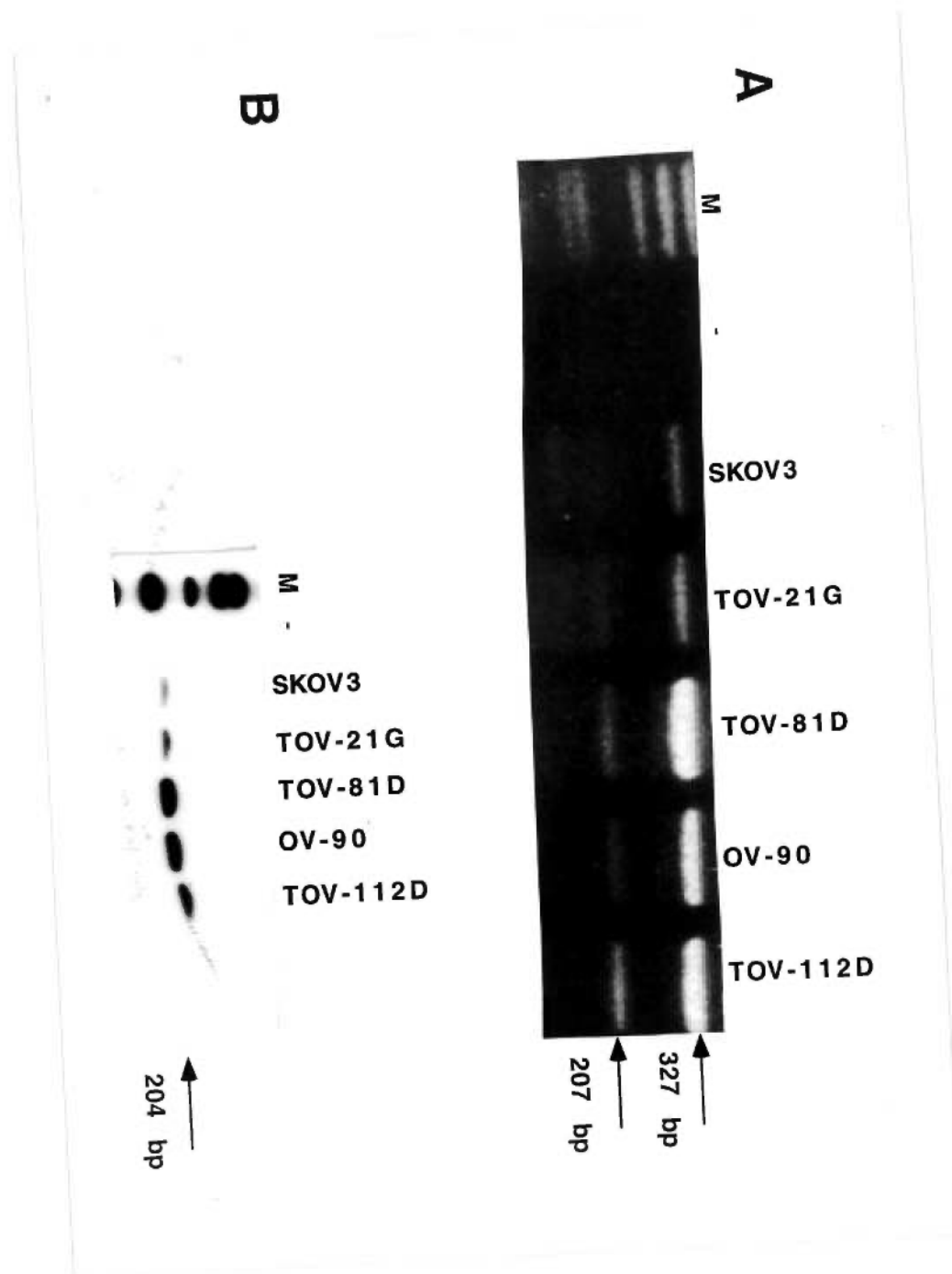
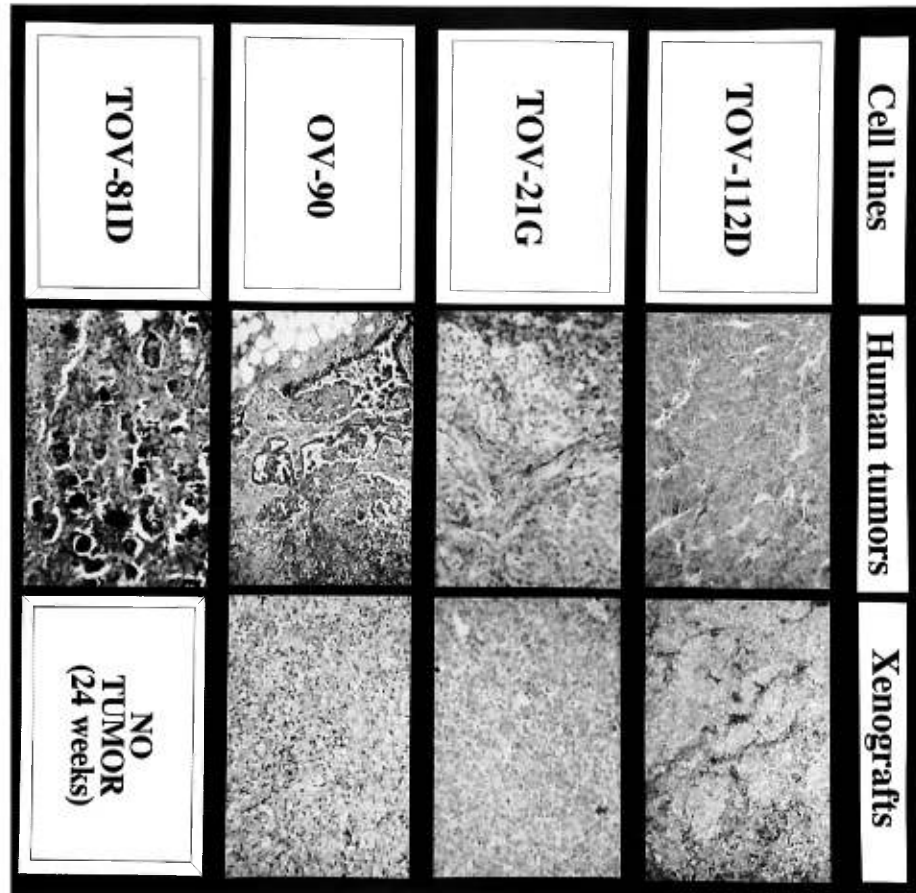
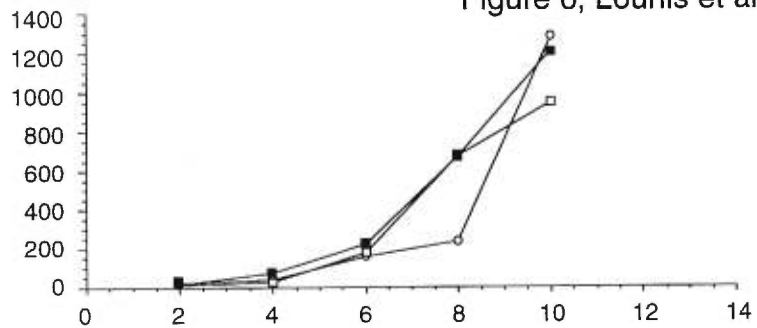


Figure 5, Lounis et al.



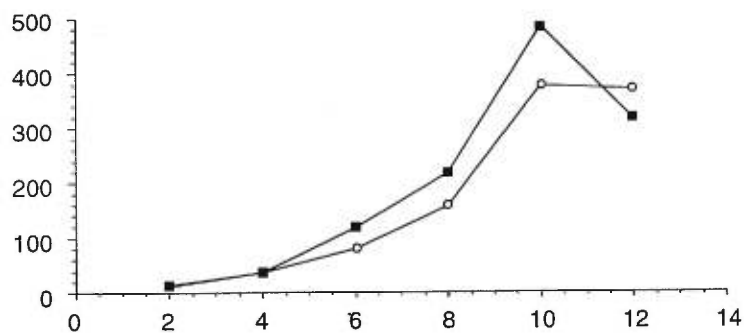
A

Figure 6, Lounis et al.



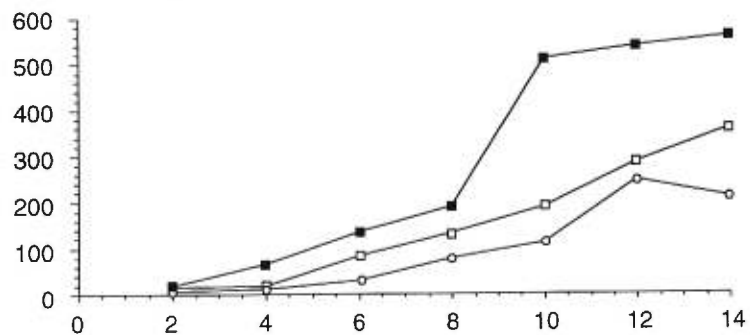
■ TOV-112D
 ○ NU-IP TOV112D(2) #1
 □ NU-IP TOV112D #3

B



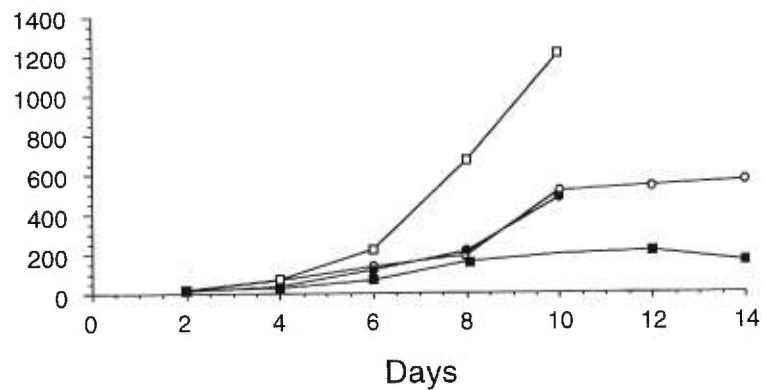
■ OV-90
 ○ NU-SC OV-90 #1

C



■ TOV-21G
 ○ NU-SC TOV-21G #2
 □ NU-IP TOV-21G #1

D



■ SKOV-3
 ○ TOV-21G
 □ TOV-112D
 ● OV-90

CHAPITRE IV

**Article 3. Mapping of Chromosome 3p Deletions in Human Epithelial
Ovarian Tumors**

**Article publié dans la revue Oncogene,
volume 17, p. 2359-2365, 1998.**

Mapping of Chromosome 3p Deletions in Human Epithelial Ovarian Tumors

Hafida Lounis¹, Anne-Marie Mes-Masson^{1,2,*}, France Dion⁵, W. Edward C. Bradley^{1,2}, Robert J. Seymour⁴, Diane Provencher^{1,3} and Patricia N. Tonin^{5,6}.

Running Title: Chromosome 3p deletions in human ovarian cancer.

¹CHUM-Campus Notre-Dame/Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1; ²Département de Médecine, ³Département d'Obstétrique-Gynécologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J2; ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, and ⁵Montreal General Hospital Research Institute, 1650, Cedar Ave., Montreal, Quebec, Canada, H3G 1A4; ⁶Departments of Medicine and Human Genetics, McGill University, Montreal, Quebec.

*Corresponding author: Anne-Marie Mes-Masson

CHUM- Campus Notre-Dame

Institut du Cancer de Montréal

1560, Sherbrooke est

Montréal, Québec

Canada, H2L-4M1

TEL.: (514) 281-6000 ext. 5496

FAX: (514) 896-4689

E-mail: mesmassa@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

Epithelial ovarian tumors frequently display deletions on the short arm of chromosome 3 suggesting the existence of tumor suppressor genes within the deleted regions. We have recently established a primary tissue culture system as a model to investigate the genetic events associated with ovarian cancer. The frequencies of loss of heterozygosity (LOH) at 16 loci representative of chromosome 3p in 33 tumor biopsies and 47 ovarian primary cultures derived from unselected ovarian cancers were examined. This repertoire also included benign and borderline tumors as well as malignant ovarian ascites. LOH was observed in 25 (31%) samples for at least one marker: 21 of 58 malignant, 2 of 12 borderline and 2 of 10 benign specimens. Chromosome 3p loss was not restricted to ovarian tumors of high grade and stage. LOH was observed in both cultured and non cultured tumors and ascites. A spontaneously immortalized cell line derived from a malignant ovarian ascites, OV-90, displayed LOH of the majority of markers suggesting loss of one homologue of chromosome 3p. The pattern of deletion displayed by these 25 samples enabled the determination of at least two distinct regions of overlapping deletions on chromosome 3p extending from D3S1270 to D3S1597 and from D3S1293 to D3S1283. In addition, a region proximal to D3S1300 was deleted in a subset of samples. Although loss of loci overlapping these three regions (Regions I, II and III) were observed in malignant and benign tumors, in borderline tumors loss was observed of markers representative of Region III only. While *RARB* is presently included in Region II, the minimal regions of deletion exclude *VHL*, *TGFBR2*, *PTPase γ* and *FHIT* as candidate tumor suppressors in ovarian tumorigenesis.

Key words: Ovarian, chromosome 3p, loss of heterozygosity, tumor suppressor.

INTRODUCTION

Ovarian cancers arising from the surface epithelium are the second most common gynecological cancer and account for nearly half of all deaths associated with gynecological related malignancies. The high mortality is mainly related to the absence of the symptoms in the majority of women in the early stages of the disease. Epithelial ovarian cancers represent 87% of all ovarian cancers and originate from either the ovarian surface epithelium (OSE) or from the crypts or inclusion cysts developed from this surface epithelium (Whitman *et al.*, 1993). Ovarian tumors are classified according to the cell type (serous, mucinous, endometrioid, clear cell, Brenner and undifferentiated or mixed histology), grade (borderline or low malignancy potential and well-to poorly differentiated carcinomas) and stage (I-IV) (Whitman *et al.*, 1993). This complexity of classification reflects the heterogeneity of epithelial ovarian cancer.

The molecular events underlying the development of carcinomas that arise from the OSE are still largely unknown. Numerous karyotype analyses have demonstrated a number of recurrent numerical and structural anomalies associated with chromosome 3p (Pejovic *et al.*, 1992; Whang-Peng *et al.*, 1984; Yonescu *et al.*, 1996). Early studies using a limited number of polymorphic RFLP markers have revealed loss of heterozygosity (LOH) at 3p21 and at 3p22-24 (Dodson *et al.*, 1993; Ehlen and Dubeau, 1990; Zheng *et al.*, 1991). On a limited number of ovarian tumors but using a large series of polymorphic microsatellite repeat markers an interstitial deletion was identified on chromosome 3p21 (Jones and Nakamura, 1992). At least one group observed that specimens exhibiting LOH distal to 3p24 correlated with the more aggressive disease (Ehlen and Dubeau, 1990; Zheng *et al.*, 1991).

Experiments involving monochromosomic hybrids indicate that chromosome 3p is sufficient for suppression of the tumorigenic phenotype in an ovarian cancer cell line (Rimessi *et al.*, 1994). Taken together, these results suggest that chromosome 3p plays an important role in OSE tumorigenesis and points to the presence of chromosome 3p tumor suppressors implicated in this disease.

We have previously described a primary cell culture model to study ovarian carcinogenesis (Lounis *et al.*, 1994). These cultured cells have been shown to reflect the characteristics of the original tumor cells from which they were derived and thus provide a useful resource to study the molecular events implicated in OSE cancers. Preliminary results demonstrated LOH of RFLP markers representative of chromosomal regions, 3p24 and 3p14, in primary cultures of malignant as well as borderline and benign OSE tumors (Lounis *et al.*, 1994). In contrast to previous reports, we conducted our analysis using a large number of polymorphic markers on an extensive repertoire of unselected epithelial ovarian tumors comprising 33 tumor biopsies and 47 primary cultures. Our study includes the analysis of chromosome 3p loci which have been shown to harbor known or suspected tumor suppressor genes: the von Hippel Lindau (*VHL*) gene (Crossey *et al.*, 1994) located at 3p25-26 (Latif *et al.*, 1993a), *RARB* (Sun and Kirkpatrick, 1996) located at 3p25 (Mattei *et al.*, 1991), *TGFBR2* (Sun *et al.*, 1994) (Wang *et al.*, 1995) assigned to 3p22 (Mathew *et al.*, 1994), and *PTPase γ* (LaForgia *et al.*, 1993) and *FHIT* (Ohta *et al.*, 1996) which both map to 3p14.2 (Wary *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1996). Here we report the use of epithelial ovarian primary cultures and fresh tumors biopsies to detect and map chromosome 3p deletions using RFLP and microsatellite repeat markers.

RESULTS

Chromosome 3p LOH analysis in ovarian tumors

We initiated our analysis of chromosome 3p using RFLP markers specific for *THRB* (3p24) and D3S30 (3p14) loci. Representative examples of PCR/RFLP analysis at these two loci are presented in Figure 1. The summary of this analysis is included in Figure 2. While deletions were observed at D3S30 (3p14) in benign, borderline and malignant samples, deletions at *THRB* locus were restricted to malignant ovarian tumors.

To determine the minimal regions of LOH we extended the LOH analysis by using 15 polymorphic microsatellite repeat markers representative of different loci on chromosome 3p (Figures 2 and 3). All 80 cases analyzed were informative for at least one marker and 25 (31%) displayed LOH of one or more of these markers. Figure 2 displays the frequency of LOH for each polymorphic marker. The frequencies of LOH ranged from 8% (for D3S1266) to 27% (for D3S30) when data was combined for all tumor samples (Figure 2). LOH was observed in samples representative of solid tumors and ovarian ascites (for example, 1304T and OV-55, respectively), primary cultures of ovarian tumors or ascites (for example, TOV-192 and OV-30, respectively) and a spontaneously immortalized cell line (OV-90) (Figure 3).

The pattern of allelic loss on chromosome 3p for each sample displaying LOH for at least one marker is schematically presented in Figure 3. Three tumors (OV-90, OV-55, 1304-T) displayed LOH of the majority of informative markers analyzed on chromosome 3p, suggesting complete loss of one chromosome 3p homologue. The remaining group of samples displayed a LOH pattern suggesting partial loss of one 3p homologue. Within this group of

samples, the pattern of loss enabled the determination of two distinct smallest regions of overlap of deletions on chromosome 3p (Figure 3). Region I is defined by the retention of D3S1270 and of D3S1597 but loss of D3S1620 located at 3p25-pter as observed in analysis of 1167T, for example (Figure 1). Region II is defined by the retention of markers D3S1293 and D3S1283 but loss of EABMD1/2 which represents the *THRβ* locus at 3p24, based on results from samples OV-29 and OV-30 (see Figure 1). The third region of deletion (Region III) is defined by retention of D3S1300 located within intron 5 of the *FHIT* gene and loss of the proximal marker D3S30 as observed in several samples including OV-36, 886T, 587T and BOV-38G (summarized in Figure 3; and see Figure 1). Additional markers will have to be used to define the proximal boundary.

LOH with respect to grade, stage and histopathological type

LOH was compared with histopathological subtype and grade of malignancy and the results are presented in Table 1 and Figure 3. Allelic loss was observed in 36% of malignant tumors, 17% of borderline tumors and 20% of benign OSE tumors giving an overall rate of LOH of 31%. Within the malignant tumors, chromosome 3p LOH was observed in 13 of 41 serous (32%) and 3 of 7 (43%) endometrioid subtypes. LOH was not restricted to these subtypes but was also observed in clear cell, mucinous, undifferentiated, and mixed tumors subtypes. The pattern of LOH displayed by all malignant subtypes overlapped the three regions of minimal loss. In addition 9 of 28 (32%) low grade tumors (grade I and grade II) and 12 of 30 (40%) high grade tumors (grade III) displayed LOH with chromosome 3p markers. No obvious correlation between tumors of grade II and III and the pattern of LOH on

chromosome 3p was evident. In particular, all three regions were deleted in a subset of these tumors, and tumors contained both extensive (involving the whole of the 3p arm) and more limited deletions. Tumors of grade I showed a more restricted pattern of deletions, with deletions being smaller and involving only Regions II and III. However, due to the limited number of samples studied (2) no conclusions can be drawn at this time. There were two subtypes of borderline tumors, serous and mucinous, and one of each subtype displayed LOH of a chromosome 3p marker. The pattern of LOH displayed by these two subtypes was identical in that loss was observed with marker D3S30 only. In benign tumors LOH was observed only in the serous subtype. Two of 6 benign tumors (33%) displayed loss of 3p markers and the LOH pattern overlapped regions lost in both malignant and borderline tumors (Region I and Region III).

LOH was also observed in tumors representative of different stages. Among the malignant specimens, LOH of at least one polymorphic chromosome 3p marker was observed in at least one tumor representative of all four stages: 2 of 5 stage I tumors (40%), 2 of 2 stage II tumors, 16 of 49 stage III tumors (33%) and 1 of 2 stage IV tumors. The two stage I tumors displayed loss in either Region I or Region I and III, while the two stage II tumors had loss of Region I or loss of all three regions. Higher stage tumors showed variable loss over all regions. There appeared to be no obvious correlation between the extent of chromosome 3p loss and the stage of the disease, although the limited number of samples of lower stages hinder this analysis. LOH of at least one chromosome 3p marker was also observed in borderline tumors representative of different stages: 1 of 7 stage I (14%) and 1 of 3 stage III tumors (33%).

DISCUSSION

We have previously described an *in vitro* model, based on primary ovarian cell cultures, in which to study the genetic events associated with ovarian epithelial tumors (Lounis *et al.*, 1994). LOH of chromosome 3p was observed in both fresh specimens and primary ovarian cultures derived from solid tumors and ascites suggesting that deletions were not due to culturing artifacts. Approximately 31% of tumors displayed LOH for at least one chromosome 3p polymorphic marker. However the highest frequency of LOH was displayed in malignant tumors (36%). The frequency of LOH we have observed is comparable to previous reports of LOH using a probe specific to the *THRB* locus (Dodson *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1991).

There remains some controversy as to whether deletions in chromosome 3p are associated with the aggressivity of the tumor. Previous reports have shown that chromosome 3p deletions were largely associated with the more advanced disease, as LOH was more frequently observed in high grade tumors (grade III) than low grade tumors (grade I-II) (Cheng *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1991). This is in contrast to another study (Dodson *et al.*, 1993) which described chromosome 3p deletions in low grade tumors. We have observed chromosome 3p loss in both low grade (9 of 28) and high grade (12 of 30) tumors, although the highest frequency of LOH was associated with the more aggressive disease. In our study we also addressed the role of chromosome 3p in borderline ovarian tumors. LOH of D3S30 marker located at 3p13-14 (Region III) was observed in 2 of 12 borderline samples while previous studies found no evidence of loss in borderline tumors (Cheng *et al.*, 1996; Dodson *et al.*, 1993). However LOH may have been missed in previous studies due to either the small number of samples

analyzed or because of the restricted focus of the markers used in LOH analysis.

The polymorphic markers used in this study were chosen based on three criteria. Markers were chosen to represent chromosome 3p regions previously described by others to be frequently deleted in cancer and loci containing known or suspected tumor suppressors. Additional markers were chosen ensuring representation of chromosome 3p arm in order to define all possible regions of loss. It is noteworthy that using 15 microsatellite chromosome 3p markers we did not see any evidence for microsatellite instability suggesting that mismatch repair genes play only a minor role in primary OSE cancers. Our results are consistent with those of others (Phillips *et al.*, 1996) and microsatellite instability in ovarian cancer has only been reported in ovarian cancer cell lines in the context of acquired resistance to cisplatin (Aebi *et al.*, 1996).

A total of 25 specimens displayed LOH of at least one marker on chromosome 3p. Three malignant tumors displayed LOH of the majority of markers suggesting loss of one homologue of chromosome 3p. The LOH analysis of one of these samples, OV-90 which is a spontaneously immortalized ovarian cell line, is consistent with karyotype analysis which revealed a complete loss of chromosome 3p homologue (Wang *et al.*, 1998). The pattern of deletion displayed by the samples using 15 microsatellite markers and two RFLP markers enabled the determination of two minimal regions of deletions on chromosome 3p (Figures 2 and 3). Our data also suggest that there is another region of deletion proximal to the *FHIT* locus, although the proximal boundary of Region III remains to be defined. These results suggest the presence of at least three genes that have a suppressive effect in ovarian tumorigenesis.

Few studies have identified specific chromosome 3p regions deleted in ovarian tumors. An interstitial deletion on chromosome 3p21 was reported in 1 of 4 ovarian tumor samples analyzed for LOH (Jones and Nakamura, 1992). This minimal region apparently falls outside the minimal regions defined by our study, although the genetic location of the polymorphic markers that were used in the study in relation to location of the markers used in the present study is not known. Using microcell mediated chromosome transfer into the HEY cell line, derived from a human papillary cystadenocarcinoma of the ovary (Buick *et al.*, 1985), hybrids containing chromosome 3p lost the transformed phenotype (Rimessi *et al.*, 1994). Reversion to the transformed phenotype in some of the chromosome 3 monochromosomal cell fusion hybrids was associated with LOH of specific chromosome 3p loci. Comparison of the regions of LOH in the interstitially deleted hybrid with results from this study indicate that at least one of the regions described by Rimessi *et al.* (1994) overlaps Region I defined in the present study.

The minimal regions of LOH excludes many of the known or suspected suppressor genes on chromosome 3p. Region I extends from D3S1270 to D3S1597 and thus excludes the locus for the *VHL* tumor suppressor gene which is commonly associated with renal carcinomas (Latif *et al.*, 1993b). This result is in accord with a recent study which suggested that *VHL* inactivation is not an important event in sporadic ovarian cancer (Nakashima *et al.*, 1996). Region II extends from D3S1283 to D3S1293. This region has been previously reported to be deleted in ovarian cancer (Zheng *et al.*, 1991) and includes the *RARB* locus. *RARB* has been shown to exert a suppressive effect in epidermoid lung cancer (Houle *et al.*, 1994). Experiments are in progress to address whether this gene acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. The *TGF β R2* gene assigned to 3p22 has recently been reported to harbor

mutations in colon cancers displaying errors in replication repair (RER⁺) (Parsons *et al.*, 1995). The potential role of TGF β R2 as a tumor suppressor is suggested by its ability to reduce the cloning efficiency in soft agar of transfectants of the MCF7 breast cancer cell line (Parsons *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1994). The pattern of loss displayed by our specimens excludes TGF β R2 as a candidate in ovarian tumorigenesis. Recently it has been suggested that the *FHIT* gene may act as a tumor suppressor in digestive tract and lung carcinogenesis (Ohta *et al.*, 1996). The involvement of this gene appears to be less important in the development of ovarian cancer (Hendricks *et al.*, 1997). Indeed, we have shown an identical pattern of *FHIT* expression in both normal and epithelial ovarian tumors suggesting that this gene does not play a significant role in ovarian tumorigenesis (Manning *et al.*, 1998). In addition, the *FHIT* gene is located outside of the proximal boundary defined in Region III. Similarly, the *PTPase γ* gene which has been associated with lung carcinogenesis (LaForgia *et al.*, 1991) falls outside minimal regions shown to be deleted in ovarian tumors.

Our findings suggest that more than one tumor suppressor gene important for ovarian tumorigenesis is located on chromosome 3p. Future studies will focus on fine mapping of chromosome 3p deletions in ovarian tumors and analysis of candidate genes located within the minimal region of LOH, such as *RARB*. In addition, the primary cultures and cell lines we have developed will allow us to address the importance of specific candidate genes which map to chromosome 3p in ovarian tumorigenesis.

MATERIAL AND METHODS

Clinical material

Tumor tissues and patient-matched normal tissue or peripheral blood samples were obtained at the time of surgery from patients at the CHUM-Campus Notre-Dame (designated by a letter code and a unique patient identifier) and the Montreal General Hospital, Montreal (assigned a unique patient number followed by the designation T). The tumors were histopathologically classified according to the criteria established by International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). Our collection of 80 specimens include: 58 malignant (39 solid tumors and 19 ascites), 12 borderline (10 solid tumors and 2 ascites) and 10 benign (9 solid tumors and 1 ascites) ovarian tumors. These samples were obtained from 71 patients that had not received pre-operative chemotherapy. Nine specimens were obtained from recurrent tumors in patients previously treated with platinum-based chemotherapy, only one of which (687T) displayed loss of chromosome 3p markers.

Cell culture

Primary cultures were established from benign (BOV) and malignant (TOV) tumors, and from the cellular fraction of malignant ascites fluid (OV) of ovarian origin. Ovarian primary cultures were derived as described previously (Lounis *et al.*, 1994) and were maintained in OSE media (Kruk *et al.*, 1990)

consisting of 50:50 medium 199:105 (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum containing 2.5 ug/ml fungizone and 50 ug/ml gentamycin.

DNA extraction

DNA was extracted from solid tumor tissues, cell cultures and normal tissues or lymphocytes obtained from peripheral blood according to the method described previously (Lounis *et al.*, 1994).

LOH analysis

Both PCR amplification of microsatellite repeat polymorphisms and RFLPs were used in LOH analysis. The PCR based RFLP assay for markers EABMD1/2, EABH1/2 and D3S30 has been described previously (Lounis *et al.*, 1994). Fifteen polymorphic microsatellite repeat markers (available through the Genome Data Base) were chosen for the analysis (Figure 2). PCR was performed in 25 μ l volume containing 100 ng of genomic DNA, 1 μ Ci of 35 S [dATP], 1x PCR buffer (Pharmacia), 200 mM each of dCTP, dGTP, and dTTP, 50 pmol of each primer and 1 unit of *Taq* polymerase (Pharmacia). The PCR conditions were: 94°C for 15 sec, 55°C for 15 sec and 72°C for 30 sec during 30 cycles. The reaction products were diluted 1:2 with stop buffer (90% formamide, 10 mM EDTA, 10% bromophenol blue, 10% xylene cyanol) and heated at 94°C for 10 min prior to loading on a 5% polyacrylamide denaturing gel. Gels were dried at 80°C and autoradiographed 1 to 3 days (Kodak XAR).

LOH was scored based on the absence or a difference in the relative intensity of alleles in tumor compared to normal DNA (allelic imbalance). All

samples positive for LOH at individual loci were analyzed at least twice in independent LOH assays.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Godbout, M.-J. Milot, L. Champoux, S. Yeung, and H. Gauthier for technical assistance. We are grateful to Drs. P. Drouin, P. Audet-Lapointe, J. Dubuc-Lissoir, P. Gauthier and L. Rinet for providing clinical specimens, Drs. A. Mehio, R. Vauclair and J. Gauthier for pathology and to N. Bélanger for clerical assistance with pathology reports. We also thank Dr R. Kothary for reading the manuscript and helpful discussions. This research was funded by an NCIC grant to P.N.T., A.-M.M.-M. and D.P. A.-M.M.-M. is the recipient of an FRSQ. senior fellowship. P.N.T. is an CRS-MRC scholar.

REFERENCES

- Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R.D., Boland, C.R., Koi, M., Fishel, R. and Howell, S.B. (1996). *Cancer Res.*, **56**, 3087-90.
- Buick, R.N., Pullano, R. and Trent, J.M. (1985). *Cancer Res.*, **45**, 3668-76.
- Cheng, P.C., Gosewehr, J.A., Kim, T.M., Velicescu, M., Wan, M., Zheng, J., Felix, J.C., Cofer, K.F., Luo, P., Biela, B.H., Godorov, G. and Dubeau, L. (1996). *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 510-8.
- Crossey, P.A., Richards, F.M., Foster, K., Green, J.S., Prowse, A., Latif, F., Lerman, M.I., Zbar, B., Affara, N.A., Ferguson-Smith, M.A. and et al. (1994). *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1303-8.
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. and Weissenbach, J. (1996). *Nature*, **380**, 152-4.
- Dodson, M.K., Hartmann, L.C., Cliby, W.A., DeLacey, K.A., Keeney, G.L., Ritland, S.R., Su, J.Q., Podratz, K.C. and Jenkins, R.B. (1993). *Cancer Res.*, **53**, 4456-60.
- Ehlen, T. and Dubeau, L. (1990). *Oncogene*, **5**, 219-23.
- Hendricks, D.T., Taylor, R., Reed, M. and Birrer, M.J. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 2112-5.
- Houle, B., Pelletier, M., Wu, J., Goodyer, C. and Bradley, W.E. (1994). *Cancer Res.*, **54**, 365-9.
- Jones, M.H. and Nakamura, Y. (1992). *Oncogene*, **7**, 1631-4.
- Kruk, P.A., Maines-Bandiera, S.L. and Auersperg, N. (1990). *Lab. Invest.*, **63**, 132-6.

- LaForgia, S., Lasota, J., Latif, F., Boghosian-Sell, L., Kastury, K., Ohta, M., Druck, T., Atchison, L., Cannizzaro, L.A., Barnea, G. and et al. (1993). *Cancer Res.*, **53**, 3118-24.
- LaForgia, S., Morse, B., Levy, J., Barnea, G., Cannizzaro, L.A., Li, F., Nowell, P.C., Boghosian-Sell, L., Glick, J., Weston, A. and et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 5036-40.
- Latif, F., Duh, F.M., Gnarra, J., Tory, K., Kuzmin, I., Yao, M., Stackhouse, T., Modi, W., Geil, L., Schmidt, L. and et al. (1993a). *Cancer Res.*, **53**, 861-7.
- Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L. and et al. (1993b). *Science*, **260**, 1317-20.
- Lounis, H., Provencher, D., Godbout, C., Fink, D., Milot, M.J. and Mes-Masson, A.M. (1994). *Exp. Cell Res.*, **215**, 303-9.
- Manning, A., Mes-Masson, A.-M., Tétrault, M., Provencher, D. and Tonin, P.N. (1998). *Gene Chromosome Cancer.*, Submitted.
- Mathew, S., Murty, V.V., Cheifetz, S., George, D., Massague, J. and Chaganti, R.S. (1994). *Genomics*, **20**, 114-5.
- Mattei, M.G., Riviere, M., Krust, A., Ingvarsson, S., Vennstrom, B., Islam, M.Q., Levan, G., Kautner, P., Zelent, A., Chambon, P. and et al. (1991). *Genomics*, **10**, 1061-9.
- Nakashima, R., Enomoto, T., Fujita, M., Yoshino, K., Wada, H., Kondo, K., Yao, M. and Murata, Y. (1996). *Oncol. Report.*, **3**, 887-890.
- Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M.G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T. and et al. (1996). *Cell*, **84**, 587-97.
- Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995). *Cancer Res.*, **55**, 5548-50.

- Pejovic, T., Heim, S., Mandahl, N., Baldetorp, B., Elmfors, B., Floderus, U.M., Furgyik, S., Helm, G., Himmelmann, A., Willen, H. and et al. (1992). *Gene Chrom. Cancer.*, **4**, 58-68.
- Phillips, N.J., Ziegler, M.R., Radford, D.M., Fair, K.L., Steinbrueck, T., Xynos, F.P. and Donis-Keller, H. (1996). *Cancer Res.*, **56**, 606-11.
- Rimessi, P., Gualandi, F., Morelli, C., TrabANELLI, C., Wu, Q., Possati, L., Montesi, M., Barrett, J.C. and Barbanti-Brodano, G. (1994). *Oncogene*, **9**, 3467-74.
- Schuler, G.D., Boguski, M.S., Hudson, T.J., Hui, L., Ma, J., Castle, A.B., Wu, X., Silva, J., Nusbaum, H.C., Birren, B.B., Slonim, D.K., Rozen, S., Stein, L.D., Page, D., Lander, E.S., Stewart, E.A., Aggarwal, A., Bajorek, E., Brady, S., Chu, S., Fang, N., Hadley, D., Harris, M., Hussain, S., Hudson, J.R., Jr. and et al. (1996a). *Science*, **274**, 547-62.
- Schuler, G.D., Boguski, M.S., Stewart, E.A., Stein, L.D., Gyapay, G., Rice, K., White, R.E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E., Bentolila, S., Birren, B.B., Butler, A., Castle, A.B., Chiannikulchai, N., Chu, A., Clee, C., Cowles, S., Day, P.J., Dibling, T., Drouot, N., Dunham, I., Duprat, S., East, C., Hudson, T.J. and et al. (1996b). *Science*, **274**, 540-6.
- Sun, H.S. and Kirkpatrick, B.W. (1996). *Mamm. Genome.*, **7**, 128-32.
- Sun, L., Wu, G., Willson, J.K., Zborowska, E., Yang, J., Rajkarunanayake, I., Wang, J., Gentry, L.E., Wang, X.F. and Brattain, M.G. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 26449-55.
- Wang, J., Sun, L., Myeroff, L., Wang, X., Gentry, L.E., Yang, J., Liang, J., Zborowska, E., Markowitz, S., Willson, J.K. and et al. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 22044-9.

- Wang, J.-C., Lagousakos, N., Bielansk, M.M., Mes-Masson, A.-M., Tonin, P., Provencher, D. and Eydoux, P. (1998). *Cancer Genet. Cytogenet.*, In preparation.
- Wary, K.K., Lou, Z., Buchberg, A.M., Siracusa, L.D., Druck, T., LaForgia, S. and Huebner, K. (1993). *Cancer Res.*, **53**, 1498-502.
- Whang-Peng, J., Knutsen, T., Douglass, E.C., Chu, E., Ozols, R.F., Hogan, W.M. and Young, R.C. (1984). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**, 91-106.
- Whitman, G., Nolan, T. and Gallup, D. *Normal ovarian development and function*. Raven Press Ltd, New York.
- Yonescu, R., Currie, J.L., Hedrick, L., Campbell, J. and Griffin, C.A. (1996). *Cancer Genet. Cytogenet.* **87**, 167-71.
- Zheng, J.P., Robinson, W.R., Ehlen, T., Yu, M.C. and Dubeau, L. (1991). *Cancer Res.*, **51**, 4045-51.

FIGURE LEGENDS:**Figure 1:**

LOH analysis of chromosome 3p in ovarian specimens. The loci tested are listed on the bottom of each panel. The DNA tested was derived from either matched normal blood designated by a simple letter (S or B) or tumor derived material (BOV, OV, TOV or T), including fresh tumor tissues and/or primary ovarian tumor cultures. The allele lengths obtained with the RFLP markers are indicated. For EABMD1/2 marker additional samples TOV-76 and OV-78 are included for comparison. For D3S1300, note that while SOV-36 was negative in the assay, OV-36 clearly displays two bands, which suggested retention of this marker (see for example allelic retention in BOV-38G). Samples are grouped according to pathology: benign (BOV-38G), borderline (OV-36) and malignant (1167T and OV-30).

Figure 2: Frequency of LOH of each polymorphic chromosome 3p marker in ovarian specimens. Genetic markers are listed in descending order from the 3pter to 3p14 according to previously published map (Dib *et al.*, 1996; Schuler *et al.*, 1996a; Schuler *et al.*, 1996b) and more recent website updates (www.ncbi.nih.gov/science96/). Approximate physical map of markers and genes on the chromosome 3p are also shown. The black bars and arrow on the left of markers indicate the three regions of deletion defined in this study (Region I, II and III from top to bottom).

Figure 3: LOH pattern for ovarian tumors displaying loss of chromosome 3p loci. The relative position of polymorphic markers used in this study are indicated at the top of the figure in order from the telomere (D3S1270) to centromere (D3S30). The *THRβ* locus analysis includes the combined results

of the RFLP markers EABMD1/2 and EABH1/2, and the microsatellite marker THR β 1/2. Samples are grouped according to pathology: malignant, borderline or benign. The histopathology and grade of each tumor is indicated, as well as the stage of the disease at the time of sampling. Samples with an asterisk were derived from primary cultured cells. The minimal regions of loss delimited in this study are represented at the bottom of the figure.

Table 1, Lounis et al.

Table 1: LOH and histopathology of ovarian specimens

Pathology	Histopathology	Total	Number LOH	Percent (%) deleted
Malignant	Serous	41	13	32
	Mucinous	1	1	100
	Endometrioid	7	3	43
	Clear cell	3	1	33
	Undifferentiated	2	1	50
	Mixed	4	2	50
	Total	58	21	36
Borderline	Serous	4	1	25
	Mucinous	8	1	13
	Total	12	2	17
Benign	Serous	6	2	33
	Endometrioid	1	0	0
	Cystadenofibroma	3	0	0
	Total	10	2	20
	Total (all tumors)	80	25	31

Figure 1, Lounis et al.

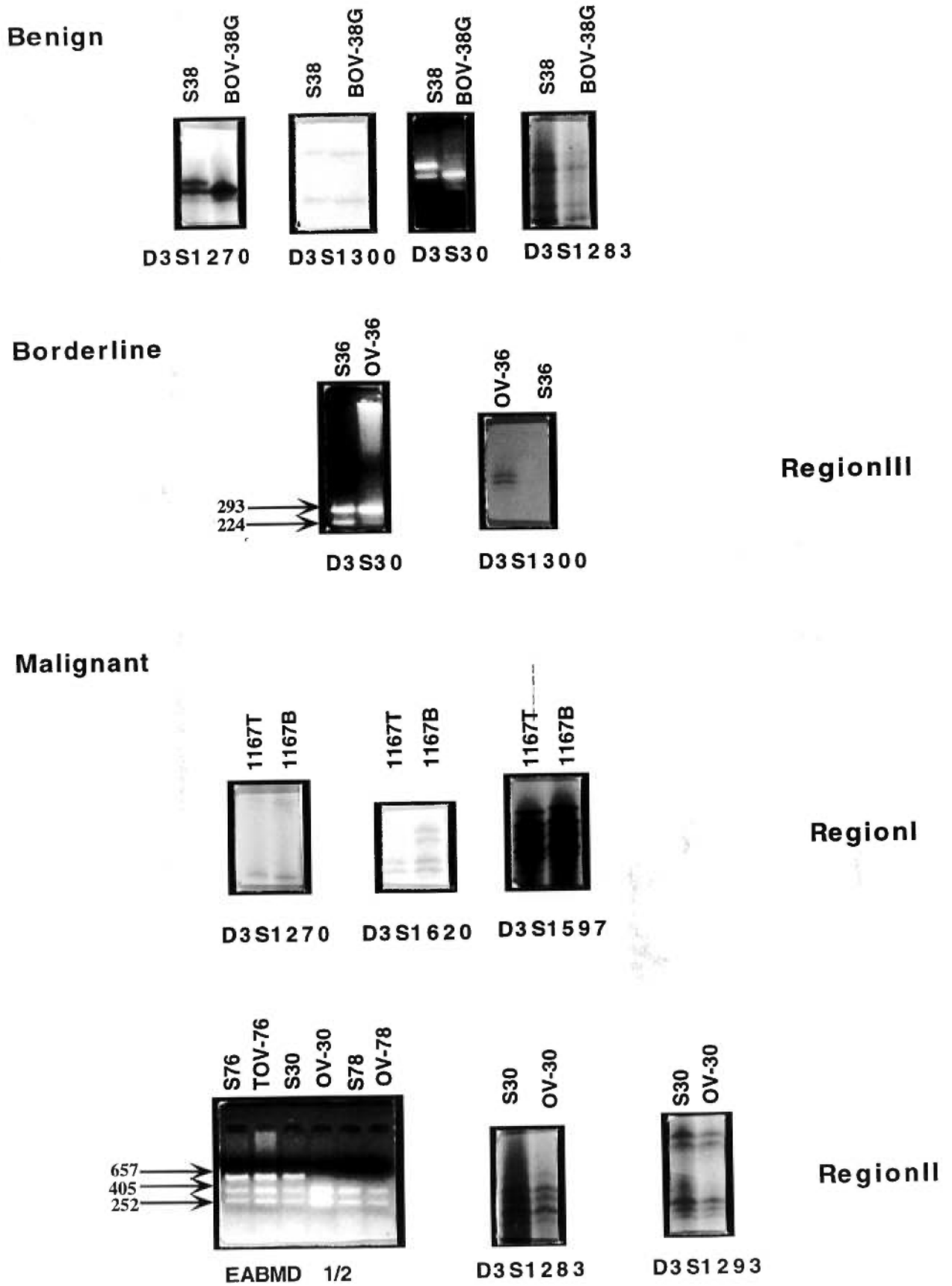
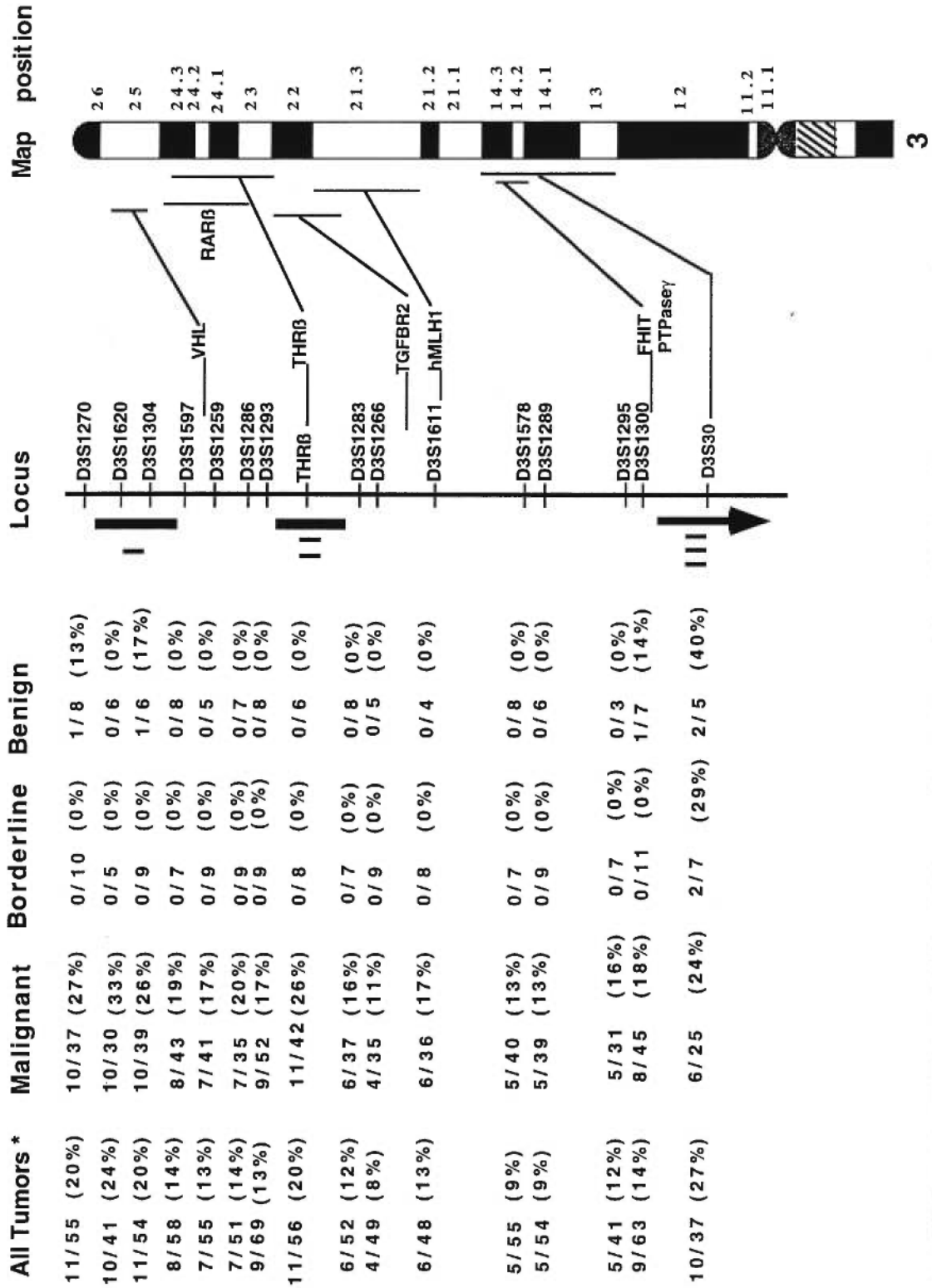


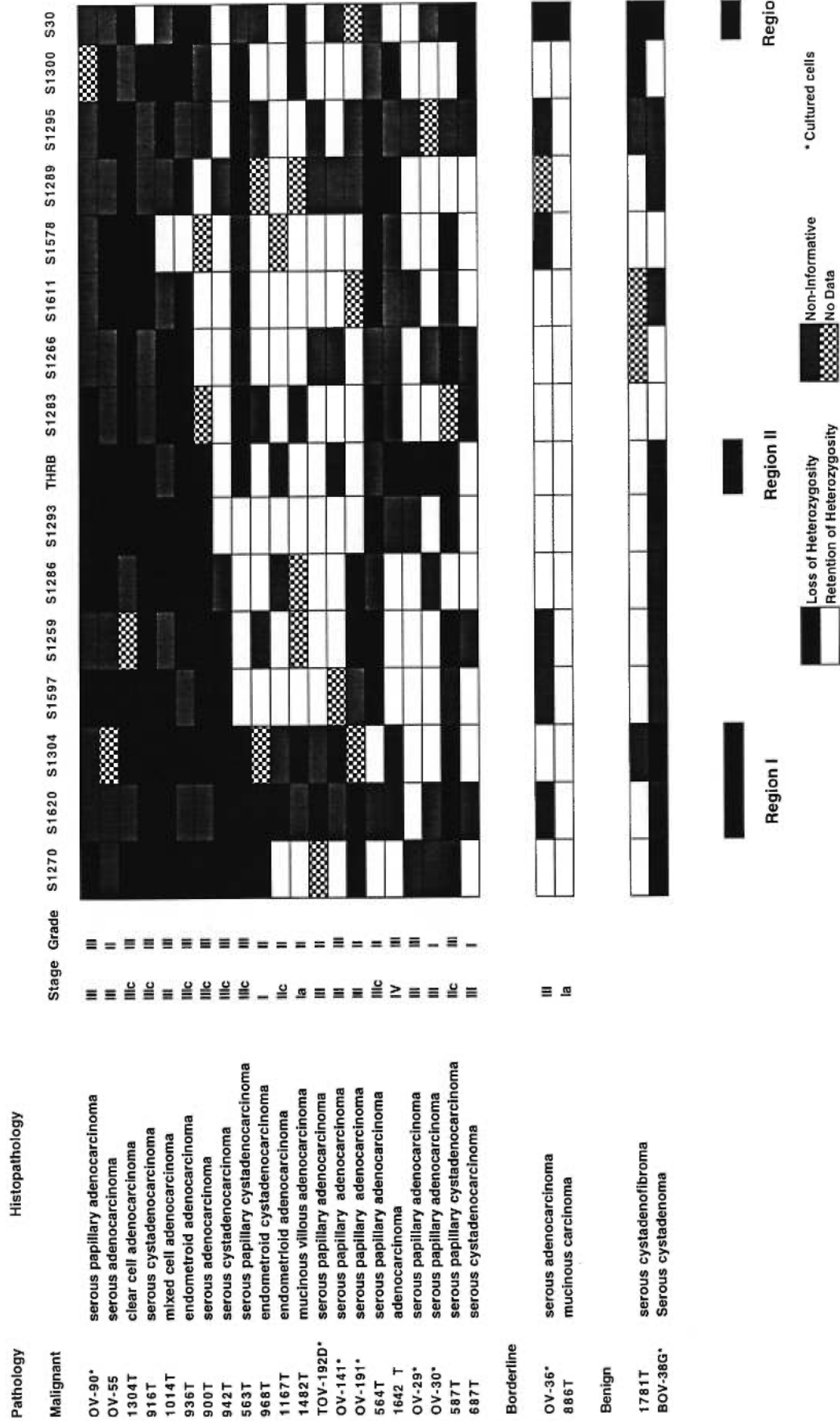
Figure 2, Lounis et al.

LOH Analysis of chromosome 3p loci in malignant, borderline and benign tumors



* Number of samples displaying LOH over the total number of informative samples tested

Figure 3, Lounis et al.



CHAPITRE V

Discussion

5.0 Discussion

Aujourd'hui, il est bien établi que le cancer résulte de l'accumulation d'une série d'altérations génétiques qui perturbent la croissance et la différenciation cellulaire. Ces modifications génétiques se produisent chez deux catégories de gènes cellulaires: les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. La définition de leur rôle respectif dans un cancer particulier permet de mieux comprendre l'évolution de la maladie. Le cancer épithélial de l'ovaire est très hétérogène ce qui est reflété par des tumeurs de différents stades, grades et sous-types histologiques. Malgré la disparité des études moléculaires, elles commencent à fournir des évidences sur l'implication de ces différents gènes dans le cancer épithélial de l'ovaire. Notre premier objectif est de développer un modèle pour adresser des questions de biologie moléculaire impliquées dans le cancer de l'ovaire chez la femme.

5.1 Culture des cellules primaires dérivées de biopsies ovariennes

Les techniques de culture cellulaire à partir de cancers humains se sont développées très rapidement (Hayflick, 1961). Les lignées cellulaires en culture se sont avérées très fiables dans les études des fonctions cellulaires des hormones et des facteurs de croissance ainsi que dans l'étude des différents aspects de biologie cellulaire et moléculaire. Des lignées cellulaires dérivées de différents types de tumeurs ont été utilisées pour étudier la progression et le traitement des cancers humains.

Bien qu'un certain nombre de lignées cellulaires de cancer épithélial de l'ovaire ont été décrites, la recherche de nouvelles modalités thérapeutiques,

incluant les différentes voies d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie et l'étude du rôle des hormones dans la biologie et le traitement du cancer de l'ovaire, a été limité en partie à cause de la non disponibilité de modèles expérimentaux de cette maladie. La majorité des lignées ovariennes décrites dans la littérature sont dérivées principalement à partir d'ascites ovariens (Alama et al., 1996; Bast et al., 1981; Buller et al., 1995; Hamilton et al., 1983; Hirte et al., 1994; Provencher et al., 1993). Les lignées dérivant de tumeurs solides se trouvent ainsi sous représentées (Crickard et al., 1989; Langdon et al., 1988; Rubin et al., 1993; Woods et al., 1979; Yuan et al., 1997). De plus, ces lignées ne représentent qu'un nombre restreint de types histologiques du cancer ovarien. D'autre part, la plupart de ces lignées proviennent de patientes ayant déjà subi des traitements de chimiothérapie qui peuvent influencer l'évolution de la maladie. Bien qu'abordée, la caractérisation de ces lignées reste toujours incomplète et fragmentée avec beaucoup de lignées ayant été décrites seulement une fois sans qu'il y ait de continuité ce qui met en doute leur immortalisation et leur utilisation comme modèle pour étudier la carcinogénèse ovarienne. D'autres groupes ont rapporté l'établissement de lignées cellulaires d'ovaire qu'ils considèrent immortelles après avoir atteint en moyenne 20 passages en culture (Yuan et al., 1997). Cependant, nous avons constaté que certaines cultures primaires peuvent atteindre 30 à 35 passages en culture et finir par mourir.

Dans notre projet, nous avons mis au point une méthode simple et rapide pour l'établissement de cultures primaires dérivées de l'ovaire normal, de tumeurs bénignes et malignes ainsi que d'ascites néoplasiques ovariens. Comme l'efficacité de dériver des lignées cellulaires humaines en culture est très faible, nous avons opté pour l'établissement d'un nombre important de

cultures primaires (300) qui va permettre de représenter les différentes étapes du cancer épithélial de l'ovaire. Ce modèle de culture comporte plusieurs avantages, dont la simplicité de la méthode de mise en culture des cellules, l'élimination du matériel nécrotique qui accompagne généralement le cancer de l'ovaire, la représentation des différents types histologiques et les différents stades de progression de la maladie et finalement la possibilité de corrélérer les données *in vitro* aux paramètres cliniques spécifiques à chaque patiente.

La possibilité de cultiver un grand nombre de cellules du cancer de l'ovaire dépourvues de contamination de cellules normales fournit un modèle potentiellement fiable pour étudier le cancer de l'ovaire. Des cultures primaires ont été dérivées dans 50% des échantillons cliniques obtenus et peuvent être maintenus en culture à des passages significatifs. Il est évident que nous n'avons pas obtenu des cultures primaires à partir de tous les échantillons reçus. Certaines cellules primaires n'ont jamais réussi à s'établir en culture. Cette capacité des cellules ovariennes de s'établir *in vitro* repose certainement sur plusieurs paramètres externes ou intrinsèques à la biopsie. Certains de ces paramètres sont reliés à l'environnement artificiel créé par les conditions de culture auxquelles doivent s'adapter les cellules épithéliales de l'ovaire une fois enlevées de leur milieu naturel. D'un autre côté, il est évident qu'en culture cellulaire, il se produit une sélection d'une population de cellules qui a la capacité de croître indéfiniment *in vitro* et que les cellules dépourvues de cette capacité finissent par mourir

Les cultures dérivées des différentes biopsies ovariennes de chaque catégorie qu'elles soient normales bénignes ou malignes, n'ont pas atteint le même nombre de passage en culture. Ce nombre est en moyenne de 12 pour

les cultures dérivées de tumeurs malignes solides, de 6 pour les cultures dérivées de tumeurs bénignes, et d'environ 8 passages pour les cultures dérivées d'ascite ou de biopsie normales de l'ovaire. Dans une portion de cultures primaires, les cellules ont atteint un nombre de passages significatifs de 20 à 35 avant de rentrer en crise. Par contre quatre cultures ont donné lieu à des lignées cellulaires spontanément immortalisées en culture. L'émergence de ces quatre lignées cellulaires dans une période fixe de 12 mois parmi des centaines de cultures primaires collectées sur une période de 5 ans nous amène à penser aux conditions de culture utilisées pendant cette période. Une explication possible serait l'utilisation d'un lot de sérum particulier aurait pu favoriser le développement de ces lignées.

Ces cultures cellulaires primaires ont été caractérisées par des critères d'évaluation incluant l'aspect morphologique, immunologique et moléculaire. Ces critères ont démontré que ces cellules sont en majorité représentatives du matériel clinique du départ. Les analyses moléculaires de perte d'hétérozygotie et des mutations de *P53* dans ces cultures primaires comparées aux tumeurs d'origine semblent démontrer qu'elles sont représentatives des tumeurs dont elles dérivent. Ces cultures primaires constituent donc un matériel de base intéressant surtout pour mener des analyses d'expression de gènes d'intérêt. Ce type d'analyse s'avère très difficile à interpréter lorsqu'on utilise des tissus tumoraux frais car la contamination de ce matériel avec des cellules normales est beaucoup plus accentuée. Il sera donc plus aisé de comparer des profils d'expression entre différentes cultures primaires. Bien que la culture primaire reste un système expérimental indispensable, il est essentiel de considérer qu'elle ne fournit qu'une approximation *in vitro* de l'environnement *in vivo*. Il devient donc

primordial de rester alerte aux artefacts de cultures cellulaires et de comparer les résultats *in vitro* aux résultats *in vivo*. Dans le but de contourner ce problème, nous avons toujours gardé une partie de la tumeur fraîche congelée pour pouvoir constituer un ressource dans laquelle nous pouvons comparer les résultats.

5.2 Établissement et caractérisation de lignées cellulaires dérivées de tumeurs épithéliales de l'ovaire

Parallèlement à l'établissement de ces cultures primaires, quatre lignées cellulaires de cancer épithélial de l'ovaire, se sont immortalisées spontanément en culture. Ces lignées ont été dérivées de tumeurs solides de différents types histologiques du cancer épithélial de l'ovaire dans trois cas (TOV-81D, TOV-21G, TOV-112D) et d'ascite ovarien dans un cas (OV-90). Contrairement à ce qu'on voit généralement dans la littérature, les patientes dont dérivent ces lignées n'ont pas reçu de traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie pouvant influencer la composition moléculaire des spécimens. De plus, les analyses moléculaires effectuées sur nos lignées cellulaires et les tumeurs fraîches correspondantes soutiennent le concept que les cellules en culture sont représentatives des cellules cancéreuses de la tumeur d'origine. Par exemple, lors des analyses de SSCP de l'exon 5 du gène *P53* dans une culture de passage précoce (P2), nous avons observé un profil qui comprenait le profil de type mutant et en même temps le profil de type sauvage qui représente une contamination de cellules normales. Lors des passages ultérieurs (P8), la culture primaire ainsi que les lignées cellulaires immortalisées spontanément révèlent exclusivement le profil mutant (Lounis et al., 1994).

Les caractéristiques de croissance *in vitro* de ces lignées cellulaires semblent épouser les paramètres cliniques des patientes dont elles dérivent. Par exemple, la patiente 81 semble avoir un bon pronostic en clinique; elle est encore en vie après 8 ans, bien que diagnostiquée avec un stade avancé de la maladie. La lignée cellulaire TOV-81D révèle une morphologie cellulaire très proche de celle qu'on voit dans les cellules épithéliales normales de l'ovaire, n'est pas capable de faire des colonies en agarose mou ou de former des tumeurs lorsque injectée dans des souris *nu*. En revanche, la patiente 112 a démontré une maladie très agressive en clinique et la lignée cellulaire TOV-112D est la plus rapide en croissance en culture, forme des colonies en agar mou et produit rapidement (2 semaines) des tumeurs lorsque injectée dans des souris *nu*.

Les différentes caractéristiques moléculaires de ces lignées cellulaires d'ovaire en font un modèle très intéressant pour soulever plusieurs questions dans la compréhension du cancer épithélial de l'ovaire. En particulier, les lignées OV-90 et TOV-112D possèdent des mutations dans le gène *P53*. De plus toutes ces lignées ont été dérivées de patientes n'ayant pas reçu de traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie et par conséquent les effets secondaires ou l'acquisition de résistance aux agents chimiothérapeutiques existants se trouvent évités. La lignée TOV-81D dérive d'une patiente avec une histoire familiale de cancer sein/ovaire qui peut donc être utilisée pour étudier le cancer de l'ovaire dans le contexte familial. La lignée TOV-112D dérive d'une jeune patiente (42 ans) avec un cancer épithélial de l'ovaire de type endométrioïde et porte un LOH dans la région *BRCA1*. Bien que l'histoire familiale de cette patiente n'est pas disponible, ces critères semblent répondre

à un cas familial qui peut être confirmé par l'identification de mutations dans l'allèle restant de *BRCA1* qui est sous analyse actuellement. Des analyses cytogénétiques ont également été effectuées sur ces différentes lignées pour compléter leur caractérisation. Les trois lignées TOV-81D, OV-90 et TOV-112D, démontrent un karyotype complexe alors que le karyotype de la lignée TOV-21G est beaucoup plus simple (trisomie 10), ce qui en fait probablement une lignée intéressante pour identifier des gènes clés impliqués dans le développement du cancer de l'ovaire.

Le développement et la dissémination du cancer épithélial sporadique de l'ovaire se retrouvent particulièrement au niveau de la cavité péritonéale. Contrairement aux modèles décrits auparavant où les tumeurs restent limitées et encapsulées (Sharkey et al., 1985), nous avons remarqué, après l'injection des cellules de ces lignées dans des souris *nu*, la présence d'implants péritonéaux et la formation d'ascite, dans quelques cas. Ceci est très similaire à la progression clinique de la maladie humaine qui se répand dans la cavité abdominale avec dans un tiers des cas le développement d'ascite. Les quatre lignées cellulaires isolées constituent une source très importante pour l'étude du cancer épithélial de l'ovaire chez la femme et entre autre, ces différentes lignées peuvent être utilisées pour effectuer des analyses comparatives d'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale. Elles peuvent faire l'objet d'étude d'expression différentielle ce qui constitue un projet déjà amorcé dans le laboratoire en utilisant les techniques de "differential display" (Liang et al., 1992) et de "chip" (Chee et al., 1996). Ces applications vont permettre d'identifier des gènes dont l'expression est très différente entre la culture normale et les lignées cellulaires malignes agressives. Finalement ces lignées cellulaires constituent une ressource importante pour tester différents

gènes candidats, susceptibles de jouer un rôle dans la carcinogénèse ovarienne.

5.3 Cartographie des délétions au niveau du bras court du chromosome 3 dans des tumeurs épithéliales de l'ovaire chez la femme

En utilisant notre modèle, nous nous sommes intéressées à définir les régions de délétions spécifiques au cancer épithélial sporadique de l'ovaire. Nous avons utilisé à cette fin 80 échantillons qui comprennent 33 biopsies de tumeurs et 47 cultures primaires analysées à l'aide de marqueurs polymorphiques situés à 16 locus différents sur le bras court du chromosome 3. Les marqueurs polymorphiques utilisés dans cette étude ont été choisis selon 3 critères. Ces marqueurs représentent soit des régions de délétion du chromosome 3 qui ont déjà été décrites comme étant fréquemment délétées dans le cancer, des loci contenant des gènes suppresseurs connus ou candidats. D'autres marqueurs ont également été choisis pour couvrir la plus grande partie du bras court du chromosome 3 afin de définir toute région de délétion sur le chromosome 3p. Sur 80 échantillons analysés, 25 (31%) démontrent un LOH pour au moins un marqueur étudié. Cette fréquence de LOH se voit augmentée et atteint 36% dans les tumeurs malignes. Ceci est très comparable aux fréquences rencontrées dans les analyses de LOH du cancer de l'ovaire par d'autres groupes (Dodson et al., 1993; Zheng et al., 1991).

Dans les études précédentes, il semble y avoir une controverse quant à l'association des délétions du bras court du chromosome 3 à l'agressivité des tumeurs. Ces études ont associé les délétions au niveau du bras court du

chromosome 3 à des stades avancés de la maladie puisque la plupart ont été identifiées dans des tumeurs de grade III (Cheng et al., 1996; Zheng et al., 1991). Par contre, dans une autre analyse on a rapporté des délétions dans des grades I et II (Dodson et al., 1993). Dans notre étude, bien que les délétions au niveau du chromosome 3p ont été observées à haute fréquence dans les tumeurs les plus agressives, nous avons aussi observé des délétions dans les tumeurs moins agressives.

Malgré l'utilisation de 15 marqueurs microsatellites de type (CA)_n répétés, nous n'avons pas observé d'instabilité de microsatellites dans les différents échantillons analysés. Ceci est en accord avec des études précédentes qui ont démontré une très faible fréquence d'instabilité microsatellites dans des tumeurs épithéliales de l'ovaire (Phillips et al., 1996). Cet événement semble être plus particulièrement associé à des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire ayant développé une résistance au cisplatine qui résulte en une perte de réparation de l'ADN (Aebi et al., 1996). Ces résultats semblent indiquer que l'instabilité microsatellite jouerait un rôle mineur dans la carcinogenèse ovarienne.

Le profil de délétions révélé par ces différents échantillons a permis d'identifier et de définir deux régions de délétion minimale sur le bras court du chromosome 3. La région I et la région II délimitées par les marqueurs D3S1270 à D3S1597 et par D3S1293 à D3S1283 respectivement. Nos données suggèrent également la présence d'une autre région de délétion minimale proximal au gène *FHIT* nommée région III mais dont les limites restent encore à identifier de façon précise. Ces résultats suggèrent la

présence sur le chromosome 3p d'au moins trois gènes important à effet suppresseur dans la carcinogenèse ovarienne.

Peu d'études ont identifié des régions de délétion spécifiques sur le bras court du chromosome 3 dans le cancer épithélial de l'ovaire. Une délétion interstitielle a été rapportée en 3p21 parmi quatre échantillons étudiés (Jones and Nakamura, 1992). Cette région semble être à l'extérieur des régions délimitées par notre étude bien qu'il est difficile de comparer la localisation des marqueurs utilisés par rapport à ceux utilisés dans notre étude. D'autre part, le transfert du chromosome 3 dans une lignée de cancer de l'ovaire (HEY) dérivée d'un cystadénocarcinome de l'ovaire (Buick et al., 1985) a démontré que les hybrides contenant le bras court du chromosome 3 perdent le phénotype transformé et que la réversion du phénotype transformé dans certains clones hybrides est associée avec des LOH à des loci spécifiques du chromosome 3p (Rimessi et al., 1994). La comparaison des résultats de cette étude avec les nôtres démontre qu'au moins une région de délétion chevauche la région I définie dans notre étude.

Les régions de délétions minimales définies dans cette étude excluent plusieurs gènes suppresseurs connus ou candidats situés sur le chromosome 3p. La région I s'étend du marqueur D3S1270 à D3S1597 et ainsi exclue le gène *VHL* généralement associé au cancer du rein (Latif et al., 1993). Ce résultat est en accord avec des données récentes qui suggèrent que l'inactivation du gène *VHL* n'est pas un événement important dans le cancer épithélial de l'ovaire (Foster et al., 1995; Nakashima et al., 1996). La région II s'étend du marqueurs D3S1283 à D3S1293. Cette région a déjà été rapportée comme délétée dans le cancer de l'ovaire (Ehlen and Dubeau, 1990; Zheng et

al., 1991). Elle renferme entre autres le gène du récepteur de l'acide rétinoïque $\beta 2$ qui a démontré un effet suppresseur de tumeurs dans les lignées cellulaires de cancer de poumon de type épidermoïdes (Houle et al., 1993). Le rôle du gène *RARB2* dans le cancer épithélial de l'ovaire commence à être étudié dans notre laboratoire. Des analyses d'expression préliminaires de ce gène par RT-PCR ont démontré une perte d'expression de ce gène dans la lignée TOV-21G. Des expériences de transfection du gène *RARB2* dans cette lignée sont en cours pour définir son rôle dans la croissance cellulaire *in vitro*. Des essais de tumorigénicité dans des souris *nu* sont envisagées pour déterminer le rôle de *RARB2* dans le cancer de l'ovaire dans le modèle *in vivo*. Le gène *THR3* se situe également dans la région II. Cependant ce gène d'une part n'a jamais été associé au cancer en général et d'autre part les analyses d'expression dans plusieurs cultures de l'ovaire ont démontré un niveau d'expression identique aussi bien dans les échantillons normaux que dans les échantillons bénins et malins.

Le gène *TGFBR2* situé en 3p22 qui a été étudié intensément dans le cancer du colon possède des mutations dans les lignées cellulaires du cancer de colon ayant le phénotype RER⁺ (Markowitz et al., 1995). Le potentiel suppresseur de tumeur de ce gène a été démontré par la réduction de formation de colonies en agar mou avec la lignée cellulaire de cancer du sein MCF7 (Sun et al., 1994). Le profil de délétions affiché par nos différents spécimens semble exclure le TGFBR2 comme gène suppresseur de tumeur dans la carcinogenèse ovarienne. Le gène *FHIT* suggéré jouant un rôle de gène suppresseur dans le cancer du poumon et le cancer de l'estomac (Ohta et al., 1996), semble être beaucoup moins impliqué dans le développement du cancer de l'ovaire (Hendricks et al., 1997). Dans une analyse des niveaux

d'expression de ce gène, notre laboratoire a montré des niveaux d'expression identiques dans les ovaires normaux et les tumeurs d'ovaires (Manning et al., 1998). De plus, le gène *FHIT* est situé à l'extérieur des limites de la région III suggérant que ce gène ne joue pas un rôle significatif dans la carcinogenèse ovarienne. De la même façon, le gène *PTPasey* impliqué dans le cancer du poumon (LaForgia et al., 1991) est exclu des régions de délétions minimales définies dans notre étude. Nos résultats suggèrent donc que plusieurs autres gènes suppresseurs importants dans le développement du cancer de l'ovaire sont situés sur le bras court du chromosome 3.

5.4 L'analyse des délétions du chromosome 3 dans les tumeurs d'ovaire de faible potentiel de malignité

Au cours de notre étude, nous avons également soulevé la question sur les pertes d'hétérozygotie au niveau du bras court du chromosome 3 dans les tumeurs de l'ovaire de faible potentiel de malignité. L'existence de ce type de tumeurs est connu depuis longtemps et elles ont été décrites comme étant une variante du cancer épithéliale de l'ovaire chez des patientes avec un meilleur pronostic, malgré la présence d'implants métastatiques au niveau péritonéale (Taylor, 1929). L'histologie de ces tumeurs semble être intermédiaire entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes, et donc ont été nommées initialement semi-malignes, puis borderline ou de faible potentiel de malignité. Ces tumeurs sont généralement moins agressives que les tumeurs malignes, cependant quelques unes peuvent progresser et devenir malignes. Il existe peu de données soutenant le concept stipulant que les tumeurs borderlines constituent des précurseurs de tumeurs malignes, quoique les analyses en microscopie photonique et électronique ont décelé

que l'apparence des noyaux des tumeurs borderlines semblent être intermédiaire entre ceux des tumeurs bénignes et malignes (Komitowski et al., 1989). Les régions d'organisation nucléaire (NOR) peuvent être quantifiées et suggèrent une continuité de stade bénin à borderline et par la suite à malin basé sur l'augmentation de ces NORs avec la progression de la lésion (Khattech et al., 1992). Cependant, on voit très rarement un changement de diagnostic établi au début comme borderline à un cancer invasif à la rechute. De plus, les tumeurs borderlines diffèrent des tumeurs malignes à différents niveaux du point de vue moléculaire. Par exemple les mutations dans le gène *P53* sont très fréquentes dans les cancers invasifs de l'ovaire alors qu'elles sont absentes dans les tumeurs borderlines et extrêmement rare, même à des stades très avancés de la maladie (Eccles et al., 1992; Kohler et al., 1993; Marks et al., 1991). Inversement l'incidence des mutations dans le gène *Ki-ras* est beaucoup plus élevée dans les tumeurs borderlines (20 % à 50%) que dans le cancer épithélial de l'ovaire (Mok et al., 1993; Teneriello et al., 1993). La biologie des tumeurs borderlines de l'ovaire reste jusqu'à maintenant très peu claire et les analyses moléculaires de ces tumeurs vont peut être clarifier cette situation en identifiant les événements moléculaires qui vont différencier la classe des tumeurs borderlines qui progressent et donnent lieu à des tumeurs invasives.

Dans notre étude, nous avons observé que les tumeurs de type borderline présentent des LOH à une fréquence de 17% au niveau du bras court du chromosome 3, alors que les études précédentes n'ont pas détecté de délétions dans ce type de tumeurs (Cheng et al., 1996; Dodson et al., 1993). Cependant, ceci peut être dû soit à un nombre restreint d'échantillons utilisés dans ces études ou soit à une concentration étroite des marqueurs

utilisés à des régions spécifiques. De plus, ces LOH semblent survenir seulement avec les marqueurs polymorphiques situés dans la région III (3p12-14) qui chevauche les régions délétées dans les tumeurs bénignes et malignes mais distincte des régions I et II (3p21-pter) délétées seulement dans les tumeurs bénignes et malignes. Ces résultats semblent indiquer d'une part qu'il existe au moins un gène suppresseur impliqué dans la tumorigenèse bénigne, borderline et maligne de l'ovaire et, d'autre part que certains loci du chromosome 3p ne sont pas impliqués dans la tumorigenèse borderline. Ces résultats suggèrent également que les délétions au niveau du 3p sont des événements très précoces dans la maladie puisqu'on les détecte également à un taux de 20% dans les tumeurs bénignes.

5.5 Conclusion et perspectives

L'étude de la biologie du cancer épithélial de l'ovaire s'est souvent heurtée à une disponibilité très limitée de lignées cellulaires humaines représentatives de la complexité de l'histologie du cancer épithélial de l'ovaire. Nous avons mis au point des conditions de culture pour établir des cultures primaires à partir d'ovaires normaux ainsi qu'à partir de différents types de tumeurs épithéliales de l'ovaire humain. Nous avons également établi quatre lignées cellulaires indépendantes spontanément immortalisées *in vitro* à partir de patientes n'ayant pas reçu de traitements de chimiothérapie. Ces lignées sont dérivées de tumeurs solides ou d'ascite ovarien et représentent différents types histologiques du cancer épithélial de l'ovaire. Nous avons réalisé une caractérisation extensive de ces lignées qui comprend: 1) l'analyse de karyotype, 2) analyse de mutations en *P53*, 3) détermination des caractéristiques de croissance en culture cellulaire tels que le temps de

dédoublé, la croissance en agarose mou et les tests de tumorigenicité en souris *nu*. De plus, la lignée TOV-81D dérive d'une patiente ayant une mutation dans le gène *BRCA2*, alors que la lignée OV-90 démontre la perte du bras court du chromosome 3 aussi bien par les analyses de LOH que par les analyses de karyotype. Les caractéristiques de croissance *in vitro* de ces lignées semblent épouser les paramètres cliniques ce qui en fait un modèle alternatif pour soulever des questions cruciales sur les événements moléculaires impliqués dans le cancer épithélial de l'ovaire chez la femme.

Nous avons commencé notre projet sur le chromosome 3 en définissant le profil des délétions en utilisant l'approche du PCR combiné aux marqueurs polymorphiques RFLP ou microsatellites. La fréquence de perte d'hétérozygotie au niveau de 80 échantillons comprenant 33 biopsies et 47 cultures cellulaires épithéliales d'ovaires a été analysée. Nous avons détecté des délétions dans 28 spécimens (31%) de tumeurs ou cultures cellulaires pour au moins un marqueur sur le bras court du chromosome 3. Le profil de délétions affiché par ces 28 échantillons a permis la détermination d'au moins 3 régions de délétions minimales sur le 3p. Contrairement à ce qui a été rapporté auparavant, les délétions au niveau du 3p ne sont pas restreintes aux grades et stades avancés de la maladie, mais ont été observées dans les tumeurs bénignes (20%) et les tumeurs de faible potentiel de malignité (17%). Cette étude représente une première analyse détaillée sur les délétions au niveau du 3p dans le cancer épithélial de l'ovaire.

Les délétions interstitielles déterminées par notre analyse ont donné lieu à la définition d'au moins trois régions de délétions minimales sur le bras court du chromosome 3. La région I située en 3p25-ter renferme des LOH de

tumeurs malignes et bénignes suggérant qu'un gène suppresseur à ce niveau soit impliqué dans un événement précoce dans la tumorigenèse ovarienne. Le gène *VHL* semble être exclu de la région I confirmant les résultats publiés par d'autres groupes sur l'implication de ce gène dans la maladie de l'ovaire (Foster et al., 1995; Nakashima et al., 1996). L'étape suivante consiste à définir cette région de façon plus précise en élargissant l'analyse pour inclure de nouveaux échantillons de tumeurs et des marqueurs polymorphiques supplémentaires. La région III déterminée lors de notre analyse a besoin d'être plus définie quant aux limites de délétions de cette région. Par contre, les gènes codant pour les *PTPasesy* et *FHIT* semblent situés à l'extérieur des frontières de cette région. D'autre part les tumeurs de faible potentiel de malignité semblent démontrer des LOH exclusivement dans cette région suggérant qu'elle englobe un marqueur génétique qui serait peut être déterminant dans ce type de tumeur.

La région II telle que présentée dans le chapitre III inclut les gènes *THRβ* et *RARB*. Cette région a été délimitée par la suite avec des marqueurs supplémentaires à une taille de 1.8cM au niveau de 3p24 entre les marqueurs D3S700 et D3S1567. Cette région peut être plus raccourcie en utilisant des échantillons supplémentaires de notre banque de tumeurs et des marqueurs polymorphiques additionnels. Nous pouvons donc générer une carte physique en utilisant des YAC (yeast artificial chromosome) ou des BAC (bacterial artificial chromosome) de cette région. D'un autre coté, plusieurs ESTs (expressed sequence tags) et deux gènes candidats ne sont pas exclus de cette région. Une étude par gène candidat localisé dans cet intervalle peut être entamée en utilisant des ESTs localisés dans cet intervalle. Ces séquences représentent des portions de séquences génomiques exprimées ou traduites

qui ont été cartographiées à des régions spécifiques du génome. Un grand nombre de ESTs est maintenant disponible dans les bases de données. On peut donc commencer avec ceux qui se localisent dans la région d'intérêt et réaliser des analyses d'expression avec différentes lignées cellulaires tumorales ou normales de l'ovaire pour déterminer une absence ou surexpression dans le matériel tumoral versus le normal. Dans le cas où le gène est inconnu nous pouvons procéder à son clonage en criblant une banque d'ADNc. Il est intéressant de noter qu'on peut également étudier les niveaux d'expression des gènes candidats existants ainsi que ceux qui vont se manifester par la suite comme étant prometteurs dans notre large répertoire d'échantillons.

La collection d'un répertoire important d'échantillons de tumeurs épithéliales de l'ovaire et l'établissement d'un modèle *in vitro* basé sur la dérivation de cultures primaires et parfois de lignées cellulaires constitue une source puissante pour étudier les événements génétiques et épigénétiques impliqués dans la carcinogenèse ovarienne. L'intérêt porté au chromosome 3 dans la recherche sur le cancer en général et la détermination des régions de délétions minimales spécifiques au cancer épithélial de l'ovaire va nous permettre d'identifier le(s) gène(s) suppresseur(s) de tumeurs impliqué(s) dans la maladie de l'ovaire. D'autre part, nous pouvons établir le rôle de ces gènes dans la carcinogenèse de l'ovaire étant donné la banque importante d'échantillons que nous possédons pour caractériser différents gènes candidats. Ceci va nous permettre de générer un modèle de tumeur de l'ovaire où nous pourrons assigner différentes altérations génétiques à différents stades de la progression tumorale du cancer épithélial de l'ovaire chez la femme.

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRES I ET V

Adami, H. O., Hsieh, C. C., Lambe, M., Trichopoulos, D., Leon, D., Persson, I., Ekblom, A., and Janson, P. O. (1994). Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. *Lancet* *344*, 1250-4.

Adams, A. T., and Auersperg, N. (1985). A cell line, ROSE 199, derived from normal rat ovarian surface epithelium. *Exp. Cell Biol.* *53*, 181-8.

Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R., and Howell, S. B. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* *56*, 3087-90.

Ah-See, K. W., Cooke, T. G., Pickford, I. R., Soutar, D., and Balmain, A. (1994). An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res.* *54*, 1617-21.

Alama, A., Barbieri, F., Favre, A., Cagnoli, M., Noviello, E., Pedulla, F., Viale, M., Foglia, G., and Ragni, N. (1996). Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol. Oncol.* *62*, 82-8.

Ali, I. U., Lidereau, R., and Callahan, R. (1989). Presence of two members of c-erbA receptor gene family (c-erbA beta and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Institute* *81*, 1815-20.

Anglard, P., Trahan, E., Liu, S., Latif, F., Merino, M. J., Lerman, M. I., Zbar, B., and Linehan, W. M. (1992). Molecular and cellular characterization of human renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.* *52*, 348-56.

Bast, R. C., Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L. M., Colvin, R. B., and Knapp, R. C. (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* *68*, 1331-7.

Bello, M. J., and Rey, J. A. (1990). Chromosome aberrations in metastatic ovarian cancer: relationship with abnormalities in primary tumors. *Int. J. Cancer* *45*, 50-4.

Berard, J., Gaboury, L., Landers, M., De Repentigny, Y., Houle, B., Kothary, R., and Bradley, W. E. (1994). Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR beta 4-like transgene. *EMBO J.* *13*, 5570-80.

Berchuck, A., Elbendary, A., Havrilesky, L., Rodriguez, G. C., and Bast, R. C., Jr. (1994). Pathogenesis of ovarian cancers. *J. Soc. Gynecol. Invest.* *1*, 181-90.

Berchuck, A., Kohler, M. F., Hopkins, M. P., Humphrey, P. A., Robboy, S. J., Rodriguez, G. C., Soper, J. T., Clarke-Pearson, D. L., and Bast, R. C. (1994). Overexpression of *P53* is not a feature of benign and early-stage borderline epithelial ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* *52*, 232-6.

Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* *64*, 235-48.

Boldog, F. L., Gemmill, R. M., Wilke, C. M., Glover, T. W., Nilsson, A. S., Chandrasekharappa, S. C., Brown, R. S., Li, F. P., and Drabkin, H. A. (1993). Positional cloning of the hereditary renal carcinoma 3;8 chromosome translocation breakpoint. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 8509-13.

Boldog, F. L., Waggoner, B., Glover, T. W., Chumakov, I., Le Paslier, D., Cohen, D., Gemmill, R. M., and Drabkin, H. A. (1994). Integrated YAC contig containing the 3p14.2 hereditary renal carcinoma 3;8 translocation breakpoint and the fragile site FRA3B. *Genes Chromosomes Cancer* 11, 216-21.

Boles, T. C., and Hogan, M. E. (1987). DNA structure equilibria in the human *c-myc* gene. *Biochemistry* 26, 367-76.

Booth, M., Beral, V., and Smith, P. (1989). Risk factors for ovarian cancer: a case-control study. *Brit. J. Cancer* 60, 592-8.

Bos, J. L. (1989). *ras* oncogenes in human cancer: *Cancer Res.* 49, 4682-9.

Brinton, L. H., R. (1992). *Epidemiology of gynecologic cancers*, W. Hoskins, C. Perez and R. Young. Edition (Lippincott, Philadelphia).

Buick, R. N., Pullano, R., and Trent, J. M. (1985). Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 45, 3668-76.

Buller, R. E., Niemann, T., Connor, J. P., Squatrito, R. C., Skilling, J. S., and Anderson, B. (1995). Isolation and preliminary characterization of an ovarian

carcinoma cell line from a patient with familial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 56, 39-44.

Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., and White, R. L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779-84.

Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X. C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D. J., Morris, M. S., and Fodor, S. P. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-4.

Chen, F., Kishida, T., Yao, M., Hustad, T., Glavac, D., Dean, M., Gnarr, J. R., Orcutt, M. L., Duh, F. M., Glenn, G., and et al. (1995). Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum. Mutat.* 5, 66-75.

Chen, L. C., Matsumura, K., Deng, G., Kurisu, W., Ljung, B. M., Lerman, M. I., Waldman, F. M., and Smith, H. S. (1994). Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers. *Cancer Res.* 54, 3021-4.

Chen, Y., Wu, P. C., Lang, J. H., Ge, W. J., Hartge, P., and Brinton, L. A. (1992). Risk factors for epithelial ovarian cancer in Beijing, China. *Int. J. Epidemiol.* 21, 23-9.

Cheng, P. C., Gosewehr, J. A., Kim, T. M., Velicescu, M., Wan, M., Zheng, J., Felix, J. C., Cofer, K. F., Luo, P., Biela, B. H., Godorov, G., and Dubeau, L.

(1996). Potential role of the inactivated X chromosome in ovarian epithelial tumor development [see comments]. *J.Natl. Cancer Institute* *88*, 510-8.

Chung, G. T., Huang, D. P., Lo, K. W., Chan, M. K., and Wong, F. W. (1992). Genetic lesion in the carcinogenesis of cervical cancer. *Anticancer Res.* *12*, 1485-90.

Chung, G. T., Sundaresan, V., Hasleton, P., Rudd, R., Taylor, R., and Rabbitts, P. H. (1995). Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. *Oncogene* *11*, 2591-8.

Cohen, A. J., Li, F. P., Berg, S., Marchetto, D. J., Tsai, S., Jacobs, S. C., and Brown, R. S. (1979). Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *New Engl. J. Med.* *301*, 592-5.

Cramer, D. W. (1990). Epidemiologic aspects of early menopause and ovarian cancer. *Ann. New York Acad. Sci.* *592*, 363-75.

Crickard, K., Niedbala, M. J., Crickard, U., Yoonessi, M., Sandberg, A. A., Okuyama, K., Bernacki, R. J., and Satchidanand, S. K. (1989). Characterization of human ovarian and endometrial carcinoma cell lines established on extracellular matrix. *Gynecol. Oncol.* *32*, 163-73.

Crossey, P. A., Foster, K., Richards, F. M., Phipps, M. E., Latif, F., Tory, K., Jones, M. H., Bentley, E., Kumar, R., Lerman, M. I., and et al. (1994). Molecular genetic investigations of the mechanism of tumourigenesis in von

Hippel-Lindau disease: analysis of allele loss in *VHL* tumours. *Hum. Genet.* 93, 53-8.

Crossey, P. A., Richards, F. M., Foster, K., Green, J. S., Prowse, A., Latif, F., Lerman, M. I., Zbar, B., Affara, N. A., Ferguson-Smith, M. A., and et al. (1994). Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1303-8.

Dauplat, J., Guastalla, J-P., (1996). *Cancer de l'Ovaire*. Edition Arnette Blackwell. Paris

De Vita, V. J. H., S. Rosenberg, S. (1993). *Principles practice of oncology, Cancer*, ed.

Demoly, P., Pujol, J. L., Godard, P., and Michel, F. B. (1994). Oncogenes and anti-oncogenes in lung cancer. *Presse Medicale* 23, 291-7.

Devilee, P., van den Broek, M., Kuipers-Dijkshoorn, N., Kolluri, R., Khan, P. M., Pearson, P. L., and Cornelisse, C. J. (1989). At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* 5, 554-60.

Devilee, P., van den Broek, M., Mannens, M., Slater, R., Cornelisse, C. J., Westerveld, A., and Khan, P. M. (1991). Differences in patterns of allelic loss between two common types of adult cancer, breast and colon carcinoma, and Wilms' tumor of childhood. *Int. J. Cancer* 47, 817-21.

DiSaia, P. J., Morrow, M., Kanabus, J., Piechal, W., and Townsend, D. E. (1975). Two new tissue culture lines from ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 3, 215-9.

Dodson, M. K., Hartmann, L. C., Cliby, W. A., DeLacey, K. A., Keeney, G. L., Ritland, S. R., Su, J. Q., Podratz, K. C., and Jenkins, R. B. (1993). Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 53, 4456-60.

Eccles, D. M., Brett, L., Lessells, A., Gruber, L., Lane, D., Steel, C. M., and Leonard, R. C. (1992). Overexpression of the *P53* protein and allele loss at 17p13 in ovarian carcinoma. *Brit. J. Cancer* 65, 40-4.

Ehlen, T., and Dubeau, L. (1990). Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *Oncogene* 5, 219-23.

Engle, A., Muscat, J. E., and Harris, R. E. (1991). Nutritional risk factors and ovarian cancer. *Nut. Cancer* 15, 239-47.

Fathalla, M. F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2, 163.

Feng, L., Miyake, M., Seeger, R. C., and Bogenmann, E. (1997). Wild-type DNA sequence of the *N-myc* transactivation domain in human neuroblastoma. *Int. J. Cancer* 71, 1116-7.

Fogh, J., and Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines, J. Fogh, ed. (New York: Plenum Press).

Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A., and Goldgar, D. E. (1994). Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 343, 692-5.

Foster, K., Crossey, P. A., Cairns, P., Hetherington, J. W., Richards, F. M., Jones, M. H., Bentley, E., Affara, N. A., Ferguson-Smith, M. A., and Maher, E. R. (1994). Molecular genetic investigation of sporadic renal cell carcinoma: analysis of allele loss on chromosomes 3p, 5q, 11p, 17 and 22. *Brit. J. Cancer* 69, 230-4.

Foster, K., Osborne, R. J., Huddart, R. A., Affara, N. A., Ferguson-Smith, M. A., and Maher, E. R. (1995). Molecular genetic analysis of the von Hippel-Lindau disease (*VHL*) tumour suppressor gene in gonadal tumours. *Eur. J. Cancer* 31A, 2392-5.

Foster, K. A., Harrington, P., Kerr, J., Russell, P., Dicioccio, R. A., Scott, I. V., Jacobs, I., Chenevixtrench, G., Ponder, B. A. J., and Gayther, S. A. (1996). Somatic and Germline Mutations Of the *BRCA2* Gene In Sporadic Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 56, 3622-3625.

Foulkes, W. D., Black, D. M., Stamp, G. W., Solomon, E., and Trowsdale, J. (1993). Very frequent loss of heterozygosity throughout chromosome 17 in sporadic ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 54, 220-5.

Fournier, R. E., and Ruddle, F. H. (1977). Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. *Proc. Natl. Sci. U S A.* 74, 319-23.

Franceschi, S., Parazzini, F., Negri, E., Booth, M., La Vecchia, C., Beral, V., Tzonou, A., and Trichopoulos, D. (1991). Pooled analysis of 3 European case-control studies of epithelial ovarian cancer: III. Oral contraceptive use. *Int. J. Cancer* 49, 61-5.

Futreal, P. A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L. M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y., and et al. (1994). *BRCA1* mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266, 120-2.

Fynan, T. M., and Reiss, M. (1993). Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncogenesis* 4, 493-540.

Gallion, H. H., Pieretti, M., DePriest, P. D., and van Nagell, J. R., Jr. (1995). The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer* 76, 1992-7.

Garte, S. J. (1993). The *c-myc* oncogene in tumor progression. *Crit. Rev. Oncogenesis* 4, 435-49.

Gayther, S. A., and Ponder, B. A. (1997). Mutations of the *BRCA1* and *BRCA2* genes and the possibilities for predictive testing. *Mol. Med. Today* 3, 168-74.

Gazdar, A. F., Bader, S., Hung, J., Kishimoto, Y., Sekido, Y., Sugio, K., Virmani, A., Fleming, J., Carbone, D. P., and Minna, J. D. (1994). Molecular genetic changes found in human lung cancer and its precursor lesions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 59, 565-72.

Gazzeri, S., Brambilla, E., Jacrot, M., Chauvin, C., Benabid, A. L., and Brambilla, C. (1991). Activation of *myc* gene family in human lung carcinomas and during heterotransplantation into nude mice. *Cancer Res.* 51, 2566-71.

Gebert, J. F., Moghal, N., Frangioni, J. V., Sugarbaker, D. J., and Neel, B. G. (1991). High frequency of retinoic acid receptor beta abnormalities in human lung cancer. *Oncogene* 6, 1859-68

Glover, T. W., and Stein, C. K. (1988). Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 265-73.

Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M., and et al. (1994). Mutations of the *VHL* tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* 7, 85-90.

Goff, B. A., Shy, K., Greer, B. E., Muntz, H. G., Skelly, M., and Gown, A. M. (1996). Overexpression and relationships of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, *P53*, Ki-67, and tumor necrosis factor alpha in epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 17, 487-92.

Golombick, T., and Bezwoda, W. R. (1991). In vitro maintenance of a new ovarian cancer cell line in protein-free media: a potential model for autonomous growth and tumor progression. *Eur. J. Cell Biol.* 56, 459-63.

Golombick, T., Dansey, R., Bezwoda, W. R., and Rosendorff, J. (1990). Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cell lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth characteristics, biochemical, and cytogenetic studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 447-54.

Grunt, T. W., Oeller, H., Somay, C., and Dittrich, C. (1993). Different propensity for spontaneous differentiation of cell clones isolated from the human ovarian surface epithelial cell line HOC-7. *Differentiation* 53, 45-50.

Gwinn, M. L., Lee, N. C., Rhodes, P. H., Layde, P. M., and Rubin, G. L. (1990). Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Epidemiol.* 43, 559-68.

Hall, K. L., Dewar, M. A., and Perchalski, J. (1992). Screening for gynecologic cancer. Vulvar, vaginal, endometrial, and ovarian neoplasms. *Primary Care Clinics in Office Practice* 19, 607-20.

Hamilton, T. C., Young, R. C., Louie, K. G., Behrens, B. C., McKoy, W. M., Grotzinger, K. R., and Ozols, R. F. (1984). Characterization of a xenograft model of human ovarian carcinoma which produces ascites and intraabdominal carcinomatosis in mice. *Cancer Res.* 44, 5286-90.

Hamilton, T. C., Young, R. C., McKoy, W. M., Grotzinger, K. R., Green, J. A., Chu, E. W., Whang-Peng, J., Rogan, A. M., Green, W. R., and Ozols, R. F. (1983). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* 43, 5379-89.

Hankinson, S. E., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Spencer, T. L., Rosner, B., and Stampfer, M. J. (1992). A quantitative assessment of oral contraceptive use and risk of ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 80, 708-14.

Hankinson, S. E., Manson, J. E., London, S. J., Willett, W. C., and Speizer, F. E. (1994). Laboratory reproducibility of endogenous hormone levels in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol. Biomar. Prev.* 3, 51-6.

Harris, R., Whittemore, A. S., and Itnyre, J. (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol.* 136, 1204-11.

Hartge, P., Schiffman, M. H., Hoover, R., McGowan, L., Leshner, L., and Norris, H. J. (1989). A case-control study of epithelial ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161, 10-6.

Hayflick, L. a. M., P.S (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.

Hendricks, D. T., Taylor, R., Reed, M., and Birrer, M. J. (1997). *FHIT* gene expression in human ovarian, endometrial, and cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 57, 2112-5.

Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M., and et al. (1994). Silencing of the *VHL* tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl .Acad. Sci. U S A.* 91, 9700-4.

Hibi, K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Takagi, H., Nakamura, Y., and Takahashi, T. (1992). Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 7, 445-9.

Hirte, H. W., Kaiser, J. S., and Bacchetti, S. (1994). Establishment and characterization of four human epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Cancer* 74, 900-6.

Hoffman, A. D., Engelstein, D., Bogenrieder, T., Papandreou, C. N., Steckelman, E., Dave, A., Motzer, R. J., Dmitrovsky, E., Albino, A. P., and Nanus, D. M. (1996). Expression Of Retinoic Acid Receptor Beta In Human Renal Cell Carcinomas Correlates With Sensitivity to the Antiproliferative Effects Of 13-Cis-Retinoic Acid. *Clin. Cancer Res.* 2, 1077-1082.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). *P53* mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

Hosking, L., Trowsdale, J., Nicolai, H., Solomon, E., Foulkes, W., Stamp, G., Signer, E., and Jeffreys, A. (1995). A somatic *BRCA1* mutation in an ovarian tumour. *Nat. Genet.* 9, 343-4.

Houle, B., Leduc, F., and Bradley, W. E. (1991). Implication of RARB in epidermoid (Squamous) lung cancer. *Gene Chromosome Cancer* 3, 358-66.

Houle, B., Rochette-Egly, C., and Bradley, W. E. (1993). Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 985-9.

Houlston, R., Bourne, T. H., Davies, A., Whitehead, M. I., Campbell, S., Collins, W. P., and Slack, J. (1992). Use of family history in a screening clinic for familial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 47, 247-52.

Huber, H., Knogler, W., Karlic, H., Akrad, M., Soregi, G., and Schweizer, D. (1990). Structural chromosomal abnormalities in gynecologic malignancies. *Cancer Genet. Cytogenet.* 50, 189-97.

Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W. G., Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* 1, 822-6.

Ishwad, C. S., Ferrell, R. E., Rossie, K. N., Appel, B. N., Johnson, J. T., Myers, E. N., Law, J. C., Srivastava, S., and Gollin, S. M. (1996). Loss of heterozygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. *Int. J. Cancer* 69, 1-4.

Jacobs, I. J., Kohler, M. F., Wiseman, R. W., Marks, J. R., Whitaker, R., Kerns, B. A., Humphrey, P., Berchuck, A., Ponder, B. A., and Bast, R. C., Jr. (1992). Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, *P53* mutation, and X-chromosome inactivation. *J. Natl. Cancer Institute* *84*, 1793-8.

Jing, Y., Zhang, J., Bleiweiss, I. J., Waxman, S., Zelent, A., and Mira, Y. L. R. (1996). Defective expression of cellular retinol binding protein type I and retinoic acid receptors alpha2, beta2, and gamma2 in human breast cancer cells. *FASEB J.* *10*, 1064-70.

Jones, M. H., and Nakamura, Y. (1992). Deletion mapping of chromosome 3p in female genital tract malignancies using microsatellite polymorphisms. *Oncogene* *7*, 1631-4.

Kaplan, R., Morse, B., Huebner, K., Croce, C., Howk, R., Ravera, M., Ricca, G., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *87*, 0027-8424.

Khattech, A., Spatz, A., Prade, M., Duvillard, P., Charpentier, P., Bognel, C., Michel, G., and Lhomme, C. (1992). Nucleolar organizer regions in ovarian tumors: discrimination between carcinoma and borderline tumor. *Int. J. Gynecol. Pathol.* *11*, 11-4.

Kiechle-Schwarz, M., Bauknecht, T., Wienker, T., Walz, L., and Pfeleiderer, A. (1993). Loss of constitutional heterozygosity on chromosome 11p in human ovarian cancer. Positive correlation with grade of differentiation. *Cancer* 72, 2423-32.

Kim, T. M., Benedict, W. F., Xu, H. J., Hu, S. X., Gosewehr, J., Velicescu, M., Yin, E., Zheng, J., D'Ablaing, G., and Dubeau, L. (1994). Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive subtypes of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression. *Cancer Res.* 54, 605-9.

King, C. R., Kraus, M. H., and Aaronson, S. A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229, 974-6.

Kloss, K., Wahrisch, P., Greger, V., Messmer, E., Fritze, H., Hopping, W., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1991). Characterization of deletions at the retinoblastoma locus in patients with bilateral retinoblastoma *Am. J. Med. Genet.* 39, 196-200.

Kohler, M. F., Kerns, B. J., Humphrey, P. A., Marks, J. R., Bast, R. C., Jr., and Berchuck, A. (1993). Mutation and overexpression of *P53* in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 81, 643-50.

Kohler, M. F., Marks, J. R., Wiseman, R. W., Jacobs, I. J., Davidoff, A. M., Clarke-Pearson, D. L., Soper, J. T., Bast, R. C., Jr., and Berchuck, A. (1993). Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the *P53* gene in ovarian cancer. *J Natl Cancer Institute* 85, 1513-9.

Komitowski, D., Janson, C., Szamaborski, J., and Czernobilsky, B. (1989). Quantitative nuclear morphology in the diagnosis of ovarian tumors of low malignant potential (borderline). *Cancer* 64, 905-10.

Kovacs, G., and Frisch, S. (1989). Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 49, 651-9.

Kraus, M. H., Popescu, N. C., Amsbaugh, S. C., and King, C. R. (1987). Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene *erbB-2* in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J.* 6, 605-10.

Kruk, P. A., Maines-Bandiera, S. L., and Auersperg, N. (1990). A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab. Invest.* 63, 132-6.

La Vecchia, C., Decarli, A., Negri, E., Parazzini, F., Gentile, A., Cecchetti, G., Fasoli, M., and Franceschi, S. (1987). Dietary factors and the risk of epithelial ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Institute* 79, 663-9.

LaForgia, S., Morse, B., Levy, J., Barnea, G., Cannizzaro, L. A., Li, F., Nowell, P. C., Boghosian-Sell, L., Glick, J., Weston, A., and et al. (1991). Receptor protein-tyrosine phosphatase gamma is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 5036-40.

Lane, D. P. (1992). *Cancer. P53, guardian of the genome.* *Nature* 358, 15-6.

Langdon, S. P., Lawrie, S. S., Hay, F. G., Hawkes, M. M., McDonald, A., Hayward, I. P., Schol, D. J., Hilgers, J., Leonard, R. C., and Smyth, J. F. (1988). Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 48, 6166-72.

Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., and et al. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260, 1317-20.

Le Beau, M. M., Drabkin, H., Glover, T. W., Gemmill, R., Rassool, F. V., McKeithan, T. W., and Smith, D. I. (1998). An *FHIT* tumor suppressor gene?. [Review] [59 refs]. *Genes Chromosomes Cancer* 21, 281-9.

Levine, A. J., Perry, M. E., Chang, A., Silver, A., Dittmer, D., Wu, M., and Welsh, D. (1994). The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the *P53* tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Brit. J.Cancer* 69, 409-16.

Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R., and Pardee, A. B. (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 52, 6966-8.

Liede, A., Tonin, P. N., Sun, C. C., Serruya, C., Baly, M. B., Narod, S. A., and Foulkes, W. D. (1998). Is hereditary site-specific ovarian cancer a distinct genetic conditions? *Am. J. Med. Genet.* *In press.*

Lounis, H., Mes-Masson, A.-M., Dion, F., Bradley, W. E., Seymour, R. J., Provencher, D., and Tonin, P. (1998). Mapping of chromosome 3p deletions in human epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 17, 2359-2365.

Lounis, H., Provencher, D., Godbout, C., Fink, D., Milot, M. J., and Mes-Masson, A. M. (1994). Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp. Cell Res.* 215, 303-9.

Lowry, S., Russell, H., Hickey, I., and Atkinson, R. (1991). Incessant ovulation and ovarian cancer. *Lancet* 337, 1544-5.

Lu, S. L., Akiyama, Y., Nagasaki, H., Saitoh, K., and Yuasa, Y. (1995). Mutations of the transforming growth factor-beta type II receptor gene and genomic instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 216, 452-7.

Lubinski, J., Hadaczek, P., Podolski, J., Toloczko, A., Sikorski, A., McCue, P., Druck, T., and Huebner, K. (1994). Common regions of deletion in chromosome regions 3p12 and 3p14.2 in primary clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 54, 3710-3.

Lynch, H. T., Lanspa, S., Smyrk, T., Boman, B., Watson, P., and Lynch, J. (1991). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet. Cytogenet* 53, 143-60.

Maestro, R., Gasparotto, D., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulfaro, S., and Boiocchi, M. (1993). Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res.* 53, 5775-9.

Maher, E. R., Bentley, E., Yates, J. R., Latif, F., Lerman, M., Zbar, B., Affara, N. A., and Ferguson-Smith, M. A. (1991). Mapping of the von Hippel-Lindau disease locus to a small region of chromosome 3p by genetic linkage analysis. *Genomics* 10, 957-60.

Maher, E. R., Yates, J. R., Harries, R., Benjamin, C., Harris, R., Moore, A. T., and Ferguson-Smith, M. A. (1990). Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Quart. J. Med.* 77, 1151-63.

Manning, A., Mes-Masson, A.-M., Tétrault, M., Provencher, D., and Tonin, P. N. (1998). Expression of *FHIT* in human epithelial ovarian tumors. *Mol. Carcinogenesis*. Sous presse

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and et al. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336-8.

Marks, J. R., Davidoff, A. M., Kerns, B. J., Humphrey, P. A., Pence, J. C., Dodge, R. K., Clarke-Pearson, D. L., Iglehart, J. D., Bast, R. C., Jr., and Berchuck, A. (1991). Overexpression and mutation of *P53* in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 51, 2979-84.

Mathew, S., Murty, V. V., Cheifetz, S., George, D., Massague, J., and Chaganti, R. S. (1994). Transforming growth factor receptor gene *TGFBR2* maps to human chromosome band 3p22. *Genomics* 20, 114-5.

Mazars, R., Pujol, P., Maudelonde, T., Jeanteur, P., and Theillet, C. (1991). *P53* mutations in ovarian cancer: a late event? *Oncogene* 6, 1685-90.

Meden, H., and Kuhn, W. (1997). Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. [Review] [36 refs]. *European Journal of Obstetrics, Gynecol. Rep. Biol.* 71, 173-9.

Meden, H., Marx, D., Schauer, A., Wuttke, W., and Kuhn, W. (1997). Prognostic significance of p105 (c-erbB-2 HER2/neu) serum levels in patients with ovarian cancer. *Anticancer Res.* 17, 757-60.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 266, 66-71.

Mitra, A. B., Murty, V. V., Li, R. G., Pratap, M., Luthra, U. K., and Chaganti, R. S. (1994). Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res.* 54, 4481-7.

Mok, S. C., Bell, D. A., Knapp, R. C., Fishbaugh, P. M., Welch, W. R., Muto, M. G., Berkowitz, R. S., and Tsao, S. W. (1993). Mutation of *K-ras* protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res.* 53, 1489-92.

Mok, S. C., Wong, K. K., Chan, R. K., Lau, C. C., Tsao, S. W., Knapp, R. C., and Berkowitz, R. S. (1994). Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 52, 247-52.

Mori, M., Harabuchi, I., Miyake, H., Casagrande, J. T., Henderson, B. E., and Ross, R. K. (1988). Reproductive, genetic, and dietary risk factors for ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.* 128, 771-7.

Mori, N., Yokota, J., Akiyama, T., Sameshima, Y., Okamoto, A., Mizoguchi, H., Toyoshima, K., Sugimura, T., and Terada, M. (1990). Variable mutations of the *RB* gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 5, 1713-7.

Mori, T., Yanagisawa, A., Kato, Y., Miura, K., Nishihira, T., Mori, S., and Nakamura, Y. (1994). Accumulation of genetic alterations during esophageal carcinogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1969-71.

Morrow, C., and Townsend, D. (1987). *Syn. Gynecolol. Oncolo.* E. Wiley Medical, ed.

Myeroff, L. L., Parsons, R., Kim, S. J., Hedrick, L., Cho, K. R., Orth, K., Mathis, M., Kinzler, K. W., Lutterbaugh, J., Park, K., and et al. (1995). A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 55, 5545-7.

Nakashima, R., Enomoto, T., Fujita, M., Yoshino, K., Wada, H., Kondo, K., Yao, M., and Murata, Y. (1996). The Von-Hippel-Lindau (Vhl) Tumor Suppressor Gene Is Not Mutated In Sporadic Ovarian Carcinomas. *Oncol. Reports* 3, 887-890.

Narod, S. A., Feunteun, J., Lynch, H. T., Watson, P., Conway, T., Lynch, J., and Lenoir, G. M. (1991). Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 338, 82-3.

Nawroz, H., van der Riet, P., Hruban, R. H., Koch, W., Ruppert, J. M., and Sidransky, D. (1994). Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 54, 1152-5.

Negri, E., Franceschi, S., Tzonou, A., Booth, M., La Vecchia, C., Parazzini, F., Beral, V., Boyle, P., and Trichopoulos, D. (1991). Pooled analysis of 3 European case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int. J.Cancer* 49, 50-6.

Nervi, C., Vollberg, T. M., George, M. D., Zelent, A., Chambon, P., and Jetten, A. M. (1991). Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 195, 163-70.

Nicosia, S. V., Johnson, J. H., and Streibel, E. J. (1984). Isolation and ultrastructure of rabbit ovarian mesothelium (surface epithelium). *Int. J. Gynecol. Pathol.* 3, 348-60.

Ogasawara, S., Maesawa, C., Tamura, G., and Satodate, R. (1995). Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* *55*, 891-4.

Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M. G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., and et al. (1996). The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* *84*, 587-97.

Okamoto, A., Sameshima, Y., Yokoyama, S., Terashima, Y., Sugimura, T., Terada, M., and Yokota, J. (1991). Frequent allelic losses and mutations of the *P53* gene in human ovarian cancer. *Cancer Res.* *51*, 5171-6.

Ozols, R.F., Rbin, S.C., Dembo, A.J., and Robboy, S. (1992). *Epithelial Ovarian Cancer. principle and practice of Gynecol Oncol. Edition* (Lippincott, Philadelphia)

Parazzini, F., Negri, E., La Vecchia, C., Restelli, C., and Franceschi, S. (1992). Family history of reproductive cancers and ovarian cancer risk: an Italian case-control study. *Am. J. Epidemiol.* *135*, 35-40.

Park, K., Kim, S. J., Bang, Y. J., Park, J. G., Kim, N. K., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. (1994). Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *91*, 8772-6.

Parsons, R., Myeroff, L. L., Liu, B., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* *55*, 5548-50.

Partridge, M., Emilion, G., and Langdon, J. D. (1996). LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Brit. J. Cancer* *73*, 366-71.

Pathak, S., Strong, L. C., Ferrell, R. E., and Trindade, A. (1982). Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells. *Science* *217*, 939-41.

Pejovic, T., Heim, S., Mandahl, N., Baldetorp, B., Elmfors, B., Floderus, U. M., Furgyik, S., Helm, G., Himmelmann, A., Willen, H., and et al. (1992). Chromosome aberrations in 35 primary ovarian carcinomas. *Gene Chromosome Cancer* *4*, 58-68.

Phillips, N. J., Ziegler, M. R., Radford, D. M., Fair, K. L., Steinbrueck, T., Xynos, F. P., and Donis-Keller, H. (1996). Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer. *Cancer Res.* *56*, 606-11.

Polychronopoulou, A., Tzonou, A., Hsieh, C. C., Kaprinis, G., Rebelakos, A., Toupadaki, N., and Trichopoulos, D. (1993). Reproductive variables, tobacco, ethanol, coffee and somatometry as risk factors for ovarian cancer. *Int. J. Cancer* *55*, 402-7.

Provencher, D. M., Finstad, C. L., Saigo, P. E., Rubin, S. C., Hoskins, W. J., Federici, M. G., Stockert, E., Lloyd, K. O., and Lewis, J. L., Jr. (1993). Comparison of antigen expression on fresh and cultured ascites cells and on solid tumors of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 50, 78-83.

Provencher, D. M., Lounis, H., Fink, D., Drouin, P., and Mes-Masson, A. M. (1997). Discordance in *P53* mutations when comparing ascites and solid tumors from patients with serous ovarian cancer. *Tumor Biol.* 18, 167-74.

Radisavljevic, S. V. (1977). The pathogenesis of ovarian inclusion cysts and cystomas. *Obstet. Gynecol.* 49, 424-9.

Rimessi, P., Gualandi, F., Morelli, C., TrabANELLI, C., Wu, Q., Possati, L., Montesi, M., Barrett, J. C., and Barbanti-Brodano, G. (1994). Transfer of human chromosome 3 to an ovarian carcinoma cell line identifies three regions on 3p involved in ovarian cancer. *Oncogene* 9, 3467-74.

Roberts, C. G., and Tattersall, M. H. (1990). Cytogenetic study of solid ovarian tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 48, 243-53.

Rodriguez, E., Sreekantaiah, C., and Chaganti, R. S. (1994). Genetic changes in epithelial solid neoplasia. *Cancer Res.* 54, 3398-406.

Rossing, M. A., Daling, J. R., Weiss, N. S., Moore, D. E., and Self, S. G. (1994). Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *New Engl. J. Med.* *331*, 771-6.

Rubin, S. C., Finstad, C. L., Hoskins, W. J., Provencher, D., Federici, M. G., Lloyd, K. O., and Lewis, J. L., Jr. (1991). Analysis of antigen expression at multiple tumor sites in epithelial ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *164*, 558-63.

Rubin, S. C., Kairemo, K. J., Brownell, A. L., Daghighian, F., Federici, M. G., Pentlow, K. S., Finn, R. D., Lambrecht, R. M., Hoskins, W. J., Lewis, J. L., Jr., and et al. (1993). High-resolution positron emission tomography of human ovarian cancer in nude rats using ¹²⁴I-labeled monoclonal antibodies. *Gynecol. Oncol.* *48*, 61-7.

Sasano, H., Comerford, J., Silverberg, S. G., and Garrett, C. T. (1990). An analysis of abnormalities of the retinoblastoma gene in human ovarian and endometrial carcinoma. *Cancer* *66*, 2150-4.

Sato, T., Akiyama, F., Sakamoto, G., Kasumi, F., and Nakamura, Y. (1991). Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Res.* *51*, 5794-9.

Sato, T., Saito, H., Morita, R., Koi, S., Lee, J. H., and Nakamura, Y. (1991). Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res.* *51*, 5118-22.

Schechter, A. L., Hung, M. C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R. A., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Ullrich, A., and Coussens, L. (1985). The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229, 976-8.

Schildkraut, J. M., Risch, N., and Thompson, W. D. (1989). Evaluating genetic association among ovarian, breast, and endometrial cancer: evidence for a breast/ovarian cancer relationship. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 521-9.

Schildkraut, J. M., and Thompson, W. D. (1988). Familial ovarian cancer: a population-based case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 128, 456-66.

Schreiber, G., and Dubeau, L. (1990). *C-myc* proto-oncogene amplification detected by polymerase chain reaction in archival human ovarian carcinomas. *Am. J. Pathol.* 137, 653-8.

Seizinger, B. R., Rouleau, G. A., Ozelius, L. J., Lane, A. H., Farmer, G. E., Lamiell, J. M., Haines, J., Yuen, J. W., Collins, D., Majoor-Krakauer, D., and et al. (1988). Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332, 268-9.

Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 6497-501.

Sharkey, F. E., Spicer, J. H., and Fogh, J. (1985). Changes in histological differentiation of human tumors transplanted to athymic nude mice: a morphometric study. *Exp. Cell Biol.* *53*, 100-6.

Shimada, M., Yanagisawa, A., Kato, Y., Inoue, M., Shiozaki, H., Monden, M., and Nakamura, Y. (1996). Genetic mechanisms in esophageal carcinogenesis: frequent deletion of 3p and 17p in premalignant lesions. *Genes Chromosomes Cancer* *15*, 165-9.

Shu, X. O., Brinton, L. A., Gao, Y. T., and Yuan, J. M. (1989). Population-based case-control study of ovarian cancer in Shanghai. *Cancer Res.* *49*, 3670-4.

Shuin, T., Kondo, K., Torigoe, S., Kishida, T., Kubota, Y., Hosaka, M., Nagashima, Y., Kitamura, H., Latif, F., Zbar, B., and et al. (1994). Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* *54*, 2852-5.

Siemens, C. H., and Auersperg, N. (1988). Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *J. Cell. Physiol.* *134*, 347-56.

Sinna, G. A., Beckman, G., Lundgren, E., Nordenson, I., and Roos, G. (1979). Characterization of two human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* *7*, 267-80.

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-12.

Slattery, M. L., Schuman, K. L., West, D. W., French, T. K., and Robison, L. M. (1989). Nutrient intake and ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.* 130, 497-502.

Sobol, H., Mazoyer, S., Smith, S. A., Lyonnet, D., Bignon, Y. J., Narod, S. A., Ardoin, A., Biron, P., Bobin, J. Y., Bremond, A., and et al. (1993). Familial ovarian carcinoma: pedigree studies and preliminary results from linkage analysis. *Bulletin du Cancer* 80, 121-34.

Speicher, M. R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* 12, 368-75.

Sporn, M. B., Squire, R. A., Brown, C. C., Smith, J. M., Wenk, M. L., and Springer, S. (1977). 13-cis-retinoic acid: inhibition of bladder carcinogenesis in the rat. *Science* 195, 487-9.

Sun, L., Wu, G., Willson, J. K., Zborowska, E., Yang, J., Rajkarunanayake, I., Wang, J., Gentry, L. E., Wang, X. F., and Brattain, M. G. (1994). Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 26449-55.

Sutherland, G. R. (1991). Chromosomal fragile sites. *Genetic Analysis, Tech. Appl.* 8, 161-6.

Swisshelm, K., Ryan, K., Lee, X., Tsou, H. C., Peacocke, M., and Sager, R. (1994). Down-regulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differentiation* 5, 133-41.

Tanaka, K., Boice, C. R., and Testa, J. R. (1989). Chromosome aberrations in nine patients with ovarian cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 43, 1-14.

Tavassoli, M., Quirke, P., Farzaneh, F., Lock, N. J., Mayne, L. V., and Kirkham, N. (1989). *c-erbB-2/c-erbA* co-amplification indicative of lymph node metastasis, and *c-myc* amplification of high tumour grade, in human breast carcinoma. *Brit. J. Cancer* 60, 505-10.

Taylor, H. (1929). Malignant and semi-malignant tumors of the ovary. *Surg. Gynecol. Obstet.* 48, 204- 30.

Teneriello, M. G., Ebina, M., Linnoila, R. I., Henry, M., Nash, J. D., Park, R. C., and Birrer, M. J. (1993). *P53* and *Ki-ras* gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res.* 53, 3103-8.

Testa, J. R., Getts, L. A., Salazar, H., Liu, Z., Handel, L. M., Godwin, A. K., and Hamilton, T. C. (1994). Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells results in well to poorly differentiated tumors with a parallel range of cytogenetic complexity. *Cancer Res.* 54, 2778-84.

Tonin, P., Serova, O., Lenoir, G., Lynch, H., Durocher, F., Simard, J., Morgan, K., and Narod, S. (1995). *BRCA1* mutations in Ashkenazi Jewish women. *Am. J. Hum. Genet.* *57*, 189.

Tory, K., Brauch, H., Linehan, M., Barba, D., Oldfield, E., Filling-Katz, M., Seizinger, B., Nakamura, Y., White, R., Marshall, F. F., and et al. (1989). Specific genetic change in tumors associated with von Hippel-Lindau disease. *J. Natl. Cancer Institute* *81*, 1097-101.

Tory, K., Latif, F., Modi, W., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Cobler, P., Orcutt, M. L., Delisio, J., Geil, L., and et al. (1992). A genetic linkage map of 96 loci on the short arm of human chromosome 3. *Genomics* *13*, 275-86.

Trent, J. M., and Salmon, S. E. (1981). Karyotypic analysis of human ovarian carcinoma cells cloned in short term agar culture. *Cancer Genet. Cytogenet.* *3*, 279-91.

Tsukamoto, T., Takahashi, T., Ueda, R., Hibi, K., Saito, H., and Takahashi, T. (1992). Molecular analysis of the protein tyrosine phosphatase gamma gene in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* *52*, 3506-9.

Tzonou, A., Day, N. E., Trichopoulos, D., Walker, A., Saliarakis, M., Papapostolou, M., and Polychronopoulou, A. (1984). The epidemiology of ovarian cancer in Greece: a case-control study. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* *20*, 1045-52.

van de Vijver, M., van de Bersselaar, R., Devilee, P., Cornelisse, C., Peterse, J., and Nusse, R. (1987). Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Mol.Cell. Biol.* 7, 2019-23.

van den Berg, A., Draaijers, T. G., Kok, K., Timmer, T., Van der Veen, A. Y., Veldhuis, P. M., de Leij, L., Gerhartz, C. D., Naylor, S. L., Smith, D. I., and Buys, C. H. (1997). Normal *FHIT* transcripts in renal cell cancer- and lung cancer-derived cell lines, including a cell line with a homozygous deletion in the FRA3B region. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 220-7.

van der Hout, A. H., van der Vlies, P., Wijmenga, C., Li, F. P., Oosterhuis, J. W., and Buys, C. H. (1991). The region of common allelic losses in sporadic renal cell carcinoma is bordered by the loci D3S2 and THRB. *Genomics* 11, 537-42.

van der Riet-Fox, M. F., Retief, A. E., and van Niekerk, W. A. (1979). Chromosome changes in 17 human neoplasms studied with banding. *Cancer* 44, 2108-19.

Wang, J., Sun, L., Myeroff, L., Wang, X., Gentry, L. E., Yang, J., Liang, J., Zborowska, E., Markowitz, S., Willson, J. K., and et al. (1995). Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 22044-9.

Wang, N., and Perkins, K. L. (1984). Involvement of band 3p14 in t(3;8) hereditary renal carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 11, 479-81.

Watson, P. H., Singh, R., and Hole, A. K. (1996). Influence of *c-myc* on the progression of human breast cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213, 267-83.

Whaley, J. M., Naglich, J., Gelbert, L., Hsia, Y. E., Lamiell, J. M., Green, J. S., Collins, D., Neumann, H. P., Laidlaw, J., Li, F. P., and et al. (1994). Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 1092-102.

Whang-Peng, J., Knutsen, T., Douglass, E. C., Chu, E., Ozols, R. F., Hogan, W. M., and Young, R. C. (1984). Cytogenetic studies in ovarian cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 11, 91-106.

Whittemore, A. S., Harris, R., and Itnyre, J. (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol.* 136, 1212-20.

Whittemore, A. S., Harris, R., Itnyre, J., and Halpern, J. (1992). Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. I. Methods. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol.* 136, 1175-83.

Wingo, P. T., T. Bolden, S. (1995). *Cancer stat.* 45.

Wong, W. S., Wong, Y. F., Ng, Y. T., Huang, P. D., Chew, E. C., Ho, T. H., and Chang, M. Z. (1990). Establishment and characterization of a new human cell line derived from ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 38, 37-45.

Woods, L. K., Morgan, R. T., Quinn, L. A., Moore, G. E., Semple, T. U., and Stedman, K. E. (1979). Comparison of four new cell lines from patients with adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Res.* 39, 4449-59.

Wu, C. L., Sloan, P., Read, A. P., Harris, R., and Thakker, N. (1994). Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Res.* 54, 6484-8.

Yamada, T., Ueda, M., Otsuki, Y., Ueki, M., and Sugimoto, O. (1991). Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecol. Oncol.* 40, 118-28.

Yamakawa, K., Morita, R., Takahashi, E., Hori, T., Ishikawa, J., and Nakamura, Y. (1991). A detailed deletion mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 51, 4707-11.

Yang-Feng, T. L., Han, H., Chen, K. C., Li, S. B., Claus, E. B., Carcangiu, M. L., Chambers, S. K., Chambers, J. T., and Schwartz, P. E. (1993). Allelic loss in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 54, 546-51.

Yokota, J., Tsukada, Y., Nakajima, T., Gotoh, M., Shimosato, Y., Mori, N., Tsunokawa, Y., Sugimura, T., and Terada, M. (1989). Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* *49*, 3598-601.

Yuan, Y., Kim, W.-H., Han, H. S., Lee, J.-H., Park, H.-S., Chung, J.-K., Kang, S.-B., and Park, J.-G. (1997). Establishment and characterization of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* *66*, 378-387.

Yunis, J. J., and Soreng, A. L. (1984). Constitutive fragile sites and cancer. *Science* *226*, 1199-204.

Zheng, J. P., Robinson, W. R., Ehlen, T., Yu, M. C., and Dubeau, L. (1991). Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res.* *51*, 4045-51.

Zou, C. P., Clifford, J. L., Xu, X. C., Sacks, P. G., Chambon, P., Hong, W. K., and Lotan, R. (1994). Modulation by retinoic acid (RA) of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.* *54*, 5479-87.

ANNEXE I

**Article publié dans la revue Tumor Biology
volume 18, p 167-174, 1997**

Diane M. Provencher^{a,b}
Hafida Lounis^a
Dominique Fink^a
Pierre Drouin^{a,b}
Anne-Marie Mes-Masson^{a,c}

^a Centre de recherche Louis-Charles
Simard/Institut du cancer de
Montréal et

^b Département
d'Obstétrique-Gynécologie et

^c Département de Médecine,
Université de Montréal, Canada

Discordance in p53 Mutations When Comparing Ascites and Solid Tumors from Patients with Serous Ovarian Cancer

Abstract

We performed a mutational analysis of the p53 gene in matched samples of solid tumors and ascites from patients with ovarian cancer using the single-strand conformation polymorphism technique on exons 5-9 of the p53 gene on fresh and cultured material. We observed a discordance in the pattern of p53 mutations between the ascites and their solid tumor counterpart. In two cases, cancer cells from ascites carried a p53 mutation and the corresponding solid tumor cells retained the wild-type allele, while the opposite pattern was observed in two other patients samples. These results suggest that ovarian tumor cells within the ascites may not simply represent cells shed from the ovarian solid tumor and bear directly on gene therapy strategies in ovarian cancer.

Key Words

p53
Ovarian serous carcinoma
Ascites
Cell culture

Introduction

The ovary is a complex organ consisting of a heterogeneous population of cells programmed for distinct functions. An epithelial surface of coelomic origin covers the cortex and medulla of the ovary. Epithelial ovarian cancers, which represent 87% of all ovarian cancers, originate from either this surface epithelium or from the crypts or inclusion cysts developed from this surface epithelium [1]. After breaching the ovarian tumor capsule,

the most common behavior of ovarian cancer is to seed the peritoneal cavity leading to subsequent implantations over peritoneal surfaces with frequent ascites formation [2]. Present in at least one third of all cases, fresh ascites is in fact a voluminous exudate with a cellular fraction consisting mainly of ovarian epithelial cells that share antigenic cell surface markers similar to their solid tumor counterpart and some lymphocyte and mesothelial cell infiltration [3, 4].

KARGER

E-Mail karger@karger.ch
Fax + 41 61 306 12 34
<http://www.karger.ch>

© 1997 S. Karger AG, Basel
1010-4283/97/0183-0167\$12.00/0

Anne-Marie Mes-Masson, Centre de Recherche
Louis-Charles Simard, Institut du cancer de Montréal

Several research groups have attempted to assess the importance of the p53 tumor suppressor gene in ovarian cancer since the loss or inactivation of this gene has been implicated in a number of human cancers including colon, lung, breast and liver [5-7]. Using the rapid and sensitive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique [8] in combination with DNA sequence analysis, a number of groups have identified the occurrence of p53 mutations with varying frequencies in solid tumors derived from the ovary [9-16].

Two groups have taken advantage of alterations in the p53 gene to assess the clonality of ovarian epithelial ovarian cancers [12, 17]. In both studies, primary tumors and peritoneal solid tumor metastasis within the same patient displayed the same mutational pattern of the p53 gene, and led both groups to conclude that ovarian epithelial carcinomas were monoclonal in origin.

We have taken advantage of the appearance of p53 mutations in ovarian cancer to study the relationship between the ovarian tumor cells in solid tumors and ascites. In this report we describe the pattern of structural alterations of the p53 gene in solid tumors and malignant ascites from matched patients from both fresh and cultured specimens.

Materials and Methods

Patients and Clinical Samples

Biopsy material from tumor tissues (TOV) and ascites (OV) were collected following surgeries performed at the Hôpital Notre-Dame de Montréal between 1991 and 1993. All specimens were initially evaluated by a pathologist, and with preoperative informed consent obtained from the patient, a representative portion of each tumor was provided for research. Histological reports were obtained, and tumors were graded and staged according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics criteria. Patients were assigned a numerical code, and all samples de-

rived from a given patient bear the same numerical code. A portion of each solid tumor sample was snap-frozen and stored in liquid nitrogen, another portion used to extract DNA, and in some cases the remainder was used to derive primary cultures. For ascites, the cellular fraction was collected by centrifugation and stored at -80°C in 90% FBS: 10% buffered DMSO solution (50 ml DMSO, 3.03 g Tris base, 1.25 g dextrose, 1.68 g sodium citrate, H_2O to 100 ml, pH 6.7).

Primary Cell Cultures and Cell Lines

Primary cultures from malignant ascites (OV) of the ovary were derived as described [18]. We have previously shown that by a number of criteria the cells in culture are derived from and are representative of the original clinical material [18]. All cultures were maintained in OSE media consisting of 50:50 medium 199:105 (Sigma) supplemented with 10% FBS and with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin.

DNA Extraction

DNA extractions were performed on fresh or cultured specimens from solid tumors and ascites. Tissues were cut into small pieces using surgical scissors and suspended in 500 μl of extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA and 400 mM NaCl). In the case of ascites, cell pellets were collected by centrifugation and resuspended in 100 μl of extraction buffer. Cultured cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 100 μl of extraction buffer. Subsequently all samples received the same treatment. Ten micrograms of RNase was added and the solution was incubated at room temperature for 15 min. Following the addition of proteinase K and SDS (400 ng and 0.5%, respectively) the mixture was incubated at 55°C overnight and extracted with phenol/chloroform/isomyl alcohol (25:24:1). The DNA was then precipitated and resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 and 0.1 mM EDTA prior to polymerase chain reaction (PCR) amplification.

PCR-SSCP Analysis

Oligonucleotides primers used for the various exons were:

Exon 5:

53 \times 55 5'-TATCTGTTCACTTGTGCCCTCAC-3'
53 \times 53 5'-CCACTCGGATAAGATGCTGAGGA-3'

Exon 6:

53 \times 65 5'-TGGTTGCCAGGGTCCCCAG-3'
53 \times 63 5'-CCAGAGACCCAGTTGCAAAC-3'

Exon 7:

53 \times 75 5'-AAGGCGCACTGGCCTCATC-3'
53 \times 73 5'-AGTGTGCAGGGTGGCAAGTGG-3'

Exon 8:

53 × 85 5'-GGACAGCTAGGACCTGATTTTC-3'
53 × 83 5'-GGTGATAAAAGTGAATCTGAGG-3'

Exon 9:

53 × 95 5'-GCCTCAGATTCACCTTTTATCACC-3'
53 × 93 5'-TAGACTGGAACTTTCCACTTGAT-3'

Samples were subjected to two cycles of PCR amplification. First, exons 5 through 9 were amplified as follows: in a total volume of 50 μ l, 100 ng of genomic DNA was incubated in 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1% DMSO, 200 μ M dNTPs, 1 μ M of each primer (53 × 55 and 53 × 93) and 1 U of Taq polymerase. The templates were denatured 3 min at 94 °C. Each sample was then subjected to 33 cycles at 93 °C for 1 min, 50 °C for 1 min (60 °C for the 5 first cycles) and 72 °C for 2 min. Extension at 72 °C was increased to 5 min for the last cycle. Each sample was subsequently purified on a G-25 Sephadex column and ethanol-precipitated. The lyophilized DNA precipitate was resuspended in 20 μ l, diluted 1:100 and 2 μ l of this mixture was used to amplify each exon separately. In addition, the PCR mixture was adjusted to 1 × PCR buffer (Pharmacia), 200 μ M dNTPs, 1 μ M of each primer, 1 U of Taq polymerase and 5 μ Ci of [α -³²P] dCTP (3,000 Ci mmol⁻¹). The samples were denatured 1 min at 94 °C and submitted to 13 cycles at 93 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. For SSCP analysis, 10 μ l of the PCR product was diluted 5-fold in 0.1% SDS, 10 mM EDTA and 5 μ l was added to 15 μ l of loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol), heat-denatured at 95 °C for 3 min and chilled on ice. 5 μ l was loaded onto a 6% nondenaturing polyacrylamide gel (49:1 acrylamide to bis-acrylamide) containing 5% glycerol and 0.5 × TBE [19]. Gels were run with constant power (25–30 W) at room temperature. Following electrophoresis, the gels were dried and exposed to X-ray film at –80 °C for 1 or 2 days. All samples were tested in duplicate.

DNA Sequencing

For DNA sequencing, 2 μ l of the exon 5–9 amplification was diluted 1:200 in PCR buffer and subjected to a second round of amplification using primers 53 × 55 and 53 × 63 (exons 5 and 6) or 53 × 75 and 53 × 83 (exon 7) under the same conditions described above for SSCP but with 35 cycles. Internal primers were labeled with [γ -³²P] ATP and the PCR product was subsequently diluted 10-fold and sequenced directly following a modification of the Sanger dideoxy method [20] using Sequenase 2.0 (United States Biochemical, Cleveland, Ohio). The reactions were analyzed on a

6% acrylamide sequencing gel [21]. After electrophoresis, gels were dried and exposed to Kodak XAR film overnight.

Results

PCR-SSCP Analysis

We analyzed exons 5 through 9 of the p53 gene for the presence of mutations in DNA from 9 patients with malignant epithelial ovarian cancer in which malignant ascites was also available. In 5 cases (OV-76/TOV-76, OV-155/TOV-155, OV-156/TOV-156, OV-159//TOV-159 and OV-170/TOV-170) no mutant pattern was seen in either the solid tumor or matched ascites in the SSCP analysis.

DNA isolated from fresh tumor tissue and primary cell cultures derived from solid tumor tissue and from ascites from 4 patients (OV-55/TOV-55, OV-90/TOV-90, OV-123/TOV-123, OV-171/TOV-171) revealed alterations in the SSCP analysis (summarized in table 1). The mobility shift pattern of solid tumors derived from 1 patient (TOV-123D and TOV-123G) is shown in figure 1. TOV-123D and TOV-123G are derived from the left and right ovary of the same patient and show the same alteration in exon 6 of the p53 for exon 6. Similarly, TOV-171D and TOV-171G show a mutation in exon 7 of the p53 gene. However, the corresponding ascites, OV-123, revealed a wild-type pattern of p53 gene, while the corresponding ascites (OV-171), and the primary cultures derived thereof appear normal by SSCP analysis. In contrast, OV-90 and OV-55 gave a mutant p53 profile, while the corresponding solid tumor samples (TOV-55 and TOV-90) had a wild-type pattern. It is noteworthy that tissue culture samples from OV-55 and OV-90 cultures showed the same pattern of mutation as the fresh clinical material.

Table 1. p53 mutations in epithelial ovarian cancer and ascites

Specimen	Age years	DNA	Histological type	Grade	Stage	Exon	Codon	Nucleotide change	AA change
TOV-55G		left ovary	serous surface adenocarcinoma	3	III	WT	-	-	-
OV-55-1	57	ascites	malignant ascites	3	III	7	229	del. TC (stop at 238)	frameshift
OV-55-1		cultured cells	malignant ascites	3	III	7	229	del. TC (stop at 238)	frameshift
OV-55-2 ^a		ascites	malignant ascites	3	III	7	229	del. TC (stop at 238)	frameshift
OV-55-2		cultured cells	malignant ascites	3	III	7	229	del. TC (stop at 238)	frameshift
TOV-90	64	ovary	serous surface adenocarcinoma	3	III	WT	-	-	-
OV-90		ascites	malignant ascites	3	III	6	215	AGT to CGT	SER to ARG
OV-90		cultured cells	malignant ascites	3	III	6	215	AGT to CGT	SER to ARG
TOV-123D	46	right ovary	papillary serous cystadenocarcinoma	2	III	6	220	TAT to TGT	TYR to CYS
TOV-123G		left ovary	papillary serous cystadenocarcinoma	2	III	6	220	TAT to TGT	TYR to CYS
OV-123		ascites	malignant ascites	2	III	WT	-	-	-
TOV-171D	67	right ovary	papillary serous adenocarcinoma	2	II-III	7	237	ATG to ATA	MET to ILE
TOV-171G		left ovary	papillary serous adenocarcinoma	2	II-III	7	237	ATG to ATA	MET to ILE
OV-171		ascites	malignant ascites	2	II-III	WT	-	-	-
OV-171		cultured cells	malignant ascites	2	II-III	WT	-	-	-

AA = Amino acid; WT = no mutation observed.

^a Indicated samples collected at different time intervals.

Analysis of SSCP Band Shift by Direct Sequencing

To determine the nature of the mutations, all specimens showing an abnormal SSCP pattern were sequenced as well as all tumor samples from the corresponding patient. Of the four mutations identified, three resulted in a missense mutation that involved a change in an amino acid residue, whereas one demonstrated a two-base-pair deletion creating a frameshift which results in the introduction of a stop codon at amino acid position 238 [22]. No mutations were observed in samples which displayed the wild-type SSCP pattern. An example of the sequence analysis is presented in figure 1 and the results of the analysis are summarized in table 1.

Mutations of the p53 gene in tumors collected from both ovaries involved the same codon (TOV-123-D and G and TOV-171-D and G, table 1) indicating the clonal nature of these solid tumors. Ascites fluid was obtained 8 months apart from the same patient (OV55-1 and OV55-2, table 1) and in both cases the same abnormal p53 SSCP pattern was shown, and sequence analysis revealed the same deletion within exon 7 (table 1). In addition, sequence analysis revealed that the primary cultures derived from ovarian ascites OV-55 and OV-90 (table 1) had identical alterations in the p53 gene as the fresh clinical material. Immunohistochemical analysis of OV-90 cultured cells revealed that the mutation led to the stabilization of the altered form of p53 [data not included].

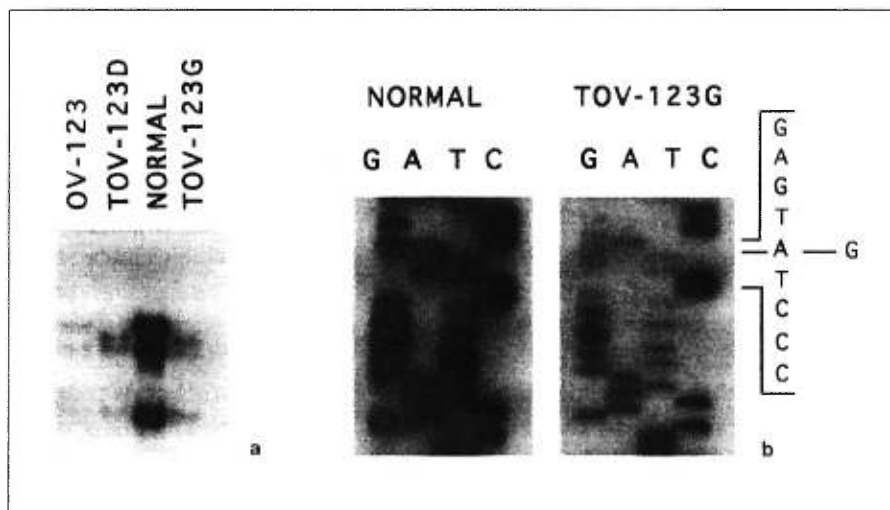


Fig. 1. **a** SSCP analysis of exon 6 of the p53 gene. DNAs were derived from ovarian tumors TOV-123G and TOV-123D, from ovarian ascites OV-123, and from a normal control sample. PCR products were migrated as described. **b** Sequence analysis of the ovarian tumor TOV-123G and normal control DNA.

Our results clearly show a different pattern in the mutational status of the p53 gene when comparing matched solid tumors and ascites from patients with epithelial ovarian cancer. In two cases (TOV-123 and TOV-171, table 1) DNA extracted from the solid tumors reveals the presence of a mutated p53 gene, while tumor cells derived from malignant ascites (OV-123 and OV-171) appear normal. In contrast, we twice observed mutations in the p53 gene in tumor cells derived from ascites (OV-55 and OV-90, table 1) without a corresponding mutation in the matched solid tumor samples (TOV-55 and TOV-90).

Discussion

The concept of tumor heterogeneity is well established at both phenotypic and genotypic levels [23]. While epithelial ovarian cancers share some common clinical and biological

features, these cancers can represent a remarkable heterogeneity in histological pattern and clinical behavior. In particular, one third of ovarian cancers are associated with the presence of ascites whose origin, as well as its relationship to the developing solid tumor are poorly understood [24]. To address this question we compared the pattern of p53 mutations in malignant cells of serous epithelial ovarian cancer from two different environments, solid tumor and ascites, within a given patient.

We have analyzed the pattern of p53 mutations in matched solid tumor and ascites from 9 patients diagnosed with serous epithelial ovarian cancer, a specific histological subtype of epithelial ovarian cancer. From our informative cases, three observations are worth noting: (1) in 2 patients tumor tissue displayed p53 mutation (TOV-123 and TOV-171), but matched ascites from these samples were negative, and in 2 patients where muta-

tions were observed from cells derived from the ascitic fluid (OV-55 and OV-90) a corresponding mutation in solid tumors was not noted; (2) in separate biopsies from the left and right ovary of 2 patients (sample TOV-123 and TOV-171) the same p53 mutational pattern was observed, and (3) where possible, we observed concordance of results (i.e. appearance of mutations) when comparing tumor DNA results with DNA isolated from cells in tissue culture which provides molecular evidence that our primary cultures are related to the original clinical material [18].

In regard to the specific mutations that were identified in our study, it is interesting to note that some similar base pair changes and deletions have been reported in other ovarian tumor samples: No. 220: TAT to TGT [11, 18] deletion, stop at No. 238 [11], and No. 237: ATG to ATA [10, 15, 25]. The fact that these mutations recur frequently may indicate a particular pattern of mutation proper to ovarian carcinomas.

It has been proposed that the presence of ovarian carcinoma implants on peritoneal surface may indicate a polyclonal origin of the disease [26]. However, our results support a unifocal origin for solid epithelial ovarian cancer since in cases where the two ovaries were studied, we observe the same p53 mutation in both ovaries (samples TOV-123 and TOV-171). This is in accordance with already published data [12, 17] where tumor DNAs collected from different sites in the same patient revealed the same mobility shifts in SSCP (hence the same mutation in p53) throughout the samples tested. However, our data suggests that p53 mutation may occur after the emergence of the ascites since their mutation pattern did not match those of the tumor. Alternatively, our results do not rule out the possibility that the solid tumor and ascites arise from polyclonal disease. These results bear directly on the biology of ovarian

cancer, and suggest that cancer cells within the ascites do not simply slough off from the solid tumor to seed the peritoneal fluid. The observed different pattern of p53 mutation in ascites and solid tumors from matched patients could indicate that p53 alterations constitute a later event in ovarian cancer, a hypothesis which has been proposed by others [10, 25]. The fact that the same pattern of p53 mutation was never observed in both ascites and solid tumors from the same patient in serous epithelial ovarian cancer could be related to the small size of samples studied or may represent a true feature which is related to the origin of the tumor cells.

Serous epithelial ovarian cancer can be subclassified into several subsets, including a particularly aggressive form, the papillary serous carcinoma, which is characterized by the absence or minimal parenchymal invasion of the ovaries and the surface spread of the tumor throughout the abdominal cavity. While 2 patients (samples 55 and 90) were diagnosed, by both clinical and histological criteria, with serous surface carcinoma, the remaining 2 patients with p53 mutations (samples 123 and 171) had too advanced disease to make this differential diagnosis. Therefore, the possibility exists that the discordance in the pattern of p53 mutations that we observe may be associated with a particular subset of serous epithelial tumors. In support of this notion, Rutledge et al. [27] have previously used flow cytometry to argue that serous surface carcinoma is different than serous ovarian carcinoma and may in fact represent multifocal independent primaries.

With the involvement of p53 in ovarian cancer, different strategies implicating gene therapy have been raised to combat tumor growth. In particular, the various gene therapy strategies aim at replacing the mutated gene through physical or functional means. Other than difficulties with the appropriate

selection of a vector or with the *in vivo/ex vivo* engineering, the individual heterogeneity of the ovarian cancer cell population remains an important issue that needs to be addressed [27–30]. Our results indicate that the pattern of mutations in p53 can be different in the solid tumors and ascites of a given patient with serous epithelial ovarian cancer, and bears directly on the implementation of successful gene therapy strategies.

Acknowledgments

We thank C. Godbout and M.-J. Milot for technical assistance. We are grateful to Dr. P. Audet-Lapointe, Dr. J. Dubuc-Lissoir and Dr. P. Gauthier for providing clinical specimens and to Dr. J. Gauthier for pathology. We thank Dr. L. Masson and Dr. R. Kothary for critical reading of the manuscript and for helpful comments. A.-M.M.-M. is the recipient of an FRSQ fellowship.

References

- Whitman GF, Nolan TE, Gallup DG: Normal ovarian development and function; in Markman M, Hoskins WJ (eds): *Cancer of the Ovary*. New York, Raven Press, 1993, pp 1–21.
- Morrow CP, Curtin JP, Townsend DE: Tumors of the ovary: Neoplasms derived from coelomic epithelium; in *Synopsis of Gynecologic Oncology*, ed 4. New York, Churchill Livingstone, 1993, pp 233–274.
- Rubin SC, Finstad CL, Hoskins WJ, Provencher DM, Federici MG, Lloyd KO, Lewis JL Jr: Analysis of antigen expression at multiple tumor sites in epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991;163:558–563.
- Provencher DM, Finstad CL, Saigo PE, Rubin SC, Hoskins WJ, Federici MG, Stockert E, Lloyd KO, Lewis JL Jr: Comparison of antigen expression on fresh and cultured ascites cells and on solid tumors of patients with epithelial ovarian cancer (EOC). *Gynecol Oncol* 1993;50:78–83.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53.
- Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL: Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 mutation in small lung cancer. *Oncogene* 1991;6:1067–1071.
- Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokata J, Hirobashi S, Nakatani D, Nakano H, Sugimura T, Terada M: p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res* 1991;51:5800–5805.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766–2770.
- Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S, Terashima Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J: Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:5171–5176.
- Mazars R, Pujol P, Maudelonde T, Jeanteur P, Theillet C: p53 mutations in ovarian cancer: A late event? *Oncogene* 1991;6:1685–1690.
- Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, Kitchener HC, Leonard RCF, Kelly KF, Parkin DE, Haites NE: p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2128–2132.
- Mok C-H, Tsao S-W, Knapp RC, Fishbaugh PM, Lau CC: Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Res* 1992;52:5119–5122.
- Naito M, Satake M, Sakai E, Hirano Y, Tsuchida N, Kanzaki H, Ito Y, Mori T: Detection of p53 gene mutations in human ovarian and endometrial cancers by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:1030–1036.
- Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Okada S, Matsuura S, Hirohashi S: High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA aneuploidy. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:978–984.
- Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW: p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4961–4965.
- Kim JW, Cho YH, Kwon DJ, Kim TE, Park TC, Lee JM, Namkoong SE: Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995;57:199–204.
- Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, Marks JR, Whitaker R, Kerns BAJ, Humphrey P, Berchuck A, Ponder BAJ, Bast RC Jr: Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: Analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1793–1798.

- 18 Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot M-J, Mes-Masson A-M: Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: A powerful tool for basic molecular studies. *Exp Cell Res* 1994; 215:303-309.
- 19 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 2. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 20 Meltzer SJ, Mane SM, Wood PK, Johnson L, Needleman SW: Sequencing products of the PCR directly, without purification. *Bio-techniques* 1990;8:142-148.
- 21 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
- 22 Lamb P, Crawford L: Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986;6:1379-1385.
- 23 Heppner GH: Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984;44:2259-2265.
- 24 Hirabayashi K, Graham J: Genesis of ascites in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1970;106:492-497.
- 25 Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC, Birrer MJ: p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasm. *Cancer Res* 1993;53:3103-3108.
- 26 Woodruff JD, Julian CG: Multiple malignancy in the upper genital tract. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 193:810-822.
- 27 Rutledge ML, Silva EG, McLemore D, El Naggat A: Serous surface carcinoma of the ovary and peritoneum: A flow cytometric study. *Pathol Annu* 1989;24:227-235.
- 28 Skilling JS, Squatrito RC, Connor JP, Niemann T, Buller RE: p53 gene mutation analysis and antisense-mediated growth inhibition of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 1996;60:72-80.
- 29 Geisler JP, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Geisler HE: The difference in biological activity between the primary tumor and omental metastases in papillary serous carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 1996;60:139-140.
- 30 Chen P-L, Chen Y, Bookstein R, Lee W-H: Genetic mechanisms of tumor suppression by the p53 gene. *Science* 1990;250:1576-1580.

Genevieve M. Provencher^{a,b}
Vida Lounis^a
Christine Fink^a
Suzanne Drouin^{a,b}
Anne-Marie Mes-Masson^{a,c}

Centre de recherche Louis-Charles
Simard/Institut du cancer de
Montréal et
Département
d'Obstétrique-Gynécologie et
Département de Médecine,
Université de Montréal, Canada

Discordance in p53 Mutations When Comparing Ascites and Solid Tumors from Patients with Serous Ovarian Cancer

Abstract

We performed a mutational analysis of the p53 gene in matched samples of solid tumors and ascites from patients with ovarian cancer using the single-strand conformation polymorphism technique on exons 5-9 of the p53 gene on fresh and cultured material. We observed a discordance in the pattern of p53 mutations between the ascites and their solid tumor counterpart. In two cases, cancer cells from ascites carried a p53 mutation and the corresponding solid tumor cells retained the wild-type allele, while the opposite pattern was observed in two other patients samples. These results suggest that ovarian tumor cells within the ascites may not simply represent cells shed from the ovarian solid tumor and bear directly on gene therapy strategies in ovarian cancer.

Key Words

Ovarian serous carcinoma
Ascites
Cell culture

Introduction

The ovary is a complex organ consisting of a heterogeneous population of cells programmed for distinct functions. An epithelial surface of coelomic origin covers the cortex and the medulla of the ovary. Epithelial ovarian cancers, which represent 87% of all ovarian cancers, originate from either this surface epithelium or from the crypts or inclusion cysts developed from this surface epithelium [1]. After breaching the ovarian tumor capsule,

the most common behavior of ovarian cancer is to seed the peritoneal cavity leading to subsequent implantations over peritoneal surfaces with frequent ascites formation [2]. Present in at least one third of all cases, fresh ascites is in fact a voluminous exudate with a cellular fraction consisting mainly of ovarian epithelial cells that share antigenic cell surface markers similar to their solid tumor counterpart and some lymphocyte and mesothelial cell infiltration [3, 4].

KARGER

Journal karger@karger.ch
+41 61 306 12 34
http://www.karger.ch

© 1997 S. Karger AG, Basel
1010-4283/97/0183-0167\$12.00/0

Anne-Marie Mes-Masson, Centre de Recherche
Louis-Charles Simard, Institut du cancer de Montréal

Several research groups have attempted to assess the importance of the p53 tumor suppressor gene in ovarian cancer since the loss or inactivation of this gene has been implicated in a number of human cancers including colon, lung, breast and liver [5-7]. Using the rapid and sensitive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique [8] in combination with DNA sequence analysis, a number of groups have identified the occurrence of p53 mutations with varying frequencies in solid tumors derived from the ovary [9-16].

Two groups have taken advantage of alterations in the p53 gene to assess the clonality of ovarian epithelial ovarian cancers [12, 17]. In both studies, primary tumors and peritoneal solid tumor metastasis within the same patient displayed the same mutational pattern of the p53 gene, and led both groups to conclude that ovarian epithelial carcinomas were monoclonal in origin.

We have taken advantage of the appearance of p53 mutations in ovarian cancer to study the relationship between the ovarian tumor cells in solid tumors and ascites. In this report we describe the pattern of structural alterations of the p53 gene in solid tumors and malignant ascites from matched patients from both fresh and cultured specimens.

Materials and Methods

Patients and Clinical Samples

Biopsy material from tumor tissues (TOV) and ascites (OV) were collected following surgeries performed at the Hôpital Notre-Dame de Montréal between 1991 and 1993. All specimens were initially evaluated by a pathologist, and with preoperative informed consent obtained from the patient, a representative portion of each tumor was provided for research. Histological reports were obtained, and tumors were graded and staged according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics criteria. Patients were assigned a numerical code, and all samples de-

rived from a given patient bear the same numerical code. A portion of each solid tumor sample was frozen and stored in liquid nitrogen, another portion used to extract DNA, and in some cases the remaining was used to derive primary cultures. For ascites cellular fraction was collected by centrifugation stored at -80°C in 90% FBS: 10% buffered DMSO solution (50 ml DMSO, 3.03 g Tris base, 1.25 g glucose, 1.68 g sodium citrate, H_2O to 100 ml, pH 6

Primary Cell Cultures and Cell Lines

Primary cultures from malignant ascites (OV) the ovary were derived as described [18]. We have previously shown that by a number of criteria the cell culture are derived from and are representative of original clinical material [18]. All cultures were maintained in OSE media consisting of 50:50 medium 199:105 (Sigma) supplemented with 10% FBS with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin

DNA Extraction

DNA extractions were performed on fresh or cultured specimens from solid tumors and ascites. Tissues were cut into small pieces using surgical scissors suspended in 500 μl of extraction buffer (10 mM HCl pH 8.0, 2 mM EDTA and 400 mM NaCl). In case of ascites, cell pellets were collected by centrifugation and resuspended in 100 μl of extraction buffer. Cultured cells were trypsinized, washed with PBS resuspended in 100 μl of extraction buffer. Subsequently all samples received the same treatment. Ten micrograms of RNase was added and the solution incubated at room temperature for 15 min. Following the addition of proteinase K and SDS (400 ng 0.5%, respectively) the mixture was incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$ overnight and extracted with phenol/chloroform/ethyl alcohol (25:24:1). The DNA was then precipitated and resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 0.1 mM EDTA prior to polymerase chain reaction (PCR) amplification.

PCR-SSCP Analysis

Oligonucleotide primers used for the various assays were:

Exon 5:

53 \times 55 5'-TATCTGTTCACCTGTGCCCCTCAC-3'
53 \times 53 5'-CCACTCGGATAAGATGCTGAGGA-3'

Exon 6:

53 \times 65 5'-TGGTTGCCAGGGTCCCCAG-3'
53 \times 63 5'-CCAGAGACCCCAGTTGCAAAC-3'

Exon 7:

53 \times 75 5'-AAGGCGCACTGGCCTCATC-3'
53 \times 73 5'-AGTGTGCAGGGTGGCAAGTGG-3'

Exon 8:

85 5'-GGACAGCTAGGACCTGATTTTC-3'
83 5'-GGTGATAAAAAGTGAATCTGAGG-3'

Exon 9:

95 5'-GCCTCAGATTCACCTTTTATCACC-3'
93 5'-TAGACTGGAAACTTTCCACTTGAT-3'

Samples were subjected to two cycles of PCR amplification. First, exons 5 through 9 were amplified as follows: in a total volume of 50 μ l, 100 ng of genomic DNA was incubated in 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 1 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 1% DMSO, 200 μ M dNTPs, 4 μ l of each primer (53 \times 55 and 53 \times 93) and 1 U of polymerase. The templates were denatured 3 min at 4°C. Each sample was then subjected to 33 cycles: 30°C for 1 min, 50°C for 1 min (60°C for the 5 first cycles) and 72°C for 2 min. Extension at 72°C was increased to 5 min for the last cycle. Each sample was subsequently purified on a G-25 Sephadex column and ethanol-precipitated. The lyophilized DNA precipitate was resuspended in 20 μ l, diluted 1:100 and 2 μ l of this mixture was used to amplify each exon separately. In addition, the PCR mixture was adjusted to 1 \times PCR buffer (Pharmacia), 200 μ M dNTPs, 1 μ M of each primer, 1 U of Taq polymerase and 5 μ Ci of [α - 32 P] dATP (3,000 Ci mmol $^{-1}$). The samples were denatured in at 94°C and submitted to 13 cycles at 93°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. For SSCP analysis, 10 μ l of the PCR product was diluted 5-fold in 0.1% SDS, 10 mM EDTA and 5 μ l was added to 10 μ l of loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, 5% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol), heat-treated at 95°C for 3 min and chilled on ice. 5 μ l was loaded onto a 6% nondenaturing polyacrylamide (49:1 acrylamide to bis-acrylamide) containing 5% xerol and 0.5 \times TBE [19]. Gels were run with constant power (25–30 W) at room temperature. Following electrophoresis, the gels were dried and exposed to X-ray film at –80°C for 1 or 2 days. All samples were run in duplicate.

DNA Sequencing

For DNA sequencing, 2 μ l of the exon 5–9 amplification was diluted 1:200 in PCR buffer and subjected to a second round of amplification using primers 53 \times 55 and 53 \times 63 (exons 5 and 6) or 53 \times 75 and 53 \times 93 (exon 7) under the same conditions described above for SSCP but with 35 cycles. Internal primers were labeled with [γ - 32 P] ATP and the PCR product was subsequently diluted 10-fold and sequenced directly following a modification of the Sanger dideoxy method [20] using Sequenase 2.0 (United States Biochemical, Cleveland, Ohio). The reactions were analyzed on a

6% acrylamide sequencing gel [21]. After electrophoresis, gels were dried and exposed to Kodak XAR film overnight.

Results

PCR-SSCP Analysis

We analyzed exons 5 through 9 of the p53 gene for the presence of mutations in DNA from 9 patients with malignant epithelial ovarian cancer in which malignant ascites was also available. In 5 cases (OV-76/TOV-76, OV-155/TOV-155, OV-156/TOV-156, OV-159//TOV-159 and OV-170/TOV-170) no mutant pattern was seen in either the solid tumor or matched ascites in the SSCP analysis.

DNA isolated from fresh tumor tissue and primary cell cultures derived from solid tumor tissue and from ascites from 4 patients (OV-55/TOV-55, OV-90/TOV-90, OV-123/TOV-123, OV-171/TOV-171) revealed alterations in the SSCP analysis (summarized in table 1). The mobility shift pattern of solid tumors derived from 1 patient (TOV-123D and TOV-123G) is shown in figure 1. TOV-123D and TOV-123G are derived from the left and right ovary of the same patient and show the same alteration in exon 6 of the p53 gene for exon 6. Similarly, TOV-171D and TOV-171G show a mutation in exon 7 of the p53 gene. However, the corresponding ascites, OV-123, revealed a wild-type pattern of p53 gene, while the corresponding ascites (OV-171), and the primary cultures derived thereof appear normal by SSCP analysis. In contrast, OV-90 and OV-55 gave a mutant p53 profile, while the corresponding solid tumor samples (TOV-55 and TOV-90) had a wild-type pattern. It is noteworthy that tissue culture samples from OV-55 and OV-90 cultures showed the same pattern of mutation as the fresh clinical material.

tions were observed from cells derived from the ascitic fluid (OV-55 and OV-90) a corresponding mutation in solid tumors was not noted; (2) in separate biopsies from the left and right ovary of 2 patients (sample TOV-123 and TOV-171) the same p53 mutational pattern was observed, and (3) where possible, we observed concordance of results (i.e. appearance of mutations) when comparing tumor DNA results with DNA isolated from cells in tissue culture which provides molecular evidence that our primary cultures are related to the original clinical material [18].

In regard to the specific mutations that were identified in our study, it is interesting to note that some similar base pair changes and deletions have been reported in other ovarian tumor samples: No. 220: TAT to TGT [11, 18] deletion, stop at No. 238 [11], and No. 237: ATG to ATA [10, 15, 25]. The fact that these mutations recur frequently may indicate a particular pattern of mutation proper to ovarian carcinomas.

It has been proposed that the presence of ovarian carcinoma implants on peritoneal surface may indicate a polyclonal origin of the disease [26]. However, our results support a unifocal origin for solid epithelial ovarian cancer since in cases where the two ovaries were studied, we observe the same p53 mutation in both ovaries (samples TOV-123 and TOV-171). This is in accordance with already published data [12, 17] where tumor DNAs collected from different sites in the same patient revealed the same mobility shifts in SSCP (hence the same mutation in p53) throughout the samples tested. However, our data suggests that p53 mutation may occur after the emergence of the ascites since their mutation pattern did not match those of the tumor. Alternatively, our results do not rule out the possibility that the solid tumor and ascites arise from polyclonal disease. These results bear directly on the biology of ovarian

cancer, and suggest that cancer cells within the ascites do not simply slough off from solid tumor to seed the peritoneal fluid. The observed different pattern of p53 mutations in ascites and solid tumors from matched patients could indicate that p53 alterations constitute a later event in ovarian cancer, a hypothesis which has been proposed by others [10, 25]. The fact that the same pattern of mutation was never observed in both ascitic and solid tumors from the same patient with serous epithelial ovarian cancer could be related to the small size of samples studied and may represent a true feature which is related to the origin of the tumor cells.

Serous epithelial ovarian cancer can be subclassified into several subsets, including a particularly aggressive form, the papillary serous carcinoma, which is characterized by absence or minimal parenchymal invasion of the ovaries and the surface spread of tumor throughout the abdominal cavity. While 2 patients (samples 55 and 90) were diagnosed, by both clinical and histological criteria, with serous surface carcinoma, the remaining 2 patients with p53 mutations (samples 123 and 171) had too advanced disease to make this differential diagnosis. Therefore, the possibility exists that the concordance in the pattern of p53 mutations we observe may be associated with a particular subset of serous epithelial tumors. In support of this notion, Rutledge et al. [27] have previously used flow cytometry to argue that serous surface carcinoma is different than papillary serous ovarian carcinoma and may in fact represent multifocal independent primaries.

With the involvement of p53 in ovarian cancer, different strategies implicating gene therapy have been raised to combat tumor growth. In particular, the various gene therapy strategies aim at replacing the mutated gene through physical or functional means. Other than difficulties with the approach

ction of a vector or with the in vivo/ex vivo engineering, the individual heterogeneity of the ovarian cancer cell population remains an important issue that needs to be addressed [27–30]. Our results indicate that pattern of mutations in p53 can be different in the solid tumors and ascites of a given patient with serous epithelial ovarian cancer, which bears directly on the implementation of successful gene therapy strategies.

Acknowledgments

We thank C. Godbout and M.-J. Milot for technical assistance. We are grateful to Dr. P. Audet-Lapointe, Dr. J. Dubuc-Lissoir and Dr. P. Gauthier for providing clinical specimens and to Dr. J. Gauthier for pathology. We thank Dr. L. Masson and Dr. R. Kothary for critical reading of the manuscript and for helpful comments. A.-M.M.-M. is the recipient of an FRSQ fellowship.

References

- Whitman GF, Nolan TE, Gallup DG: Normal ovarian development and function; in Markman M, Hoskins WJ (eds): *Cancer of the Ovary*. New York, Raven Press, 1993, pp 19–21.
- Morrow CP, Curtin JP, Townsend RR: Tumors of the ovary: Neoplasms derived from coelomic epithelium; in *Synopsis of Gynecologic Oncology*, ed 4. New York, Churchill Livingstone, 1993, pp 233–274.
- Rubin SC, Finstad CL, Hoskins WJ, Provencher DM, Federici MG, Lloyd KO, Lewis JL Jr: Analysis of antigen expression at multiple tumor sites in epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991;163:558–563.
- Provencher DM, Finstad CL, Saigo PE, Rubin SC, Hoskins WJ, Federici MG, Stockert E, Lloyd KO, Lewis JL Jr: Comparison of antigen expression on fresh and cultured ascites cells and on solid tumors of patients with epithelial ovarian cancer (EOC). *Gynecol Oncol* 1993;50:78–83.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53.
- Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL: Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 mutation in small lung cancer. *Oncogene* 1991;6:1067–1071.
- 7 Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokata J, Hirobashi S, Nakatani D, Nakano H, Sugimura T, Terada M: p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res* 1991;51:5800–5805.
- 8 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766–2770.
- 9 Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S, Terashima Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J: Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:5171–5176.
- 10 Mazars R, Pujol P, Maudelonde T, Jeanteur P, Theillet C: p53 mutations in ovarian cancer: A late event? *Oncogene* 1991;6:1685–1690.
- 11 Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, Kitchener HC, Leonard RCF, Kelly KF, Parkin DE, Haites NE: p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2128–2132.
- 12 Mok C-H, Tsao S-W, Knapp RC, Fishbaugh PM, Lau CC: Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Res* 1992;52:5119–5122.
- 13 Naito M, Satake M, Sakai E, Hirano Y, Tsuchida N, Kanzaki H, Ito Y, Mori T: Detection of p53 gene mutations in human ovarian and endometrial cancers by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:1030–1036.
- 14 Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Okada S, Matsuura S, Hirohashi S: High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA aneuploidy. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:978–984.
- 15 Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW: p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4961–4965.
- 16 Kim JW, Cho YH, Kwon DJ, Kim TE, Park TC, Lee JM, Namkoong SE: Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995;57:199–204.
- 17 Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, Marks JR, Whitaker R, Kerns BAJ, Humphrey P, Berchuck A, Ponder BAJ, Bast RC Jr: Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: Analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1793–1798.

- 18 Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot M-J, Mes-Masson A-M: Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: A powerful tool for basic molecular studies. *Exp Cell Res* 1994; 215:303-309.
- 19 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 2. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 20 Meltzer SJ, Mane SM, Wood PK, Johnson L, Needleman SW: Sequencing products of the PCR directly, without purification. *Bio-techniques* 1990;8:142-148.
- 21 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-5467.
- 22 Lamb P, Crawford L: Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986;6:1379-1385.
- 23 Heppner GH: Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984;44:2259-2265.
- 24 Hirabayashi K, Graham J: Genesis of ascites in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1970;106:492-497.
- 25 Teneriello MG, Ebina M, Linnoila RI, Henry M, Nash JD, Park RC, Birrer MJ: p53 and Ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasm. *Cancer Res* 1993;53:3103-3108.
- 26 Woodruff JD, Julian CG: Multiple malignancy in the upper genital tract. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 193:810-822.
- 27 Rutledge ML, Silva EG, McLemore D, El Naggar A: Serous surface carcinoma of the ovary and peritoneum: A flow cytometric study. *Pathol Annu* 1989;24:227-235.
- 28 Skilling JS, Squatrito RC, C JP, Niemann T, Buller RE: p53 mutation analysis and antisense mediated growth inhibition of human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 1996;60:72-80.
- 29 Geisler JP, Wiemann MC, Zilberstein ML, Miller GA, Geisler HE: The difference in biological activity between the primary tumor and omentum metastases in papillary serous carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 1996;60:139-140.
- 30 Chen P-L, Chen Y, Bookstein I, Wang W-H: Genetic mechanisms of p53 suppression by the p53. *Science* 1990;250:1576-1580.