



Université de Montréal

**Caractérisation fonctionnelle de la GTPase Ran dans le  
cancer épithélial de l'ovaire**

par

Véronique Barrès

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc.)  
en biologie moléculaire

Avril 2010

© Véronique Barrès, 2010

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation fonctionnelle de la GTPase Ran dans le cancer épithélial de l'ovaire

présenté par :

Véronique Barrès

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Manuela Santos

Président-rapporteur

Anne-Marie Mes-Masson

Directrice de recherche

Diane Provencher

Co-directrice

Nathalie Lamarche

Membre du jury

## Résumé

Le cancer épithélial de l’ovaire est le plus létal des cancers gynécologiques. Les tumeurs de l’ovaire se divisent en différentes classes reflétant l’étendue de la maladie. Les tumeurs à faible potentiel de malignité présentent une survie relative à 5 ans de 90%, alors que pour les tumeurs invasives, la survie à 5 ans chute drastiquement à 35-40%. Au laboratoire, nous avons précédemment identifié la protéine Ran, un membre de la superfamille des GTPases Ras, comme marqueur fortement exprimé dans les cancers épithéliaux de l’ovaire de haut grade et de haut stade dont la surexpression est associée à un mauvais pronostic. Ran est déjà connue pour contribuer au transport nucléocytoplasmique et à la progression du cycle cellulaire, mais son rôle dans le cancer ovarien n’est pas bien défini. En utilisant une approche de shRNA inductibles à la tétracycline basée sur les lentivirus, nous avons montré que la diminution de l’expression de Ran dans des lignées cellulaires agressives du cancer de l’ovaire affecte drastiquement la prolifération cellulaire par l’induction d’une apoptose caspase-3 dépendante. Par un essai de tumeurs en xénogreffes, nous avons démontré que la déplétion de Ran résulte en une diminution de la tumorigenèse et que la formation éventuelle de tumeurs est associée à une sélection des cellules tumorales ayant la capacité de ré-exprimer la protéine Ran. Ces résultats suggèrent un rôle critique pour Ran dans la survie et la tumorigénicité des cellules du cancer ovarien, indiquant que Ran pourrait être une cible thérapeutique intéressante.

## Mots-clés

Cancer épithélial de l’ovaire

Tumeurs à faible potentiel de malignité et invasives

Ran GTPase

Apoptose

## Summary

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal gynecological cancer. Malignant epithelial tumors can be divided into different classes reflecting the extent of the disease. Low malignant potential (LMP) tumors have a 5 years survival rate of 90-95%. For invasive cancers (TOVs), the survival rate drops dramatically to 35-40%. In the laboratory, we previously identified that Ran protein, a member of the Ras GTPase family, is highly expressed in high grade and high stage serous epithelial ovarian cancers, and that its over-expression is associated with a poor prognosis. Ran is known to contribute to both nucleocytoplasmic transport and cell cycle progression, but its role in ovarian cancer is not well defined. Using a lentivirus-based tetracycline inducible shRNA approach, we show that down-regulation of Ran expression in aggressive ovarian cancer cell lines drastically affects cellular proliferation by inducing a caspase-3 dependent apoptosis. Using a xenograft tumor assay, we demonstrate that depletion of Ran results in decreased tumorigenesis, and eventual tumor formation is associated with the selection of tumor cells able to re-express the Ran protein. These results suggest a critical role for Ran in ovarian cancer cell survival and tumorigenicity and suggest that this critical GTPase may be suitable as a therapeutic target.

## Keywords

Epithelial ovarian cancer

Low malignant potential and invasive tumors

Ran GTPase

Apoptosis

# Table des matières

Résumé.....	i
Mots-clés.....	i
Summary.....	ii
Keywords.....	ii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 L'ovaire normal.....	1
1.1.1 L'embryologie de l'ovaire.....	1
1.1.2 L'anatomie de l'ovaire.....	3
1.1.3 L'histologie de l'ovaire.....	5
1.1.4 La physiologie de l'ovaire.....	6
1.2 Le cancer de l'ovaire.....	10
1.2.1 L'épidémiologie du cancer de l'ovaire.....	10
1.2.2 L'étiologie et les facteurs de risque du cancer de l'ovaire.....	12
1.2.2.1 L'âge.....	12
1.2.2.2 L'alimentation.....	12
1.2.2.3 Les habitudes de vie.....	13
1.2.2.4 Les facteurs environnementaux et l'hypothèse de l'inflammation.....	14
1.2.2.5 L'hypothèse de l'ovulation.....	14
1.2.2.6 L'hypothèse des gonadotrophines.....	15
1.2.2.7 Les facteurs génétiques.....	16

1.2.3	Les différentes tumeurs de l’ovaire.....	17
1.2.3.1	Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels.....	17
1.2.3.2	Les tumeurs germinales.....	18
1.2.3.3	Les tumeurs épithéliales de l’ovaire.....	18
1.3	Le cancer épithélial de l’ovaire (CÉO).....	18
1.3.1	Classification des tumeurs de l’ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique (FIGO).....	18
1.3.1.1	Les classes tumorales.....	19
1.3.1.1.1	Les tumeurs bénignes (BOV).....	19
1.3.1.1.2	Les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP)....	20
1.3.1.1.3	Les tumeurs invasives (TOV).....	22
1.3.1.2	Les types histopathologiques.....	23
1.3.1.2.1	Les tumeurs séreuses.....	23
1.3.1.2.2	Les tumeurs endométrioïdes.....	24
1.3.1.2.3	Les tumeurs mucineuses.....	25
1.3.1.2.4	Les tumeurs à cellules claires.....	26
1.3.1.2.5	Les autres types histopathologiques.....	27
1.3.1.3	Les grades de différenciation du CÉO (G0-G3).....	28
1.3.1.4	Les stades du CÉO (SI-SIV).....	28
1.3.2	Les origines possible du CÉO.....	31
1.3.2.1	L’OSE et les kystes d’inclusion.....	31
1.3.2.2	Les trompes de Fallope.....	32
1.3.2.3	L’hypothèse d’un continuum dans le développement du CÉO.....	32
1.3.3	Présentation clinique du CÉO.....	34
1.3.3.1	Les symptômes.....	34
1.3.3.2	Les techniques de dépistage et le diagnostic.....	34
1.3.3.3	Les traitements.....	35
1.3.3.4	Le suivi des patientes.....	37
1.3.3.5	La progression de la maladie.....	38

1.3.4	Les facteurs pronostiques.....	39
1.3.4.1	L'âge au diagnostic .....	39
1.3.4.2	Le stade de la maladie .....	39
1.3.4.3	Le grade de la tumeur.....	39
1.3.4.4	Le type histopathologique.....	40
1.3.4.5	La maladie résiduelle.....	40
1.3.4.6	Le statut des gènes <i>BRCA1</i> et <i>BRCA2</i> .....	40
1.4	Les modèles d'étude du CÉO .....	40
1.5	Les enjeux du CÉO .....	42
1.6	La GTPase Ran .....	43
1.6.1	La superfamille des GTPases Ras .....	44
1.6.1.1	La structure des GTPases Ras.....	44
1.6.1.2	La régulation des GTPases Ras.....	45
1.6.2	Ras-related nuclear protein (Ran) .....	46
1.6.2.1	Le transport nucléocytoplasmique .....	47
1.6.2.2	La progression du cycle cellulaire.....	50
1.6.2.2.1	Inhibition de la re-réplication .....	50
1.6.2.2.2	L'entrée en mitose.....	50
1.6.2.2.3	La mitose .....	51
1.6.2.2.4	La régénération de la membrane nucléaire.....	54
1.6.3	Ran et le cancer .....	55
1.7	Objectif du projet de maîtrise .....	56

CHAPITRE 2 :	
An essential role for Ran GTPase in epithelial ovarian cancer cells survival.....	57
Résumé.....	58
Abstract.....	59
Introduction.....	60
Materials and methods.....	62
Results.....	67
Discussion.....	71
Acknowledgements.....	74
References.....	75
Figures.....	78
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	87
3.1 Expression différentielle de Ran suite à l'induction à la tétracycline.....	87
3.2 Prolifération des cellules sous-exprimant Ran.....	88
3.3 Survie cellulaire des cellules sous-exprimant Ran <i>in vitro</i> .....	90
3.4 Progression tumorale des cellules sous-exprimant Ran en souris SCID.....	93
Conclusion.....	95
Perspectives.....	96
CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE.....	98

## Liste des tableaux

Chapitre 1 :

Tableau I	Stadification du cancer épithélial de l’ovaire .....	30
-----------	--	----

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1	Anatomie du système reproducteur de la femme .....	4
Figure 2	Histologie de l’ovaire normal .....	5
Figure 3	Maturation du follicule au sein d’un ovaire normal .....	7
Figure 4	Cycle reproducteur féminin.....	9
Figure 5	Survie relative à 5 ans (%) des cancers les plus fréquents pour les deux sexes combinés. ....	11
Figure 6	Représentation de l’origine des trois principales classes de tumeurs ovariennes .....	17
Figure 7	Coupe histologique d’une tumeur bénigne.....	19
Figure 8	Coupe histologique d’une tumeur à faible potentiel de malignité.....	21
Figure 9	Coupe histologique d’une tumeur à faible potentiel de malignité présentant une architecture de carcinome micropapillaire séreux (MPSC).....	22
Figure 10	Coupe histologique d’une tumeur invasive .....	23
Figure 11	Coupe histologique d’une tumeur séreuse.....	24
Figure 12	Coupe histologique d’une tumeur endométrioïde.....	25
Figure 13	Coupe histologique d’une tumeur mucineuse.....	26
Figure 14	Coupe histologique d’une tumeur à cellules claires.....	27
Figure 15	Représentation du patron de dissémination des cellules du cancer épithélial de l’ovaire.....	29
Figure 16	Expression de la GTPase Ran dans des tissus du cancer épithélial de l’ovaire de différents grades variant de GO (LMP) à G3.....	43
Figure 17	Domaines fonctionnels de la protéine Ras.....	45

Figure 18	Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine Ras liée au GTP et des régions qui subissent des changements conformationnels suite à la liaison au GTP.....	46
Figure 19	Vue d'ensemble de l'import de protéines nucléaires.....	49
Figure 20	Représentation schématique de l'assemblage du fuseau mitotique dépendant de Ran-GTP.....	53

## Chapitre 2

Figure 1	Ran expression in parental cell lines, mix populations and clones.....	78
Figure 2	Effect of Ran depletion on proliferation.....	79
Figure 3	Loss of Ran expression results in a caspase-3 dependant apoptosis in ovarian cancer cell lines.....	80
Figure 4	Loss of Ran expression results in tumor regression <i>in vivo</i> .....	82
Figure S1	Effect of Ran depletion on proliferation.....	84
Figure S2	Tumor growth of mice injected with TOV112D TetR shRNA LacZ. ....	85
Figure S3	Immunohistochemistry analysis of the xenografts in control tumors.....	86

## Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMH	Anti-müllerian hormone
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
BOV	Benign ovarian tumor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1
BRCA	Breast Cancer
CA125	Cancer antigen 125
CAS	Cellular apoptosis susceptibility
Cdc2	Cell division cycle 2
cDNA	Complementary DNA
CÉO	Cancer épithélial de l'ovaire
CIHR	Canadian institutes of health research
CIPA	Comité Institutionnel de la Protection des Animaux
CPR	Complexe de pré-réplication
CRM1	CRM1p homologue. Aussi nommée Exportine-1 (XPO1)
CT scan	Computed tomography scan
DNA	Deoxyribonucleic acid

EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EOC	Epithelial ovarian cancer
FBS	Fetal bovine serum
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FSH	Follicle-stimulating hormone
G	Grade de la tumeur
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Guanosine triphosphatase
H	Histone
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells
HeLa	Henrietta Lacks cells
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HRP	Horseradish peroxidase
HURP	Hepatoma up-regulated protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
KRAS	v-ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LH	Luteinizing hormone
LHRH	Gonadolibérine
LMP	Low malignant potential

MCM	Mini chromosome maintenance
MLH1	MutL homolog 1
MPSC	Micropapillary serous carcinoma
MSH2	MutS homolog 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NES	Nuclear export signal
NK	Natural killer
NLS	Nuclear localization signal
NPC	Nuclear pore complex
NPM	Nucleophosmin
NTF2	Nuclear transport factor-2
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein
OCT	Optimal cutting temperature
ORC	Origin recognition complex
OSE	Ovarian surface epithelium
p53	Tumor protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET scan	Positron emission tomography scan
PI	Propidium iodide
PMS1	Postmeiotic segregation increased <i>S. cerevisiae</i> 1
PMS2	Postmeiotic segregation increased <i>S. cerevisiae</i> 2
Q-RT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Ran	Ras-related nuclear factor
RanBP	Ran binding protein
RanGAP	Ran GTPase activating protein 1
Ras	Rat sarcoma
RCC1	Regulator of chromosome condensation 1
RNA	Ribonucleic acid
S	Stade de la maladie
SAF	Spindle activating factor
SCID	Severe combined immune deficient
shRNA	short-hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SRC	Séquence de rétention cytoplasmique
SRY	Sex determining region of the chromosome Y
TetR	Tetracycline repressor
TMA	Tissue microarray
TMRE	Tetramethylrhodamine ethylester
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TOV	Invasive ovarian tumor
TPX2	Targeting protein for Xklp2

*À mes parents, les meilleurs qui  
puissent exister*

*À mon frère, mon complice*

*À Nicolas, mon tendre amour*

*Je sais que je pourrai toujours compter sur vous*

## Remerciements

Je ne peux commencer cette section qu'en remerciant mes directrices de recherche, les Dres Anne-Marie Mes-Masson et Diane Provencher. C'est grâce à votre accueil que j'ai eu la chance d'effectuer mes études de maîtrise dans cette grande famille qu'est notre laboratoire. La confiance que vous m'avez toujours portée m'a permis d'évoluer tout au long de mon projet passionnant et de sortir de cette expérience grandie.

Merci à tous les membres du laboratoire, passés et présents, sans qui la poursuite de mes études n'aurait pas été si plaisante. Merci à vous tous pour votre soutien, vos sourires, votre aide et pour les discussions qui ont aidé à faire avancer mon projet ou tout simplement à faire passer une journée plus difficile. Je remercie sincèrement les gens du groupe ovaire, aux gens du groupe prostate et de l'unité polyome.

Plus particulièrement, je remercie Véronique Ouellet et Benjamin Péant pour leurs précieux conseils et corrections suite à la lecture de mes textes. Je tiens aussi à souligner l'amitié de Lise Portelance. Merci pour toutes ces conversations et ces matinées, qui étaient beaucoup plus agréables juste à l'idée d'être à ses côtés pour faire ma culture cellulaire. Merci à Louise Champoux, pour tout le travail qu'elle fait pour nous et pour les innombrables petites douceurs qu'elle nous fait goûter à chacun de ses passages au laboratoire, à Isabelle Létourneau pour sa bonne humeur et sa motivation et à Karine Normandin, pour son amitié et son soutien, qui a su faire de ces années au laboratoire un passage plus qu'agréable. Merci à Julie Desgagnés, avec qui j'ai assisté aux cours et congrès et dont le grand cœur est toujours ouvert à partager discussions et desserts et à Jason Madore, qui m'a patiemment montré tout ce qu'il connaissait à mon arrivée au sein du laboratoire.

J'aimerais spécialement remercier Isabelle Cousineau, Katia Caceres et Julie Lafontaine pour leur soutien, sous toutes ses formes. Particulièrement, je désire souligner l'amitié de Katia, qui m'oblige parfois à prendre des pauses santé (pour moi à tout le moins) afin de reposer mon cerveau lorsqu'il n'est plus productif. Nos discussions sur Ran m'ont aidé à

faire avancer mon projet de recherche et mon mémoire. J'espère sincèrement que Ran te plaira autant qu'à moi.

Je ne peux faire autrement que de dire un grand merci à tous les autres membres de l'ICM, du CHUM et des départements de gynécologie et de pathologie qui ont rendu mon projet possible. Évidemment, je n'aurais pu effectuer tout ce travail sans l'aide financière qui m'a été accordée. Je remercie donc mes directrices de recherche, l'ICM, Canderel, la faculté des études supérieures et le programme de biologie moléculaire de l'Université de Montréal, le CHUM et les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour leur soutien et leur confiance.

Enfin, je tiens à terminer cette section en remerciant de tout mon cœur les gens qui me connaissent hors du laboratoire. Une note spéciale pour mon amie Michèle Santschi. Je sais que nos routes se sont séparées après le Bacc, mais les kilomètres qui nous séparent ne peuvent nous éloigner l'une de l'autre. Un merci particulier à mes parents, Johanne Fortier et Michel Barrès, à mon frère, Olivier Barrès, à ma marraine spirituelle, Lyne Fortier, ainsi que toute ma famille. Vous m'avez toujours poussé à me surpasser, à foncer et surtout à m'améliorer. Vous n'avez pas toujours su ce que je faisais concrètement dans le laboratoire, mais vous avez toujours cru en moi et su être là pour m'encourager. De vous savoir fiers de moi me pousse à constamment faire mieux. Pour terminer, j'aimerais dire un merci tout spécial à mon amour, Nicolas. Tu étais présent pour me soutenir dans les moments plus difficiles et pour me féliciter dans les moments plus heureux. Tu as toujours su m'encourager et être là pour moi. Merci de m'avoir poussé à m'engager dans cette belle aventure!

# **CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

## **1.1 L'ovaire normal**

Les ovaires sont des organes paires qui ont pour fonction la production des gamètes femelles. Elles assurent ainsi une fonction vitale à l'humain : la perpétuation de notre espèce sur Terre. Ces glandes sont aussi responsables de la sécrétion des hormones sexuelles essentielles à la féminisation et à la reproduction. Au fil du temps, les cellules de cet organe de grande importance peuvent acquérir des modifications génétiques et épigénétiques ayant le potentiel de mener à la formation de tumeurs bénignes ou malignes, comptant parmi les tumeurs les plus complexes chez l'humain. Afin de bien comprendre la complexité des tumeurs qui dérivent des cellules ovariennes, et plus particulièrement des tumeurs épithéliales qui sont le sujet du présent ouvrage, l'embryologie, l'anatomie, l'histologie et la physiologie de l'ovaire normal seront d'abord décrites dans les sections qui suivent.

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

Le développement des gonades, testicules et ovaires, représente un cas unique du développement des organes du corps humain. Pour chacune des autres parties du corps, chaque ébauche d'organe ne peut donner qu'un organe précis. Néanmoins, il en est autrement pour les gonades. Avant la différenciation en ovaires ou en testicules, les gonades passent par un stade bipotentiel, ou indifférencié, où il n'y a ni caractère femelle, ni caractère mâle [1].

Les ébauches gonadiques apparaissent vers la quatrième semaine de développement. Elles sont composées d'épithélium de la crête génitale et de mésoderme intermédiaire et elles restent indifférenciées jusqu'à la septième semaine de développement environ. Durant ce temps, l'épithélium de la crête génitale prolifère et se mêle au mésenchyme conjonctif lâche pour former les cordons sexuels. Les cellules germinales, qui migrent du sac vitellin vers les gonades lors de la sixième semaine du développement seront entourées des cordons

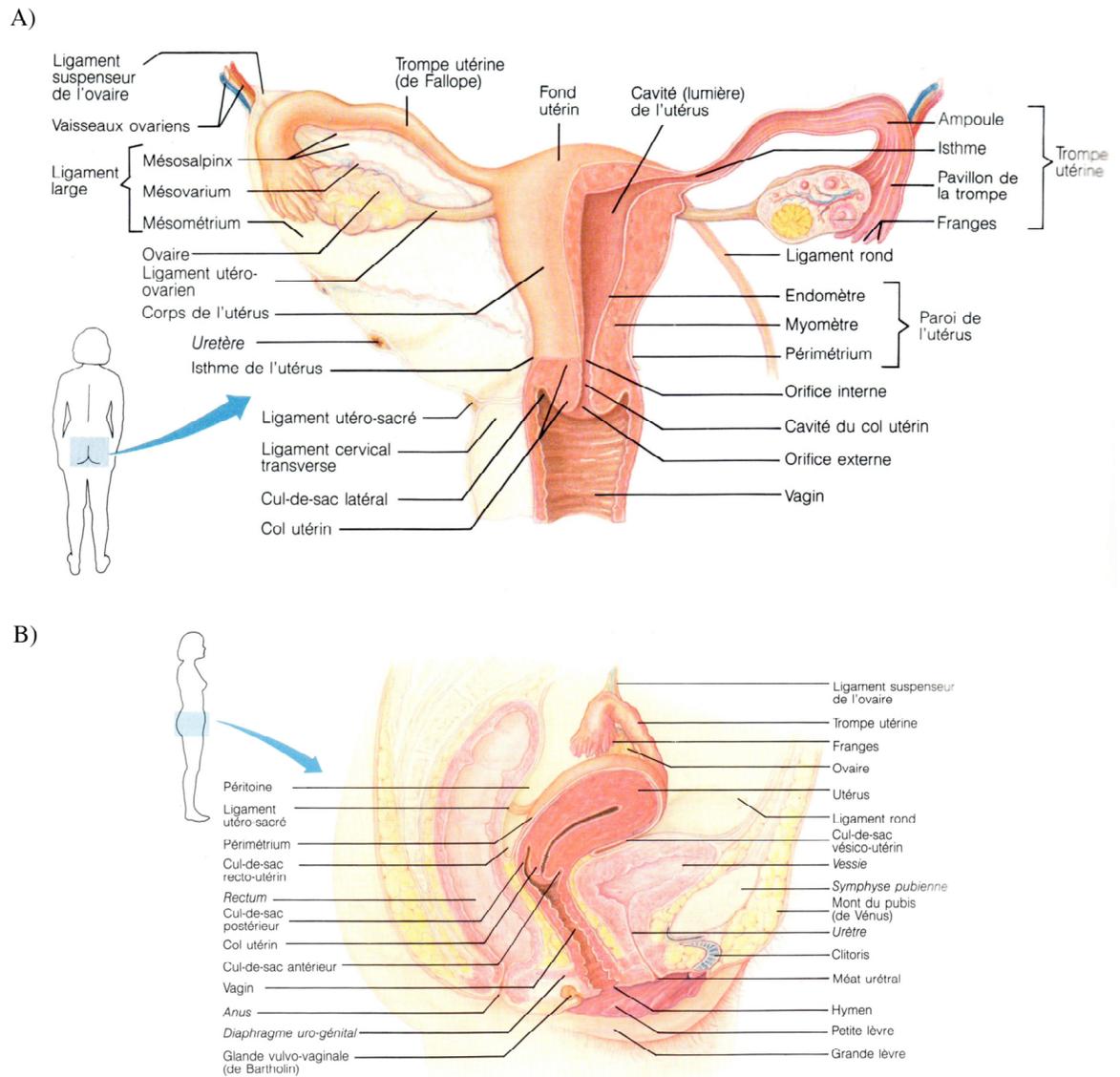
sexuels [1]. Au cours de la sixième semaine, un replis de l'épithélium coelomique (qui tapissent l'intérieur de la cavité embryonnaire) forme les conduits paramésonephriques, ou de Müller, dans tous les embryons. Ces conduits sont reliés sur leur longueur aux conduits mésonephriques, et l'extrémité caudale se connecte à l'urètre pelvien. Les extrémités des deux canaux paramésonephriques se joignent l'une à l'autre où elles adhèrent à l'urètre. Ces extrémités ouvertes ont la forme d'entonnoirs et débouchent dans le coelome [2]. Ces étapes mettent fin au stade bipotentiel, et c'est par la suite que les développements mâle ou femelle suivent des voies divergentes.

C'est par la présence ou l'absence du chromosome Y, et plus particulièrement du gène de la région de la détermination sexuelle du chromosome Y (SRY; *sex determining region of the chromosome Y*), que le destin de la gonade est établi. Si ce gène est présent, son produit favorisera la synthèse et la sécrétion de l'hormone anti-mullérienne (AMH), qui inhibera le développement des canaux de Müller. La gonade se développera donc en testicule [3]. Si, au contraire, SRY est absent, les cordons sexuels de la zone médullaire se désagrègent et le phénotype féminin prend place [4]. L'absence de l'AMH permet aux canaux de Müller de se développer, pour donner naissance aux trompes de Fallope, à l'utérus et à la partie supérieure du vagin [1]. Au cours du quatrième mois du développement, les cordons corticaux (cordons sexuels secondaires) se désorganisent et forment des amas de cellules isolées. Les cellules germinales primordiales, qui s'entourent de cellules épithéliales, se différencient en ovogonies [5]. Elles s'entourent ensuite d'une couche de cellules folliculaires, qui dérivent des cordons sexuels, et forment ainsi un follicule primordial. Les ovocytes exécutent une première division méiotique et deviennent des ovocytes de premier ordre. La méiose reste au stade de la prophase I jusqu'à la maturation de l'ovocyte, qui a lieu entre la puberté et la ménopause de la femme [6]. Ces étapes seront décrites plus en détail dans la section sur la physiologie de l'ovaire (section 1.1.4).

### 1.1.2 L'anatomie de l'ovaire

Les ovaires sont des organes paires d'aspect aplati, nodulaire et ovoïde chez l'adulte. Ils ont la forme et la taille d'amandes, mesurent entre trois et cinq centimètres et pèsent de deux à quatre grammes [6, 7]. Leur apparence varie selon plusieurs facteurs, dont l'âge, le cycle menstruel et le nombre de grossesses [8]. Ils ont tendance à s'atrophier et à devenir lisses chez la femme ménopausée, mais leur surface est plutôt irrégulière et marquée par des sillons lorsqu'ils sont encore sous influence du cycle menstruel.

Ces organes sont situés dans la cavité péritonéale, accolés aux trompes de Fallope et de part et d'autre de l'utérus (Figure 1). Ils sont maintenus en place par différents ligaments : l'ovaire est fixé à l'utérus par le ligament large, le ligament propre relie l'ovaire à l'utérus et le ligament suspenseur l'ancre à la paroi pelvienne [6]. L'apport sanguin est assuré par les artères ovariennes et utérines alors que le réseau veineux dense draine les ovaires, qui sont aussi pourvus d'un riche réseau lymphatique [8].



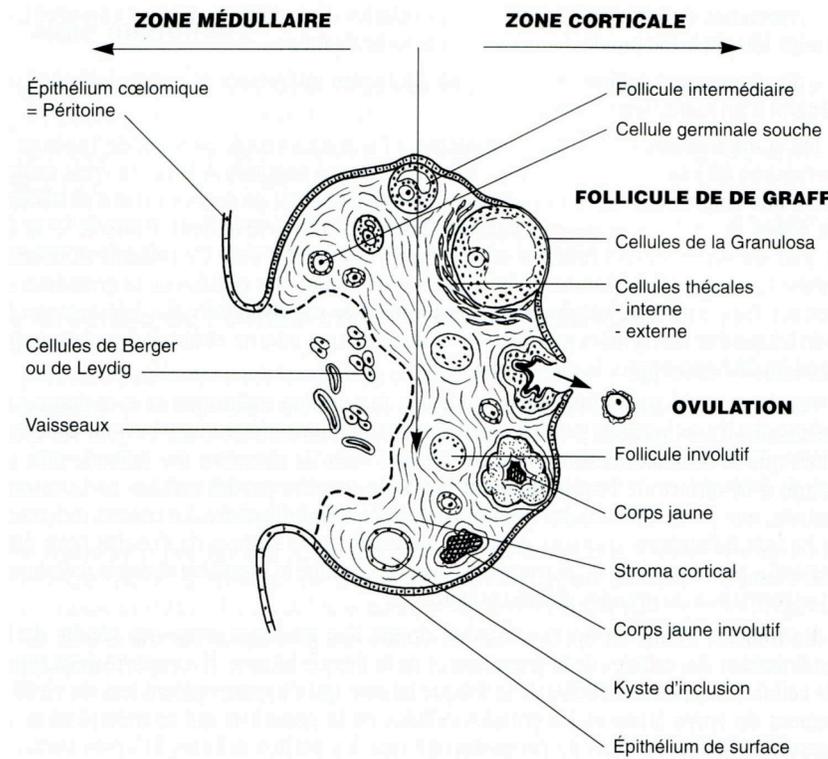
**Figure 1 Anatomie du système reproducteur de la femme (Tirée de [9])**

A) Coupe dorsale

B) Coupe sagittale

### 1.1.3 L'histologie de l'ovaire

L'ovaire normal comporte trois principales parties : l'épithélium de surface, la zone corticale, ou périphérique, et la zone médullaire, ou centrale (Figure 2).



**Figure 2 Histologie de l'ovaire normal (tirée de [8])**

L'ovaire est recouvert d'un épithélium de surface, l'OSE, autrefois nommé épithélium germinatif puisque les scientifiques pensaient à tort que ces cellules donnaient naissance aux cellules germinales. L'OSE est dérivé de l'épithélium coelomique et est composé d'une seule couche de cellules cuboïdes, faiblement rattachée à la membrane basale. Cet épithélium exprime les kératines 7, 8, 18 et 19, soit les kératines des épithéliums simples. Les cellules sont recouvertes de microvillosités, qui indiquent des fonctions de transport de molécules vers la cavité péritonéale. L'OSE participe aussi à la rupture et à la réparation de

la surface de l'ovaire, des processus qui ont lieu suite à l'ovulation. Il répond à la présence de diverses hormones, tels les oestrogènes, la progestérone et les gonadotrophines, grâce aux récepteurs qui y sont exprimés [10, 11]. La membrane basale sur laquelle repose l'OSE est composée de tissu conjonctif et sert de barrière entre l'épithélium et le stroma.

La tunique albuginée, dérivée du mésenchyme, se situe directement sous l'OSE. Cette capsule est composée de tissus conjonctif dense et fibreux, essentiellement du collagène, ce qui donne l'aspect blanchâtre à l'ovaire. C'est dans le stroma de la zone corticale, situé sous cette capsule, que se trouvent les follicules, à différents stades de maturation [11]. Les follicules, ou organites ovariens, sont individuellement entourés de cellules de la granulosa et de cellules de la thèque interne [12].

La dernière partie de l'ovaire est la zone médullaire. Elle est d'aspect spongieux et très vascularisée et se retrouve en continuité avec le mésovarium. Elle contient du tissu conjonctif lâche, des fibres élastiques et musculaires et des cellules de Berger, analogues aux cellules de Leydig du testicule et spécialisées dans la sécrétion de l'androgène.

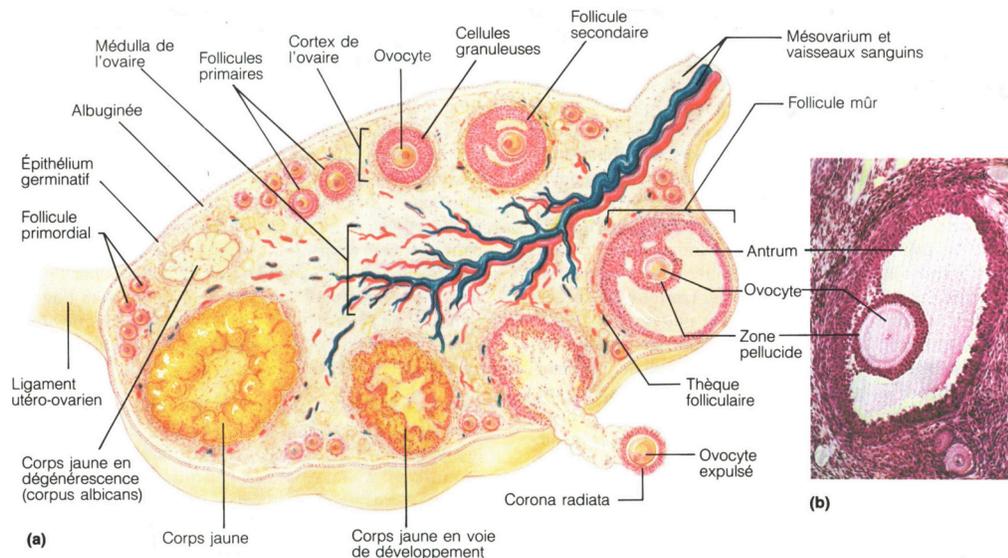
#### 1.1.4 La physiologie de l'ovaire

L'ovaire assure une double fonction chez la femme. Premièrement, il doit produire les gamètes femelles matures, les ovules ou ovocytes, capable d'être fertilisés et de développer un embryon. Ensuite, il est responsable de la synthèse d'hormones sexuelles stéroïdiennes, les oestrogènes et la progestérone.

C'est lors du stade embryonnaire que débute l'ovogenèse, alors que les ovogonies (cellules germinales primordiales) vont se multiplier par mitose dans le cortex ovarien. Vers les quatrième et cinquième mois de gestation, certaines de ces cellules augmentent de volume et deviennent des gamètes matures, alors nommées des ovocytes de premier ordre, qui exécutent la première étape de la division méiotique. C'est vers la naissance que ces cellules s'entourent d'une simple couche de cellules folliculaires, qui bloquent la méiose, et deviennent ainsi des follicules primordiaux. Ce n'est qu'entre la puberté et la ménopause

que la maturation des ovocytes et de leur follicule se complétera : le follicule devient primaire (ovocyte entouré de plusieurs couches de cellules de la granulosa), puis secondaire et tertiaire. À ce stade, les cellules de la granulosa forme une cavité, l'antra folliculaire, qui se remplit de liquide folliculaire et les cellules stromales entourant le follicule deviennent les cellules de la thèque. Lorsque l'ovocyte est mature, il est appelé follicule De Graaf (Figure 3). À chaque cycle ovarien, plus de 20 follicules primordiaux reprennent le processus de maturation mais généralement un seul d'entre eux, le follicule dominant, pourra arriver à maturation complète alors que les autres régresseront par atrophie [12].

La production des gamètes femelles est un processus long et coûteux pour l'ovaire : lors du développement, environ sept millions d'ovogonies sont contenues dans l'ovaire et plus de des deux tiers dégèneront par atrophie avant même d'atteindre le stade de follicule primordial. Des deux millions de follicules primordiaux, seulement 400 000 survivront jusqu'à la puberté et aussi peu que 400 atteindront le stade d'ovocyte de deuxième ordre, ayant la possibilité de se développer en un ovule fécondable [13].



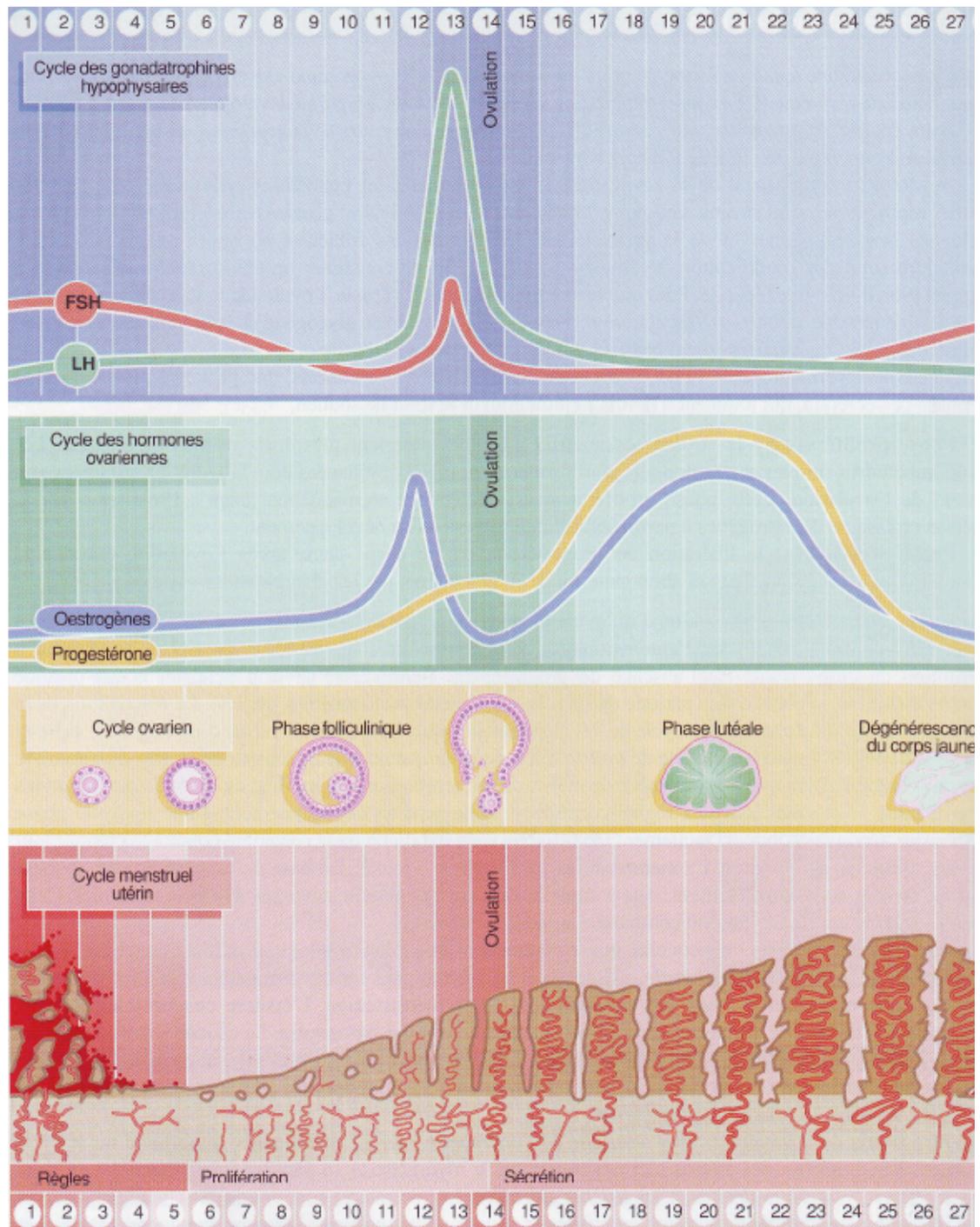
**Figure 3 Maturation du follicule au sein d'un ovaire normal (tirée de [9])**

A) Représentation de l'ovaire normal

B) Coupe histologique d'un follicule ovarien

La fonction de sécrétion d'hormones sexuelles par l'ovaire est étroitement reliée à la maturation des gamètes. Les hormones produites, l'œstrogène et la progestérone, ont pour fonction la régulation des cycles menstruels et ovariens afin de pouvoir synchroniser l'ovulation et la croissance des follicules. De plus, ces hormones préparent l'endomètre en prévision de l'implantation potentielle d'un embryon. Cinq hormones participent à cette régulation, qui suit l'axe hypothalamo-hypophysaire : la gonadolibérine (LHRH), l'hormone folliculostimulante (FSH), l'hormone lutéinisante (LH), les oestrogènes et la progestérone [6].

Lors de la phase folliculaire du cycle menstruel, l'adénohypophyse stimulée par la LHRH sécrète de faibles quantités de FSH et de LH. La LH stimule initialement les cellules de la thèque et la FSH les cellules du follicule. Le follicule grossissant crée une augmentation de la quantité d'œstrogènes, ce qui engendre une boucle de rétroactivation : les oestrogènes stimulent maintenant la sécrétion accrue de gonadotrophines (la FSH et la LH) en agissant sur l'hypothalamus qui produit plus de LHRH. Environ une journée après l'augmentation des niveaux de FSH et LH, le follicule De Graaf est amené à se rompre à la surface de l'ovaire pour libérer l'ovule. Après l'ovulation, la LH stimule la transformation en corps jaune des cellules de la thèque et de la granulosa restantes par le processus de lutéinisation, qui provoque l'accumulation de lipides dans le cytoplasme des cellules. Ce corps jaune sécrète à son tour un peu d'œstrogènes et beaucoup de progestérone, qui induisent un rétro-contrôle négatif sur l'adénohypophyse et l'hypothalamus en inhibant la sécrétion de FSH et de LH. La progestérone prépare l'endomètre pour l'implantation de l'embryon en cas de fécondation de l'ovule expulsé. Si cependant il n'y a pas de fécondation, le corps jaune dégénère, ce qui réduit fortement les quantités d'œstrogènes et de progestérone. L'adénohypophyse et l'hypothalamus peuvent ainsi à nouveau sécréter des quantités suffisantes de FSH pour amorcer un nouveau cycle ovarien (Figure 4) [9].



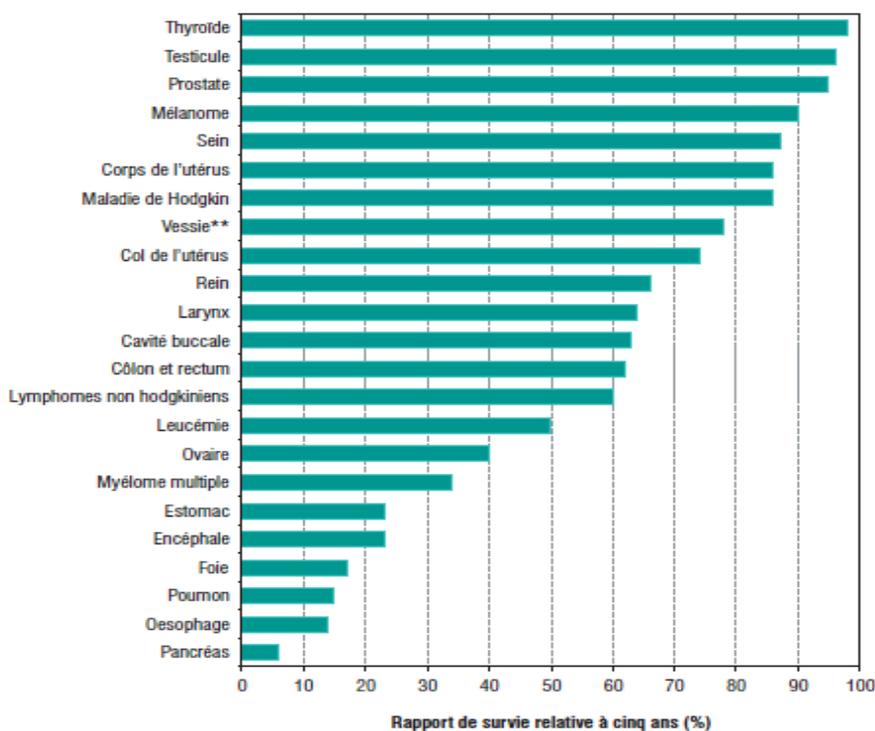
**Figure 4 Cycle reproducteur féminin** (tirée de [12])

## **1.2 Le cancer de l’ovaire**

De façon très simplifiée, le cancer peut être défini comme la prolifération incontrôlée des cellules au sein d’un tissu. Cette maladie apparaît suite à divers changements cellulaires, qu’ils soient génétiques ou épigénétiques, menant à l’émergence de certaines caractéristiques essentielles à la survie de cette tumeur naissante. Ces caractéristiques sont : l’évitement de l’apoptose, l’autosuffisance en facteurs de croissance, l’insensibilité aux signaux d’arrêt de croissance, l’envahissement des tissus et la capacité à métastaser, l’acquisition d’un potentiel de croissance infini et le soutien de l’angiogénèse [14]. Enfin, il est aussi reconnu que la tumeur doit pouvoir éviter la reconnaissance par le système immunitaire [15]. Toutefois, chaque cancer est différent de par son origine et sa progression. Les prochaines sections traiteront donc des aspects propres au cancer de l’ovaire, une pathologie très complexe.

### 1.2.1 L’épidémiologie du cancer de l’ovaire

Le cancer de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus létal des pays industrialisés. Il représente environ 4% des de cancer mondiaux et touche principalement les femmes du nord de l’Europe et du nord des Amériques, alors que l’incidence la plus basse est en Asie et en Afrique [16, 17]. Cette différence pourrait être partiellement expliquée par la plus faible espérance de vie des africaines, due à l’épidémie du Sida, ou par un nombre moins élevé de cas diagnostiqués.



**Figure 5** Survie relative à 5 ans (%) des cancers les plus fréquents pour les deux sexes combinés (tirée de [18]).

Au Canada pour l'année 2009, il a été estimé que le nombre total de nouveaux cas de cancer allait atteindre 171 000. 81 700 des personnes atteintes seront des femmes, dont 2 500 seront diagnostiquées pour le cancer de l'ovaire. Ceci représente donc 3,1% des nouveaux cas de cancer chez la femme, ce qui classe le cancer de l'ovaire au septième rang en incidence. Il est aussi la cinquième cause de décès par cancer, ce qui en fait le cancer gynécologique le plus meurtrier. Le taux de survie des patientes cinq ans après leur diagnostic est de seulement 40%, ce qui est très faible. En comparaison, la survie relative à cinq ans pour le cancer du sein est de 87% (Figure 5). Des 75 300 personnes à décéder du cancer en 2009, 35 700 seront des femmes, dont 1 750 (4,9%) étaient atteintes du cancer de l'ovaire. Toujours au Canada, le cancer de l'ovaire touche 1,4% des femmes, ce qui représente 1 femme sur 70,9, et emporte 1,1% des femmes (1 femme sur 87,0) [19]. Mondialement, le cancer de l'ovaire touche 11 femmes sur 100 000 [20].

## 1.2.2 L'étiologie et les facteurs de risque du cancer de l'ovaire

L'étiologie du cancer de l'ovaire est peu connue et même si quelques facteurs environnementaux ou comportementaux sont soupçonnés d'avoir une implication dans le développement de ce cancer, aucun de ceux-ci ne joue un rôle certain, mis à part les facteurs héréditaires. Les facteurs suspectés d'augmenter l'incidence du cancer de l'ovaire sont décrits dans cette section.

### 1.2.2.1 L'âge

L'âge médian des femmes développant un cancer de l'ovaire est de 65 ans et, à l'instar de la majorité des cancers qui touchent les adultes, le risque de développer cette maladie augmente avec l'âge. En effet, ce cancer touche davantage les femmes de 40 ans et plus, et le risque d'avoir un cancer de l'ovaire augmente pour toutes les tranches de 5 ans. Le taux maximum d'incidence est atteint vers 75 à 80 ans [20]. Les cas de cancer héréditaires font exception à cette tendance, car ils se développent en général beaucoup plus rapidement, donc chez les femmes plus jeunes.

### 1.2.2.2 L'alimentation

L'existence d'une corrélation entre le type d'alimentation et le risque de développer le cancer de l'ovaire a été suggérée par les différences entre les taux d'incidence et de mortalité de diverses régions du monde. Des études ont pu démontrer qu'il existe une corrélation positive entre l'apport en gras, en protéines et en calories totales et le développement du cancer de l'ovaire. Les aliments qui sont reliés à une plus forte incidence du cancer de l'ovaire sont la viande rouge, les gras saturés et l'amidon, alors que ceux qui en diminuent les risques sont le calcium, les huiles végétale et d'olive, les poissons, les pois, les lentilles et les aliments ayant une teneur élevée en calcium, lycopes ou carotène [20-22]. Il ne semble pas y avoir d'évidences qu'une alimentation riche en fruits et légumes soit associée à un risque plus ou moins élevé de développer le cancer de l'ovaire, puisque

certaines études ont montré que l'apport de fruits et de légumes dans l'alimentation pouvait protéger contre ce cancer, alors que d'autres recherches ont plutôt montré le contraire [23].

### 1.2.2.3 Les habitudes de vie

Les problèmes de poids touchent de plus en plus de gens dans les pays industrialisés. En 2003, 46,5% des canadiens avaient un surplus de poids alors que 14,3% étaient obèses [24]. En 2006, c'était 18,0% des canadiens qui étaient obèses [25]. Des études épidémiologiques ont associé ces problèmes de poids à un risque plus élevé de développer plusieurs cancers. Notamment, le surplus de poids et l'obésité augmenteraient de 1,2 et 1,3 fois respectivement les risques d'avoir le cancer de l'ovaire. Ceci est expliqué par le fait que les tissus adipeux, qui expriment les enzymes métabolisant les hormones stéroïdiennes, deviennent la principale source d'oestradiols après la ménopause. Le taux élevé d'oestradiols, qui favorise la prolifération et diminue l'apoptose des cellules épithéliales de l'ovaire, peut mener au développement du cancer de l'ovaire [26, 27]. Ainsi, de bonnes habitudes de vie, telles une alimentation saine et la pratique d'activités physiques régulière seraient protecteurs. La corrélation entre la pratique d'activités physiques et la diminution de l'incidence des cancers de l'ovaire n'est cependant pas significative [21].

Depuis longtemps, des recherches sont menées afin de savoir si la cigarette pourrait augmenter les risques de développer le cancer de l'ovaire. Plusieurs études ont d'abord montré une corrélation positive, négative ou même nulle. Récemment, les données de la *Nurses' Health Study* ont montré que les femmes qui fumaient, surtout si elles avaient commencé à fumer avant l'âge de 17 ans, avaient un risque augmenté de développer le cancer de l'ovaire [28]. De plus, les femmes qui fument la cigarette développent principalement des cancers de l'ovaire mucineux [29-31].

Enfin, la consommation d'alcool a aussi été associée à l'augmentation du risque de développement du cancer de l'ovaire, mais cette association est controversée et n'a pas été retrouvée dans toutes les études menées sur ce sujet [32].

#### 1.2.2.4 Les facteurs environnementaux et l'hypothèse de l'inflammation

Certains facteurs environnementaux semblent aussi être reliés au développement du cancer de l'ovaire, puisque le taux d'incidence de celui-ci varie entre les diverses régions du monde et les ethnies. Parmi ces facteurs, l'utilisation de talc dans la région péri-génitale, l'amiante, les polluants industriels et certains agents infectieux semblent tous augmenter les taux d'incidence du cancer de l'ovaire [33]. Chez les femmes en contact avec ces agents, une inflammation favoriserait le développement du cancer de l'ovaire. Les preuves appuyant cette théorie proviennent d'observations où les femmes ayant subi une ligature des trompes de Fallope ou une hystérectomie montrent un taux d'incidence réduit du cancer de l'ovaire [32-34]. Ces interventions pourraient protéger des agents infectieux en les empêchant d'atteindre les ovaires [35]. La réaction inflammatoire qui survient produit un stress oxydatif dans les cellules, causant ainsi des dommages potentiels à l'ADN, ce qui est susceptible d'induire le développement de tumeurs [36].

#### 1.2.2.5 L'hypothèse de l'ovulation

La théorie selon laquelle l'ovulation incessante joue un rôle important dans la carcinogenèse ovarienne a été émise par Fathalla en 1971. Cette hypothèse stipule qu'à chaque cycle d'ovulation, le processus de réparation tissulaire, qui est enclenché dans l'ovaire afin de cicatrifier et de réparer les dommages causés lors de la rupture de l'organe, peut mener à certaines aberrations génétiques, et ainsi promouvoir le développement d'une tumeur [37]. Plusieurs observations supportent cette théorie. En effet, une ménarche précoce, la nulliparité, une ménopause tardive, l'infertilité et la prise d'hormones à la ménopause augmentent les risques de développer un cancer de l'ovaire, alors que la prise d'anovulant, les grossesses multiples et l'allaitement diminuent ces risques [38, 39]. L'anovulant diminue le risque du cancer de l'ovaire de 7% pour chaque année d'utilisation, alors que chaque mois de gestation et d'allaitement diminue ce risque de 2,6% et 2,4% respectivement [40, 41]. De plus, le cancer de l'ovaire est une maladie rare chez les mammifères autres que l'humain, qui est aussi l'une des espèces où le nombre de cycles d'ovulation est le plus élevé. Plusieurs animaux n'ovulent qu'en période d'accouplement ou

en présence d'un mâle, et ces animaux ne développent que rarement le cancer de l'ovaire. Cependant, ces tumeurs existent chez la poule, où l'ovulation est continue. Enfin, une surproduction d'œufs chez la poule mène à l'augmentation du risque de carcinogenèse ovarienne [37, 42].

#### 1.2.2.6 L'hypothèse des gonadotrophines

L'hypothèse des gonadotrophines est la première théorie qui propose un rôle des hormones sexuelles dans le développement de la carcinogenèse ovarienne. Une stimulation excessive par les gonadotrophines, telles l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), augmente le niveau de production d'oestrogènes, qui stimulent à leur tour la prolifération cellulaire de l'OSE normal, ce qui pourrait ainsi mener au développement tumoral [11, 43]. Plusieurs observations supportent cette hypothèse, entre autres le fait que les grossesses et les contraceptifs oraux, qui diminuent la quantité de gonadotrophines circulantes, protègent contre le cancer de l'ovaire. De plus, c'est vers la ménopause et après la ménopause que les taux de gonadotrophines sont les plus élevés chez la femme, ce qui concorde avec la population la plus à risque de développer un cancer de l'ovaire. En effet, 85-90% de ces tumeurs surviennent chez les femmes ménopausées. [44]. L'une des preuves les plus directes qui appuie l'hypothèse des gonadotrophines est l'augmentation de l'incidence du cancer de l'ovaire associée aux traitements de fertilisation *in vitro* utilisés chez les femmes infertiles. Lors de ces traitements, l'ovaire est directement exposé à des niveaux supraphysiologiques de gonadotrophines afin de stimuler l'ovulation, et les femmes ayant reçu ces traitements ont 2.5 fois plus de chances d'être atteintes d'un cancer de l'ovaire [33]. Cependant, cette théorie ne peut expliquer certaines observations, notamment le fait que l'allaitement, qui augmente les taux de gonadotrophines circulantes, diminue les risques de cancer de l'ovaire. Enfin, certaines femmes ayant des taux anormalement bas de gonadotrophines sont plus sujettes à développer des cancers de l'ovaire [38].

### 1.2.2.7 Les facteurs génétiques

Environ 5-10% des cas de cancer de l'ovaire peuvent être expliqués par une prédisposition génétique. Il existe trois patrons de prédispositions, soit les cancers site-spécifiques à l'ovaire, les cancers ovaire-sein et le syndrome de Lynch ou HNPCC (*Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*).

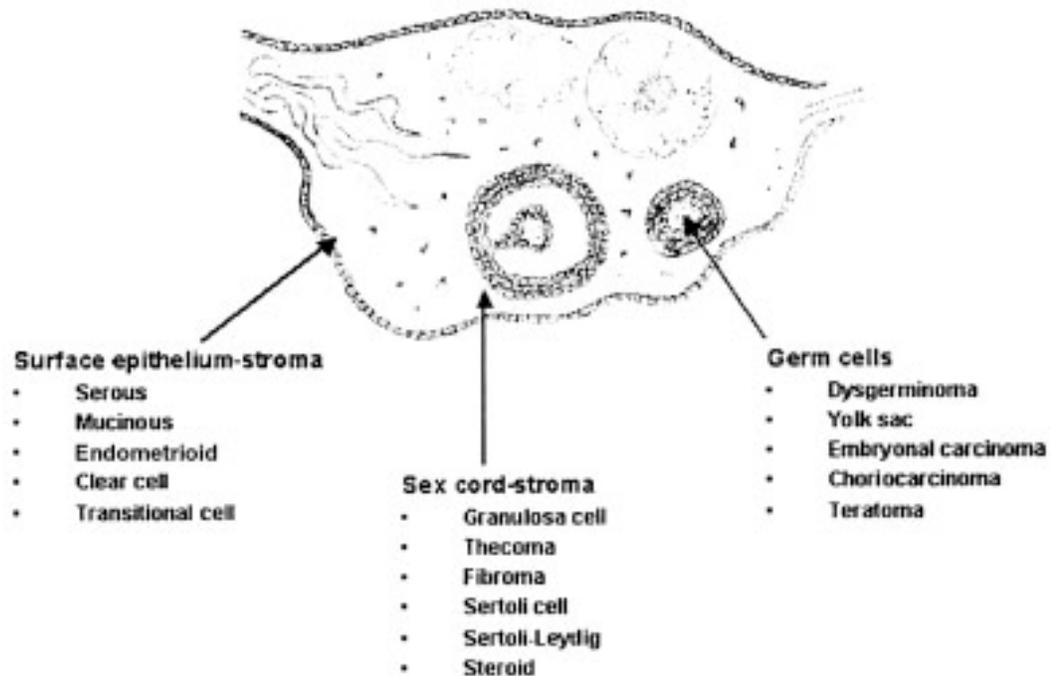
Les cancers site-spécifiques de l'ovaire représentent 10-15% des cas d'origine génétique. Les risques de développer le cancer de l'ovaire avant l'âge de 70 ans sont de 5-7% si un parent direct (mère, sœur ou fille) est affecté par la maladie, et ces risques augmentent à 7-15% si deux parents du premier degré ou plus sont atteints. La plupart de ces cas peuvent être attribués à des mutations dans le gène BRCA1 [20].

Les syndromes de cancer ovaire-sein sont caractérisés par au moins deux cas de cancers dans des générations successives, l'apparition du cancer à un âge précoce (généralement avant la ménopause) et par une transmission maternelle et paternelle. La majorité des cas, soit 81%, sont attribués à des mutations du gène BRCA1, et dans de rares cas au gène BRCA2. Ces gènes sont responsables du maintien de l'intégrité du génome par le signalement de dommages à l'ADN, principalement de cassures double brin. Les femmes atteintes de ce syndrome ont 15 à 60% plus de risques de développer un cancer de l'ovaire au cours de leur vie [20].

Enfin, le syndrome de Lynch, aussi associé aux cancers colorectaux et aux cancers de l'endomètre, augmente les risques d'avoir le cancer de l'ovaire à 12 % si au moins trois parents du premier degré ont développé ces cancers. Ce syndrome est associé à des mutations de l'un des quatre gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (*DNA mismatch repair genes*), soit MSH2, MLH1, PMS1 ou PMS2 [20].

### 1.2.3 Les différentes tumeurs de l'ovaire

Les tumeurs de l'ovaire se divisent en trois catégories, selon le type de cellules parentales desquelles elles dérivent. Elles peuvent être d'origine stromale, ou des cordons sexuels, germinale ou épithéliale (Figure 6) [7].



**Figure 6 Représentation de l'origine des trois principales classes de tumeurs ovariennes (tirée de [7])**

#### 1.2.3.1 Les tumeurs stromales ou des cordons sexuels

Les tumeurs stromales, ou des cordons sexuels, sont des tumeurs de l'ovaire qui ont pour origine les cellules de la thèque, les cellules de la granulosa, d'autres cellules stromales ou encore les cellules de Sertoli ou de Leydig, normalement retrouvées dans le testicule de l'homme adulte. Ces tumeurs comptent pour environ 8% des tumeurs de l'ovaire et 7% des tumeurs malignes de l'ovaire [7]. Les tumeurs dérivant des cellules de la

granulosa sont les plus communes et comptent pour 70% des tumeurs stromales. Elles sont aussi les plus potentiellement malignes [45].

#### 1.2.3.2 Les tumeurs germinales

Les tumeurs germinales représentent 20-25% des néoplasmes de l'ovaire, mais seuls 3-5% de ces tumeurs sont malignes, ce qui représente 1-2% des cancers de l'ovaire. Ces tumeurs, rares et agressives, sont généralement bien traitées à tout stade de la maladie [46]. Plus de la moitié des tumeurs qui se développent chez les fillettes dérivent des cellules germinales, où un tiers des tumeurs sont malignes, alors qu'à l'âge adulte, ces néoplasmes sont plutôt rares et bénins [7].

#### 1.2.3.3 Les tumeurs épithéliales de l'ovaire

Les tumeurs épithéliales représentent environ 60% des tumeurs de l'ovaire et 90% des tumeurs malignes de l'ovaire [7]. Puisque mon projet de recherche porte sur les tumeurs épithéliales de l'ovaire, les prochaines sections détailleront plus précisément ces tumeurs.

### **1.3 Le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO)**

#### 1.3.1 Classification des tumeurs de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)

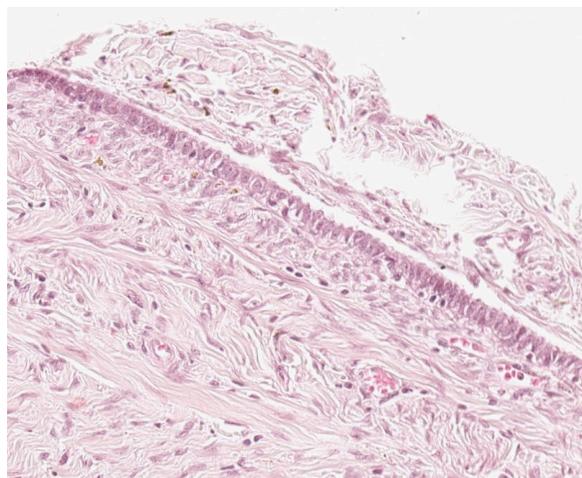
Le cancer de l'ovaire est une maladie très complexe. Afin de mieux la comprendre et la caractériser, la FIGO a établi une classification des tumeurs selon différents critères, dont la classe de la tumeur, le type histopathologique, le grade de différenciation et le stade de la maladie.

### 1.3.1.1 Les classes tumorales

Les tumeurs de l’ovaire peuvent se diviser en trois classes, soit les tumeurs bénignes (BOV), les tumeurs à faible potentiel de malignité ou borderlines (LMP) et les tumeurs invasives (TOV). Les tumeurs les plus fréquentes sont les tumeurs bénignes, qui représentent 50% des diagnostics, suivi des tumeurs invasives, qui comptent pour environ 33% des cas. Enfin, les tumeurs à faible potentiel de malignité sont diagnostiquées dans 17% des cas [47].

#### 1.3.1.1.1 Les tumeurs bénignes (BOV)

Les tumeurs bénignes de l’ovaire se présentent sans stratifications et sans atypies cellulaires (Figure 7). Elles sont majoritairement retrouvées sous formes de kystes et sont inoffensives, la survie des patientes n’étant pas affectée par ces tumeurs. Les BOV sont plus souvent diagnostiquées chez les jeunes femmes, âgées entre 20 et 60 ans. En théorie, le seul risque de complication peut survenir lors de la résection de la tumeur, où des cellules malignes, précédemment mal diagnostiquées, pourraient se disséminer dans la cavité péritonéale [47]. En pratique, risques de complication relèvent plutôt des risques opératoires et de co-morbidités connues des patientes.



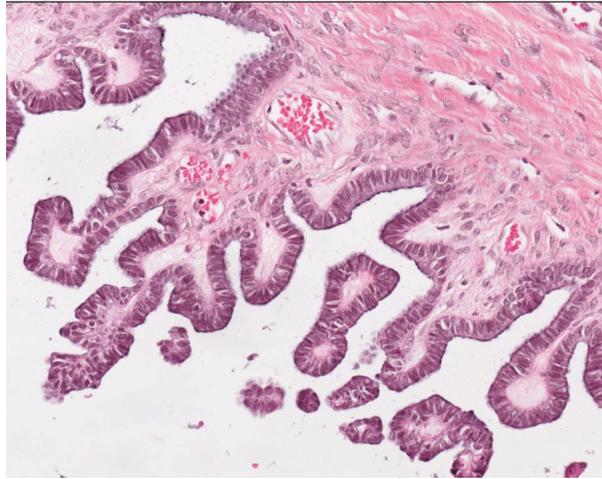
**Figure 7 Coupe histologique d’une tumeur bénigne**

### *1.3.1.1.2 Les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP)*

Cette classe de tumeurs, désignées borderlines parce qu'à la limite de la malignité, a été reconnue par la FIGO en 1971, puis en 1973 par l'Organisation Mondiale de la Santé. Ces tumeurs démontrent certaines caractéristiques des tumeurs invasives, mais présentent aussi certains traits des tumeurs bénignes. Ainsi, les tumeurs borderlines ont un plus grand taux de prolifération que les tumeurs bénignes, mais ne présentent pas de destruction du stroma (invasion stromale) comme les tumeurs invasives [48]. Elles sont bilatérales dans une proportion de 26-50%, un taux qui se situe entre ceux des classes bénignes et malignes, et leur prolifération stratifiée (3-4 couches de cellules) est moins importante que pour les tumeurs invasives (Figure 8). À l'instar des tumeurs invasives, les tumeurs borderlines sont souvent diagnostiquées chez des femmes assez jeunes (la moyenne du diagnostic d'une tumeur séreuse à faible potentiel de malignité étant de 38 ans). Cependant, il y a peu d'atypies cellulaires, l'index mitotique est relativement faible et le pronostic est considérablement meilleur que pour les tumeurs invasives, soit une survie à cinq ans de 90-95% pour les tumeurs séreuses borderlines. Enfin, 7-15% des tumeurs à faible potentiel de malignité récidivent et ces tumeurs sont habituellement associées à un index mitotique élevé, à l'aneuploïdie et à la présence de microinvasion [49]. Les microinvasions sont des foyers d'invasion de cellules épithéliales dans le stroma ovarien. Ces foyers ont au plus 3 mm dans la plus grande dimension et sont retrouvés dans 10-13% des tumeurs séreuses borderlines [50, 51].

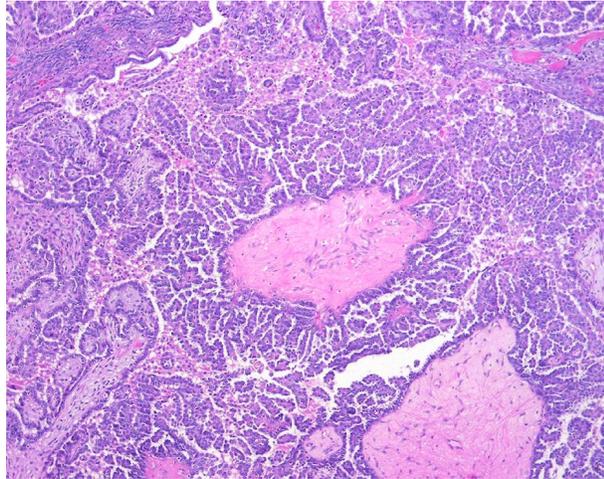
Les tumeurs à faible potentiel de malignité ne présentent pas de métastases. Lorsque des tumeurs extra-ovariennes sont présentes, elles sont plutôt qualifiées d'implants péritonéaux. Bien que certains groupes considèrent que les implants péritonéaux représentent des métastases, d'autres chercheurs pensent plutôt que ces implants se développent par une origine indépendante. Les implants peuvent être classés invasifs, ce qui représente 22% des cas, ou non invasifs. Les implants péritonéaux non invasifs associés aux tumeurs borderlines séreuses n'ont pratiquement pas d'impact sur la survie des patientes, alors que, dans 50% des implants péritonéaux invasifs, il y aura récurrence de la maladie et la survie à

10 ans chute à 33% [50, 52]. Les implants péritonéaux sont retrouvés dans 20-46% des cas de tumeurs séreuses à faible potentiel de malignité, mais leur origine, qui pourrait être dérivée des tumeurs borderlines ou indépendante de celles-ci, reste controversée [51].



**Figure 8 Coupe histologique d'une tumeur à faible potentiel de malignité**

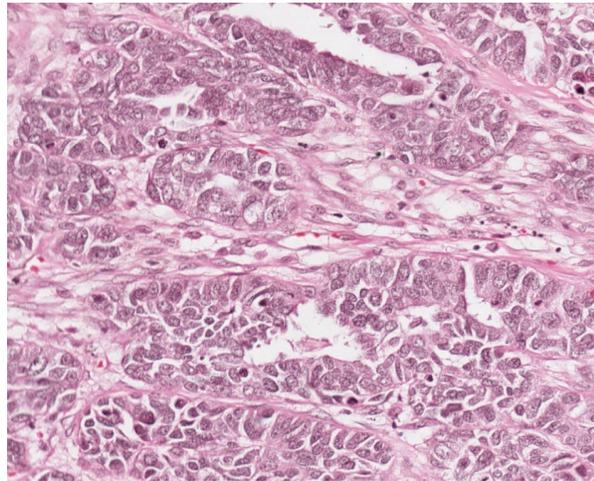
En 1996, un nouveau groupe de tumeurs, représentant 5-12% des tumeurs séreuses à faible potentiel de malignité, a été décrit. Ces tumeurs, nommées carcinomes micropapillaires séreux (MPSC) affectent généralement les femmes plus jeunes que celles touchées par les tumeurs borderlines typiques. Histologiquement, les MPSC s'organisent de façon non hiérarchique, c'est-à-dire que contrairement aux tumeurs typiques qui forment une papille mince à la base se terminant par un bourgeon épithélial, les papilles des MPSC ont la même largeur sur toute leur longueur (Figure 9). Elles sont aussi cinq fois plus longues que larges. Lorsque ces caractéristiques sont retrouvées sur au moins cinq millimètres, la tumeur est désignée MPSC. Ces tumeurs sont souvent bilatérales et la survie à long terme est plus faible que pour les patientes atteintes de tumeurs borderlines typiques. Ceci peut partiellement être attribué au fait que les MPSC sont plus souvent associés à des stades avancés de la maladie et qu'ils sont souvent diagnostiqués avec des implants péritonéaux invasifs [50].



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

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

La troisième et dernière classe de tumeurs définies par la FIGO est celle des tumeurs invasives de l'ovaire. Ces tumeurs présentent une prolifération avec atypies cellulaires, une architecture stratifiée et un indice mitotique élevé. La caractéristique qui distingue le plus les TOVs des tumeurs à faible potentiel de malignité est la présence d'une invasion destructrice du stroma ovarien (Figure 10). Ces tumeurs solides montrent souvent des zones de nécrose, d'hémorragie et d'inflammation. Elles ne sont que très rarement diagnostiquées chez les femmes âgées de moins de 40 ans et sont souvent détectées à un stade avancé de la maladie (stade III ou IV). Enfin, moins de 30% des femmes atteintes d'une tumeur invasive survivront cinq ans après le diagnostic de cette maladie létale [50].



**Figure 10 Coupe histologique d'une tumeur invasive**

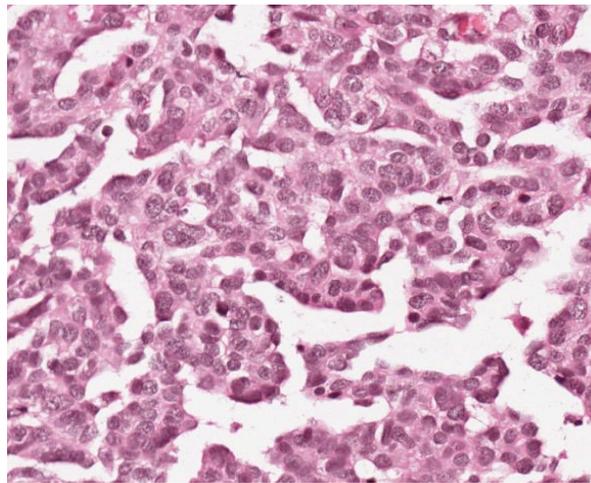
#### 1.3.1.2 Les types histopathologiques

La vaste majorité des tumeurs de l'ovaire dérivent de l'épithélium multipotent qui recouvre la surface des ovaires. Lors de la transformation, cet épithélium peut donner naissance à différents types histologiques, qui permettent de classifier les tumeurs qui en dérivent.

##### 1.3.1.2.1 *Les tumeurs séreuses*

Les tumeurs séreuses représentent le type histopathologique le plus communément retrouvé dans les pays industrialisés de l'Ouest, comptant pour 40-60% de toutes les tumeurs de l'ovaire. Les cellules de ces tumeurs ont l'apparence des cellules recouvrant la paroi interne des trompes de Fallope (figure 11) [53]. Environ 70% de ces tumeurs sont bénignes, et peuvent alors être traitées par chirurgie, et 20% des tumeurs bénignes sont bilatérales. Les tumeurs séreuses peuvent aussi être borderlines, ce qui survient dans 10-15% des cas. La survie à cinq ans des femmes atteintes de ces tumeurs est de 70-95% et une récurrence peut survenir dans les 20-50 ans suivant le diagnostic. Ces

tumeurs sont bilatérales dans 30% des cas environ. Enfin, dans 20% des cas, les tumeurs séreuses sont invasives. Elles représentent 50% des carcinomes de l'ovaire et les deux tiers de ces tumeurs sont bilatérales. Elles sont traitées par chirurgie et chimiothérapie, puisque la plupart de ces tumeurs sont déjà disséminées lors du diagnostic. La survie à cinq ans est de 76% pour les tumeurs de stade I, de 56% pour un stade II, 25% pour les carcinomes de stade III et chute à 9% pour les tumeurs de stade IV [7].

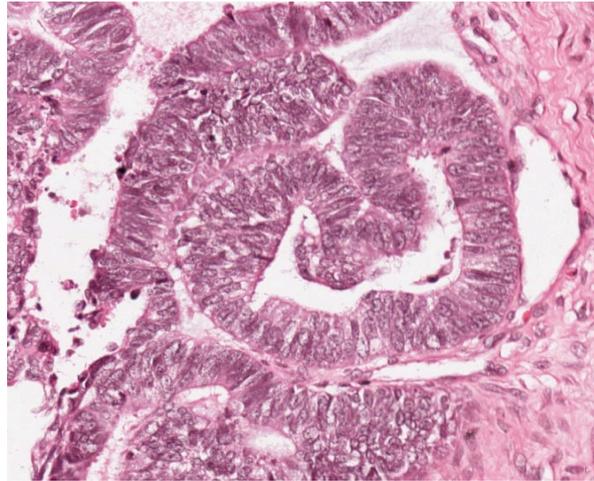


**Figure 11 Coupe histologique d'une tumeur séreuse**

#### *1.3.1.2.2 Les tumeurs endométrioïdes*

Les tumeurs endométrioïdes sont nommées ainsi en raison de leur ressemblance avec les cellules de la paroi de l'utérus, plus précisément celles de l'endomètre (Figure 12). Les tumeurs bénignes sont plutôt rares, mais lorsqu'elles surviennent, elles sont majoritairement kystiques et unilatérales. Les tumeurs à faible potentiel de malignité représentent environ 20% des tumeurs endométrioïdes et sont traitées par chirurgie. Leur pronostic est excellent. Les carcinomes endométrioïdes représentent le deuxième histotype le plus commun, après les séreux, et 80% des tumeurs endométrioïdes, soit 10-25% des carcinomes de l'ovaire. 13-28% de ces tumeurs sont bilatérales et leur pronostic est

meilleur que pour les tumeurs séreuses ou mucineuses [7]. Les carcinomes endométrioides sont fréquemment diagnostiqués à un stade I ou II et représentent environ 50% des tumeurs invasives de stade I [53].

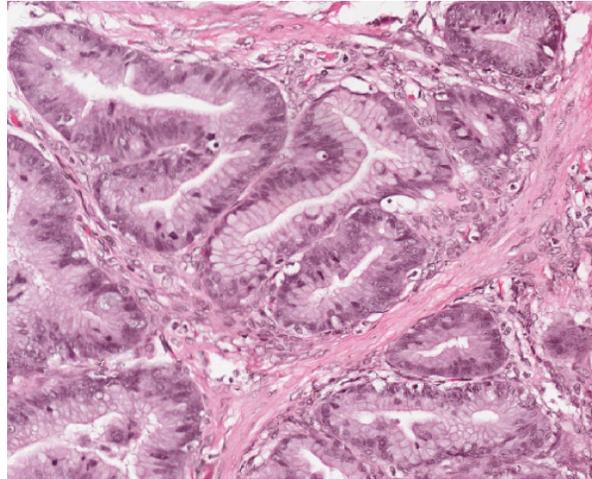


**Figure 12 Coupe histologique d'une tumeur endométriode**

#### *1.3.1.2.3 Les tumeurs mucineuses*

Les tumeurs mucineuses sont caractérisées par une forte production de mucine et ressemblent aux cellules endocervicales, mais aussi aux cellules de l'épithélium intestinal (Figure 13). Ces tumeurs comptent pour environ 10% des tumeurs de l'ovaire. Les tumeurs mucineuses bénignes représentent le quart des tumeurs de l'ovaire et 75-85% des tumeurs mucineuses. Elles sont généralement unilatérales et la chirurgie est curative dans la majorité des cas. Les tumeurs à faible potentiel de malignité de type endocervical sont bilatérales dans 40% des cas, mais moins de 10% des tumeurs borderlines de type intestinal sont bilatérales. Ces tumeurs sont traitées par chirurgie et la récurrence est rare. La survie à cinq ans est de 51-92% pour les tumeurs borderlines. Les tumeurs invasives mucineuses sont rares et ne représentent que 3% des carcinomes de l'ovaire [53, 54]. La survie à cinq

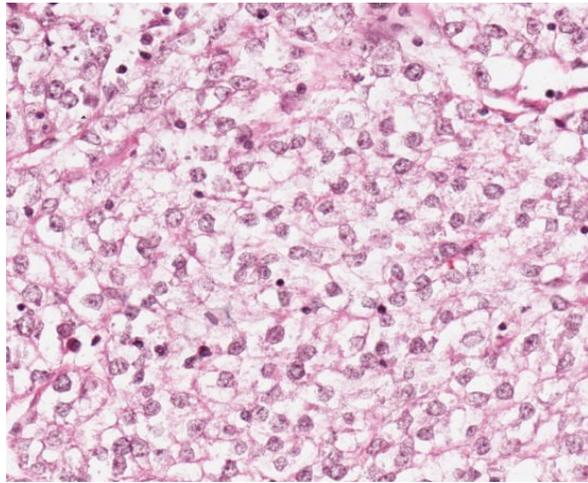
ans est comparable aux tumeurs séreuses, mais les tumeurs invasives mucineuses ne sont bilatérales que dans 6-20% des cas [7, 54].



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

#### *1.3.1.2.4 Les tumeurs à cellules claires*

Les tumeurs à cellules claires sont plus rares et ne représentent que 3% des tumeurs de l'ovaire. Les cellules de ces tumeurs sont polygonales et leur cytoplasme est riche en glycogène, en plus d'avoir des quantités variées de lipides (Figure 14) [55]. Les formes bénignes et borderlines sont plutôt rares et les tumeurs invasives représentent 4-5% des carcinomes ovariens. Environ 66% des femmes qui ont des tumeurs malignes à cellules claires sont nullipares et 50-70% présentent aussi de l'endométriase. 15-20% de ces carcinomes sont bilatéraux et 60% sont de stade I au diagnostic. Malgré ce fait, le pronostic des tumeurs à cellules claires est mauvais, et peut en partie être expliqué par le fait que c'est l'histotype le plus résistant à la chimiothérapie [56]. La survie à cinq ans est de 69% pour une tumeur de stade I, mais chute à 4% pour un stade IV [7].



**Figure 14 Coupe histologique d'une tumeur à cellules claires**

#### *1.3.1.2.5 Les autres types histopathologiques*

Certaines histopathologies sont retrouvées beaucoup plus rarement. C'est le cas pour les tumeurs dites transitionnelles ou de Brenner, dont les cellules ressemblent aux cellules de la paroi interne de la vessie et qui représentent environ 2% des tumeurs de l'ovaire. Ces tumeurs sont rarement malignes et rarement bilatérales. Les tumeurs malignes sont bilatérales à 10% et la majorité (70-100% des tumeurs de Brenner) sont diagnostiquées à un stade avancé. Le pronostic de ces tumeurs est assez bon [7].

Une tumeur peut aussi être de type mixte lorsqu'au moins deux histopathologies sont présentes à au moins 10% chacune. Cet histotype représente environ 3% des tumeurs de l'ovaire [53].

Enfin, dans environ 15% des cas de tumeurs épithéliales de l'ovaire, un diagnostic de tumeur indifférenciée est posé. Ce diagnostic est exclusif, c'est-à-dire que les cellules de la tumeur ne ressemblent à aucun autre type histopathologique, et cette catégorie de tumeurs regroupe des tumeurs très hétérogènes [53]. Ces tumeurs, qui présentent des cellules aux caractéristiques malignes, tel un indice mitotique élevé ou des atypies cellulaires, sont

bilatérales dans 50% des cas et se présentent à un stade III ou IV dans 75% des cas, ce qui en fait le groupe de tumeur ayant le pire pronostic de tous les histotypes [7, 56].

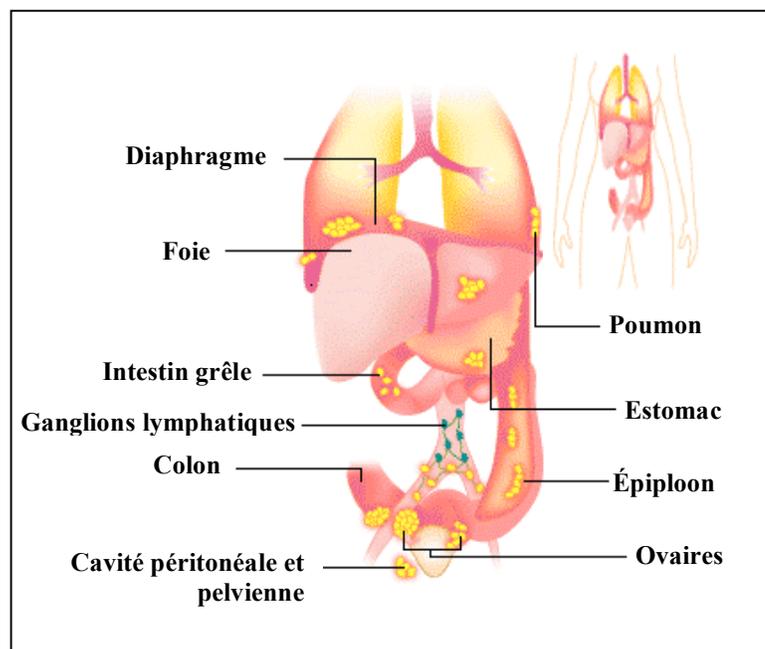
#### 1.3.1.3 Les grades de différenciation du CÉO (G0-G3)

Le grade (G) d'une tumeur est utilisé afin de représenter le degré de différenciation de celle-ci. Divers systèmes ont été utilisés par les pathologistes dans le passé afin de classer les tumeurs, mais les grades donnés à une tumeur avec ces classements manquaient de constance et de reproductibilité entre les différents observateurs. Le système actuellement utilisé pour classer les tumeurs selon leur grade a été établi par la FIGO et est une combinaison de trois différents critères dont le score est additionné: le score mitotique, qui varie de 0 à 3 selon le nombre de mitoses retrouvées par champs d'observation; le nombre d'atypies nucléaires, dont le score varie également de 0 à 3; et l'architecture histologique dominante. Ce dernier paramètre est noté : 1 pour une architecture glandulaire (moins de 5% de croissance solide), 2 pour une architecture papillaire (de 5% à 50% de croissance solide) et 3 lorsque l'architecture est solide (plus de 50% de croissance solide). Un score total de 1 à 5 correspond à un grade 1 (G1; tumeur bien différenciée), un score de 6 ou 7 équivaut à un grade 2 (G2; tumeur modérément différenciée) et un score de 8 ou 9 à un grade 3 (G3; tumeur pauvrement ou mal différenciée). Le grade 0 (G0) ou GB est utilisé afin de représenter les tumeurs à faible potentiel de malignité [20, 57].

#### 1.3.1.4 Les stades du CÉO (SI-SIV)

De façon générale, les tumeurs épithéliales de l'ovaire débutent par la prolifération de cellules dans les kystes d'inclusion, à l'intérieur du stroma. La tumeur croît ainsi pendant un certain temps, puis en grossissant, atteint la capsule de l'organe. Lorsque survient la rupture de cette capsule, les cellules tumorales émergent dans la cavité péritonéale et peuvent ensuite se disperser dans la cavité abdominale en suivant la circulation de liquide péritonéal. Les cellules atteindront d'abord la gouttière para-aortique droite et l'hémi-diaphragme droit, puis l'épiploon, qui recouvre les organes de la cavité

abdominale. Les autres organes recouverts de péritoine, situés à proximité, sont ensuite envahis par les cellules tumorales (Figure 15). La voie lymphatique peut également être empruntée par les cellules transformées; en envahissant les ganglions rétro-péritonéaux, pelviens et inguinaux, ces cellules tumorales peuvent se disséminer et atteindre plusieurs autres organes. Enfin, en utilisant la voie hématogène, les cellules tumorales peuvent atteindre les organes distants, tels les poumons, le foie et le cerveau. Cette propagation est surtout retrouvée dans les stades avancés de la maladie [58].



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

Le classement des tumeurs selon leur stade a été établi par la FIGO et représente l'étendue de la maladie. Quatre stades sont décrits, dont les trois premiers sont sous-divisés en trois sous-groupes (Tableau 1). Brièvement, une tumeur de stade I est une tumeur confinée aux ovaires. Au stade II, la tumeur envahit la cavité péritonéale et atteint des organes proximaux tels l'utérus et les trompes de Fallope. Lorsque la maladie est de stade III, elle

présente des métastases péritonéales et envahie les ganglions lymphatiques. Enfin, le stade IV représente un cancer plus avancé, où des métastases à distance (foie, poumons, cerveau) sont retrouvées [20].

Stade	Description et caractéristiques
I	Tumeur limitée aux ovaires (un ou les deux)
Ia	Tumeur limitée à un ovaire; pas d'ascite; pas de tumeur sur la surface externe; capsule intacte
Ib	Tumeur limitée aux deux ovaires; pas d'ascite, pas de tumeur sur la surface externe, capsule intacte
Ic	Tumeur de stade Ia ou Ib, mais avec tumeur sur la capsule d'un ovaire ou des deux; ou avec une capsule rompue; ou avec ascite présentant des cellules malignes ou lavements péritonéaux positifs
II	Tumeur sur un ovaire ou les deux avec extension pelvique
IIa	Extension et/ou métastase à l'utérus et/ou aux trompes de Fallope
IIb	Extension de la tumeur aux autres tissus pelviens.
IIc	Tumeur de stade IIa ou IIb, mais avec tumeur sur la surface d'un ou des deux ovaires; ou avec rupture d'une ou des deux capsules; ou avec ascite présentant des cellules malignes ou lavements péritonéaux positifs
III	Tumeur à un ovaire ou les deux avec implants péritonéaux à l'extérieur de la région pelvienne et/ou ganglions rétro-péritonéaux ou inguinaux positifs; métastases superficielles au foie; tumeur limitée à la région pelvienne proprement dite, mais avec présence d'implants sur l'épiploon et le petit intestin
IIIa	Métastases péritonéales microscopiques à l'extérieur de la région pelvienne
IIIb	Métastases péritonéales macroscopiques à l'extérieur de la région pelvienne de 2cm ou moins de diamètre
IIIc	Métastases péritonéales macroscopiques à l'extérieur de la région pelvienne de 2cm ou plus de diamètre et/ou présence de métastases aux ganglions régionaux
IV	Tumeur sur un ovaire ou les deux avec métastases à distance. Effusion pleurale avec présence de cellules tumorales et implication du mésenchyme dans les métastases au foie

**Tableau I** Stadification du cancer épithélial de l'ovaire (adaptée de [58])

La stadification de la maladie demande un examen complet décrit par la FIGO. L'évaluation comprend une inspection et une palpation des surfaces péritonéales, un lavage péritonéal, une hystérectomie totale (ablation de l'utérus), une salpingo-ovariectomie bilatérale (résection des ovaires et trompes de Fallope), une épiploectomie (ablation de l'épiploon), des biopsies péritonéales de toutes les lésions ou métastases suspectées ou une biopsie péritonéale aléatoire si des lésions macroscopiques ne sont pas visibles et l'examen des ganglions régionaux.. La prise d'une radiographie des poumons et du foie est aussi recommandée par la FIGO afin de déterminer la présence d'effusion pleurale et/ou de métastases hépatiques [20].

### 1.3.2 Les origines possible du CÉO

Plusieurs hypothèses tentent de définir l'origine du développement des cancers épithéliaux de l'ovaire. Ces tumeurs pourraient survenir suite à des changements de l'OSE, de ses kystes d'inclusion ou invaginations, des trompes de Fallope ou être la progression de tumeur bénigne ou à faible potentiel de malignité.

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

Environ 90% des tumeurs de l'ovaire sont des tumeurs épithéliales, ce qui supporte l'idée que l'épithélium de surface des ovaires, ou des kystes d'inclusion, est à l'origine des CÉOs. C'est d'ailleurs l'hypothèse la plus largement décrite pour expliquer le développement de ces cancers de l'ovaire. Au cours de leur transformation, les cellules épithéliales subissent plusieurs changements qui ont pour conséquences la perte de caractéristiques stromales et l'acquisition des spécificités de l'épithélium des canaux de Müller. Les canaux de Müller sont à l'origine du col de l'utérus, de l'endomètre et des trompes de Fallope, qui sont tous impliqués dans la classification des diverses histopathologies [20, 59].

Les structures papillaires caractéristiques des tumeurs de l'ovaire pourraient partiellement être expliquées par le fait que les cellules de l'OSE peuvent sécréter des facteurs de

croissance, des enzymes protéolytiques et des cytokines et qu'elles peuvent remodeler le cortex ovarien suite à l'ovulation. Lors de ce processus de réparation, les cellules épithéliales pourraient procéder à une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), mécanisme souvent décrit dans la progression tumorale. Les lésions malignes dérivent plus souvent des kystes d'inclusion et des invaginations de l'épithélium de surface que de l'OSE lui-même. Il se crée dans les inclusions et les invaginations des microenvironnements, où des protéines telles la CA125 et la E-cadhérine sont exprimés, pouvant favoriser le développement néoplasique [20, 59, 60].

#### 1.3.2.2 Les trompes de Fallope

Certains groupes étudiant le rôle des trompes de Fallope dans le développement des cancers de l'ovaire ont montré que, particulièrement lorsque des mutations du gène BRCA1 sont présentes, la plupart des cancers de l'ovaire étaient accompagnées de lésions précancéreuses dans les trompes de Fallope. Ces études ont été réalisées sur des organes retirés par chirurgie prophylactique (chirurgie de prévention), ce qui permet d'étudier la maladie à un stade beaucoup moins avancé que lorsque qu'une tumeur de l'ovaire est diagnostiquée. La frange, le site sur les trompes de Fallope à proximité des ovaires, serait le lieu d'initiation des tumeurs [61-63]. Cependant, cette hypothèse reste controversée et n'explique pas la majorité des tumeurs de l'ovaire. Plusieurs études devront encore être menées afin de vérifier cette théorie.

#### 1.3.2.3 L'hypothèse d'un continuum dans le développement du CÉO

La dernière hypothèse tentant d'expliquer l'origine du développement des CÉOs discutée ici est celle d'un continuum BOV, LMP et TOV. Cette hypothèse reste très controversée; certains groupes pensent que les tumeurs malignes dérivent des tumeurs bénignes puis borderlines suivant un continuum, alors que d'autres pensent que ces trois classes de tumeurs sont indépendantes et se développent par des voies distinctes.

Certaines évidences portent à croire que les tumeurs malignes dériveraient des tumeurs bénignes. Par exemple, le nombre de cas de TOV augmente avec l'âge, contrairement aux BOV et LMP du même histotype, dont la moyenne d'âge au diagnostic est inférieure. De plus, une femme ayant un membre de sa famille du premier ou second degré atteint d'une tumeur maligne de l'ovaire a des risques cinq fois plus élevés de développer une tumeur bénigne. Cependant, il faut prendre en considération le fait que ces femmes sont suivies de plus près; les chances de diagnostiquer une tumeur bénigne chez ces patientes sont donc augmentées. [64]. Enfin, il arrive que des portions de BOV, de LMP et de TOV soient retrouvées dans une même tumeur [65].

Pour les tumeurs séreuses, un modèle dualiste suggère que les tumeurs malignes de haut grade (G2-3) et de bas grade (G1) se développeraient selon des mécanismes différents. En effet, les tumeurs de haut grade se développeraient selon un mécanisme encore inconnu, alors que les tumeurs de bas grade se développeraient suite à des lésions bénignes, qui auraient progressées en LMP puis en carcinomes micropapillaires (MPSC). Les mutations des gènes KRAS et BRAF ne sont que rarement détectées dans des carcinomes invasifs séreux de haut grade (0-12%), alors qu'elles sont beaucoup plus présentes dans les tumeurs bénignes, borderlines et invasives de bas grade (30-50%) [61]. Les gènes p53, HER2 et AKT, quant à eux, sont mutés dans 50-80%, 20-67% et 12-30% des tumeurs de haut grade respectivement, alors qu'ils ne le sont que rarement dans les tumeurs borderlines et invasives de bas grade. Il en va de même pour les gènes BRCA1 et BRCA2 [66].

Les tumeurs de type mucineux, quant à elles, semblent plutôt démontrer une continuité dans leur développement. En effet, pour les trois classes de tumeurs, soit bénignes, à faible potentiel de malignité et invasives, le taux de mutations du gène KRAS a été étudié et semble être similaire, soit de 30-80% [61, 67].

### 1.3.3 Présentation clinique du CÉO

#### 1.3.3.1 Les symptômes

Le cancer épithélial de l'ovaire est une maladie sournoise et souvent qualifiée, avec bien-fondé, de tueur silencieux. Les stades précoces de la maladie sont largement asymptomatiques, ou trop banals et non spécifiques (constipation, miction fréquente, douleur à l'abdomen) pour être pris en compte par les patientes. Ce manque de manifestations fait en sorte que plus de 70% des cancers sont détectés à des stades avancés de la maladie (SIII-SIV). Les symptômes ressentis dans un stade avancé de la maladie sont fréquemment reliés à l'atteinte de l'intestin ou de l'épiploon et à la présence de l'ascite. Ils se traduisent par une distension abdominale, des constipations, une satiété rapide, l'anorexie, des nausées, le gonflement ou plus rarement par l'essoufflement [20, 68].

#### 1.3.3.2 Les techniques de dépistage et le diagnostic

Les tumeurs de bas stade sont associées à un excellent pronostic. La détection précoce des tumeurs de l'ovaire est donc l'aspect le plus important dans l'optique d'une réduction de la mortalité associée à cette maladie. Malheureusement, aucun programme de dépistage n'est applicable à l'ensemble de la population, puisque aucun marqueur ne s'est montré à la fois assez sensible et spécifique pour prédire la maladie [68]. Le marqueur le plus utilisé à ce jour dans la détection du cancer de l'ovaire est le CA125, une glycoprotéine de haut poids moléculaire. Ce marqueur est d'abord exprimé par les cellules épithéliales des canaux de Müller, lors du développement embryonnaire, puis il n'est normalement plus exprimé chez la femme adulte saine [11]. Cet antigène tumoral, qui semble protéger les cellules qui l'expriment des cellules immunitaires *natural killer* (NK), est généralement surexprimé dans un contexte tumoral ovarien [69, 70]. Une élévation significative du taux de CA125, soit au-dessus de 35 U/mL est observée chez 23-50% des patientes atteintes d'un CÉO de stade I et chez 90% des patientes présentant un CÉO de stade II [20, 71]. Il a aussi été démontré que le taux de CA125 est plus élevé chez les femmes atteintes d'un CÉO (82%) que chez les autres femmes [72]. Cependant, le CA125

manque de spécificité, puisque son expression varie aussi en fonction du cycle menstruel, de l'âge et peut aussi être augmentée chez la patiente atteinte d'une tumeur bénigne de l'ovaire ou d'autres pathologies, gynécologiques ou non, tels l'insuffisance hépatique ou rénale ou un cancer gastrique [71]. Ainsi, environ 6% des patientes présentant une tumeur bénigne de l'ovaire et 29% des patientes sans pathologie gynécologique montrent un taux sérique de CA125 élevé [20, 73]. En raison de ce manque de spécificité, le test du niveau de CA125 n'est utilisé que lorsqu'il y a des raisons de suspecter une tumeur de l'ovaire, qui pourrait être décelée lors d'un examen gynécologique. Les ultrasons sont utilisés parallèlement au CA125 afin de confirmer le diagnostic [68].

Si ces tests s'avèrent positifs, des examens plus poussés seront effectués, comprenant des radiographies des poumons afin de vérifier la présence de métastases. Une tomodensitométrie (*CT scan*) de l'abdomen et de la région pelvienne permet de confirmer la présence d'une tumeur et de vérifier son étendue. Pour vérifier la présence de tumeurs au niveau du vagin, de l'utérus, des trompes de Fallope ou des ovaires, une échographie transvaginale peut aussi être effectuée. Elle consiste à insérer une sonde dans le vagin de la femme et à vérifier la présence de zones sombres ou denses par ondes sonores [74]. Afin de prendre des échantillons de biopsie, la laparoscopie (examen de l'abdomen par une incision au niveau du nombril) et la laparotomie (incision dans l'abdomen) peuvent être réalisées. Enfin, une coloscopie peut être exécutée dans le but d'éliminer la possibilité d'un cancer primaire des intestins [74].

### 1.3.3.3 Les traitements

Lorsqu'une tumeur de l'ovaire est diagnostiquée chez une femme, les interventions pratiquées varient selon le stade et la classe de la tumeur dont elle est atteinte [56]. Elle subie généralement une chirurgie, qui peut ou non être accompagnée de traitements adjuvants de chimiothérapie et/ou de radiothérapie. Cependant, les traitements de radiothérapie sont plutôt rares dans le cas du cancer de l'ovaire. Leur utilisation reste

limitée, puisque les doses à administrer et le choix de l'administration ne sont pas encore bien définis [75].

Lorsque la présence d'une tumeur bénigne est suspectée, la tumeur peut être retirée par ovariectomie. La chirurgie est unilatérale ou bilatérale selon qu'un seul ou les deux ovaires sont touchés par la maladie et lorsque la femme désire conserver sa fertilité, il est possible de retirer seulement la portion de l'ovaire atteint. Si la taille de la tumeur est de moins de dix centimètres, son ablation peut se faire par laparoscopie, alors que si elle est plus grande, elle doit être retirée par laparotomie, une technique plus invasive [76].

Les tumeurs borderlines, qui sont souvent détectées chez des femmes plus jeunes, présentent un bon pronostic. Ainsi, il est possible d'offrir aux patientes atteintes de ces tumeurs un traitement plus conservateur afin qu'elles demeurent fertiles. Si un seul des deux ovaires semble atteint, l'équipe médicale peut réaliser une salpingo-ovariectomie, qui consiste en l'exérèse d'un seul ovaire et d'une seule trompe de Fallope. Cependant, il est impératif de procéder à un examen consciencieux de l'ovaire controlatéral et à une stadification chirurgicale afin de s'assurer qu'aucun autre organe n'est touché par la maladie. Lorsque les deux ovaires sont touchés, une hystérectomie totale et une salpingo-ovariectomie bilatérale sont généralement réalisés, à moins que la fertilité soit importante. Dans ce cas, une ovariectomie partielle peut être considérée. Cette chirurgie n'entrave pas la survie des patientes; néanmoins, le risque de récurrence est augmenté. Si la chirurgie de cytoréduction tumorale a été optimale, soit une maladie résiduelle de moins de deux centimètres, et que la tumeur est de SI ou SII, la chirurgie est habituellement un traitement suffisant en soit, évidemment accompagnée d'une approche de surveillance de la patiente. Cependant, si ces conditions ne sont pas rencontrées, la chimiothérapie est ajoutée afin de traiter la maladie [20, 56, 77-80].

Lors d'un diagnostic de tumeur invasive de stade précoce, il est recommandé de procéder à une laparotomie exploratrice, une cytologie péritonéale, une hystérectomie totale, une salpingo-ovariectomie bilatérale et une épiploectomie [20, 56]. Chez les patientes ayant un

cancer de stade avancé, des biopsies aléatoires et ciblées et la résection de portions de différents organes sont réalisées en plus des chirurgies décrites précédemment [56].

Selon la FIGO, toutes les patientes atteintes de cancer de SII devraient avoir recours à un traitement de chimiothérapie en plus de la chirurgie [74]. Dans les cas des tumeurs invasives de stade III et IV, un traitement adjuvant de chimiothérapie est administré suite aux chirurgies et est habituellement constitué d'agents taxanes, tels le paclitaxel et le docetaxel, en combinaison avec des agents platines, tels le carboplatine et le cisplatine. Les taxanes sont des agents qui agissent en stabilisant les microtubules, empêchant ainsi la mitose de se dérouler. Les platines sont des agents alkylants de l'ADN, qui préviennent la réplication de l'ADN en empêchant les deux brins de se séparer. Dans quelques cas de maladie avancée, où de l'ascite et des métastases sont présents, deux ou trois cycles de chimiothérapie sont administrés avant la chirurgie, afin de diminuer au maximum le volume tumoral de la tumeur primaire et des métastases et ainsi rendre la chirurgie praticable [68, 74, 81, 82]. Enfin, les agents de chimiothérapie peuvent aussi être administrés par voie intra-péritonéale lorsque le cancer est de stade avancé. Ceci permet d'exposer la tumeur à de plus grandes doses de drogues [68]. Cependant, cette technique est aussi associée à de plus nombreux effets secondaires et complications qui affectent la qualité de vie des patientes [83, 84].

#### 1.3.3.4 Le suivi des patientes

Les patientes ayant été traitées pour un cancer épithélial de l'ovaire ont généralement un rendez-vous avec leur médecin tous les trois mois durant la première année suivant leur traitement. Ensuite, les rendez-vous sont tous les quatre à six mois pour les trois ou quatre années suivantes. À partir de la cinquième année, les rendez-vous s'espacent à une fréquence d'un seul par année. Lors de ces rencontres, un examen physique complet, comprenant une palpation mammaire, pelvienne et rectale, est effectué par le médecin. Des prises de sang sont aussi faites afin de vérifier le taux sérique du marqueur

CA125, dont l'augmentation peut être le signe d'une récurrence de la maladie ou d'un traitement inefficace [20, 74].

Si une masse est suspectée, des tests d'imagerie peuvent alors être effectués par échographie transvaginale ou pelvienne, par tomodensitométrie, par tomographie par émission de positrons (PET scan) ou par résonance magnétique [20].

Enfin, lorsque les patientes ont été traitées par une chirurgie conservatrice, une échographie transvaginale est prescrite tous les six mois puisque les risques de récurrence de la maladie aux ovaires résiduels sont élevés [20].

#### 1.3.3.5 La progression de la maladie

Seule une faible proportion des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire de stade avancé répondent complètement à leur traitement. La majorité d'entre elles ont malheureusement une rechute. La récurrence se définit comme une reprise de la maladie seulement six mois suivant les traitements de première ligne (chimiothérapie). Lorsque la rechute se produit en moins de six mois après le traitement, la maladie est qualifiée de résistante. Enfin, si la tumeur progresse lors de la phase initiale de traitement, elle est réfractaire ou progressive [58]. Lorsque la maladie réapparaît, elle est souvent située au niveau de la cavité péritonéale, où des métastases sont retrouvées, et au niveau de l'apex vaginale, où la maladie revient sous forme de petites masses pelviennes [20].

Un traitement de deuxième ligne est offert aux femmes dont la maladie persiste ou progresse malgré le traitement initial. Il s'agit d'une combinaison de taxanes et de platines. Ces traitements ne sont cependant pas curatifs, mais plutôt palliatifs, c'est-à-dire que leur but est de contrôler la maladie (et non de la faire régresser) afin d'améliorer la qualité de vie des patientes [20].

Enfin, les patientes réfractaires peuvent s'inscrire à des essais cliniques ou tenter des traitements avec différents agents de chimiothérapie moins efficaces, comme le topotécan ou la gemcitabine [20].

### 1.3.4 Les facteurs pronostiques

Différents facteurs reliés au pronostic des patientes atteintes de tumeurs épithéliales de l'ovaire peuvent aider à prédire l'évolution de la maladie. La connaissance de ces facteurs est importante, puisqu'elle permet une meilleure prise en charge des patientes.

#### 1.3.4.1 L'âge au diagnostic

L'âge de la patiente au moment du diagnostic du cancer est un facteur associé à la survie. La survie à cinq ans des patientes de moins de 45 ans est de 70%, alors que ce nombre chute à seulement 20% pour des femmes âgées de 75 à 99 ans au moment du diagnostic [20].

#### 1.3.4.2 Le stade de la maladie

Le stade de la maladie est un facteur pronostique important, puisqu'il indique l'étendue de la maladie. Plus le stade est bas, meilleur sont les chances de survie de la patiente. Ainsi, pour une maladie de stade I, le taux de survie cinq ans après le diagnostic de la maladie est de 80-90%, alors qu'il est de 70% pour les patientes ayant une maladie de stade II. Ce taux chute à seulement 40% et 25% pour les maladies de stade III et IV respectivement [85, 86]. De plus, la présence d'ascite, qui est aussi un facteur de stadification de la maladie, est reliée à un mauvais pronostic [20].

#### 1.3.4.3 Le grade de la tumeur

Le pronostic d'une patiente est de plus relié au grade histologique de la tumeur dont elle est atteinte. Environ 90% des patientes ayant une tumeur bien différenciée (G1) survivent en moyenne cinq ans après le traitement, alors que ce nombre diminue à 85% pour les patientes ayant une tumeur de grade 2 et à seulement 30% pour les femmes qui ont développé une tumeur de grade 3 [87].

#### 1.3.4.4 Le type histopathologique

Les pronostiques les plus sombres sont généralement attribués aux tumeurs de type histopathologique séreux ou indifférencié, bien que les tumeurs mucineuses ou à cellules claires de stade IV ont un taux de survie à cinq ans encore plus faible. Ceci est en partie dû au fait que ces dernières montrent généralement une réponse plus faible à la chimiothérapie [7].

#### 1.3.4.5 La maladie résiduelle

La taille de la tumeur résiduelle après la première chirurgie de cytoréduction est, avec le stade de la maladie, l'un des facteurs pronostiques les plus prédictifs de la survie des patientes. Il a été montré que la survie sans progression de la maladie et la survie globale sont toutes deux en relation avec la quantité de tumeur n'ayant pu être retirée du corps de la patiente. En fait, chaque augmentation de 10% de la cytoréduction maximale est associée à une augmentation de 5.5% du temps de survie [20]. Une masse tumorale résiduelle de un centimètre ou moins est décrite comme une cytoréduction optimale, alors que lors d'une chirurgie complète, il ne reste aucune maladie macroscopique visuelle.

#### 1.3.4.6 Le statut des gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Bien que les femmes porteuses de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2* aient plus de risques de développer des tumeurs de l'ovaire, elles ont cependant généralement l'avantage d'une meilleure réponse aux traitements de chimiothérapie, ce qui leur confère un meilleur pronostic que les femmes qui n'ont pas ces mutations [88].

## 1.4 Les modèles d'étude du CÉO

Afin de pouvoir étudier le cancer épithélial de l'ovaire, divers modèles ont été développés. Premièrement, il est possible d'utiliser le tissu provenant de la chirurgie, qu'il soit normal ou tumoral, et ce modèle est sans contredit le plus représentatif de la réalité.

Son utilisation est cependant restreinte par son accessibilité et l'impossibilité d'y introduire du matériel génétique afin d'étudier une composante cellulaire ou un phénomène cellulaire précis. Le tissu frais ou préservé, en paraffine ou en OCT (*optimal cutting temperature*), permet toutefois l'utilisation et l'étude de l'ARN, de l'ADN et des protéines, en plus de l'étude de sa morphologie et de sa structure par des coupes histologiques.

Les cellules du tissu tumoral peuvent aussi être mises en culture afin de créer une culture primaire. La tumeur est grattée ou dégradée par des collagénases afin d'en détacher les cellules tumorales d'intérêt [89]. Ces cellules tumorales, qui prolifèrent rapidement, sont aussi plus résistantes que les cellules normales aux conditions de culture cellulaire. Ainsi, la culture primaire devient plus pure au fil des passages. Ce modèle d'étude permet l'utilisation de divers outils de biologie moléculaire, mais a l'inconvénient de ne pas être éternel. Les cellules meurent donc généralement après quelques passages.

Il arrive toutefois que les cellules d'une culture primaire deviennent spontanément immortelles. L'immortalité, qui peut aussi être induite, signifie que les cellules pourront se reproduire indéfiniment. Les cellules forment alors une lignée cellulaire, ayant l'avantage de pouvoir être modifiée génétiquement, de pouvoir être utilisée sur une longue période de temps et de pouvoir être amplifiée pour donner une très grande quantité de cellules à étudier. Au laboratoire, il a été démontré que les caractéristiques *in vitro* des lignées cellulaires ovariennes sont similaires à la tumeur d'origine [90]. Néanmoins, ce modèle de monocouche de cellules est légèrement différent de la tumeur originale, puisque le microenvironnement tumoral retrouvé chez la patiente n'est pas présent [91].

Récemment, un modèle de culture permettant des interactions cellule-cellule plus complexes que dans la culture en monocouche a été développé. La culture tridimensionnelle des cellules, par gouttelettes inversées, permet la formation de sphéroïdes qui sont plus représentatifs de la tumeur originale que les cellules en monocouche [92]. Toutefois, la durée de vie des sphéroïdes est limitée à quelques jours, ce qui limite quelque peu leur utilisation.

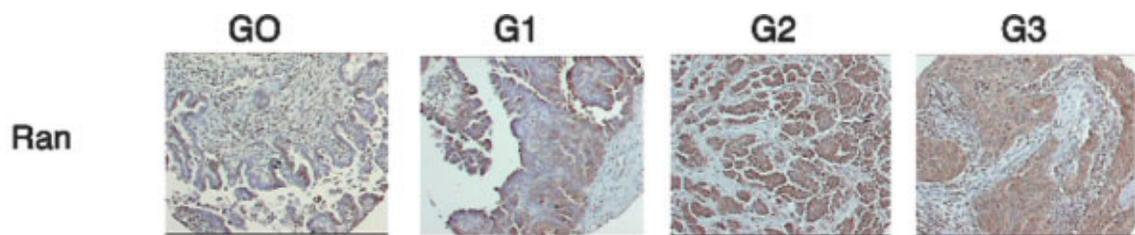
Enfin, deux modèles d'étude du CÉO utilisent la souris. Premièrement, il est possible de produire des xénogreffes de cellules tumorales humaines en injectant les cellules d'une lignée cellulaire dans des souris immunodéficientes. Ces tumeurs ont donc un microenvironnement plus représentatif de ce qui est présent chez la femme, à l'exception des cellules immunitaires. Les souris immunodéficientes sont utilisées puisque l'absence du système immunitaire est essentiel au développement d'une tumeur d'origine humaine [93, 94]. Deuxièmement, un modèle murin de cancer épithélial de l'ovaire a récemment été développé alors que jusque-là, aucun modèle animal ne pouvait reproduire efficacement le CÉO. Ces souris développent des tumeurs de l'ovaire bilatérales, forment de l'ascite et envahissent l'épiploon. L'apparition des tumeurs prend de trois à quatre mois [95].

## **1.5 Les enjeux du CÉO**

Malgré toutes les recherches déjà réalisées sur le cancer épithélial de l'ovaire, il y a encore énormément de travail à faire afin de bien comprendre comment cette maladie se développe, de connaître les facteurs de risque impliqués dans son développement ou de trouver des moyens efficaces de la traiter, pour ne nommer que ces enjeux. Un autre défi de taille demeure: trouver un moyen de détecter le cancer avant qu'il ne progresse et ne se dissémine dans le corps des patientes afin qu'il soit efficacement traitable. Un test de dépistage applicable à l'ensemble de la population à risque permettrait de prévenir le cancer et ainsi sauver plusieurs vies humaines.

Tel que mentionné précédemment, le pronostic des femmes atteintes d'une tumeur invasive est beaucoup plus sombre que celui des patientes ayant développé une tumeur à faible potentiel de malignité. Ainsi, il est essentiel d'étudier ces tumeurs afin d'avoir une meilleure compréhension des éléments qui les différencient. Au laboratoire, des analyses par micropuces à ADN ont été réalisées à l'aide de la micropuce GeneCHIP HuGeneFL d'Affymetrix, dans le but d'identifier les gènes différenciellement exprimés entre les tumeurs séreuses borderlines et invasives. Suite à l'analyse des données de six tissus de tumeurs à faible potentiel de malignité et de 12 tumeurs invasives, il a été observé que

l'expression de plusieurs gènes est modulée entre les différentes classes de tumeurs. De ces gènes, dix ont été sélectionnés, selon leur rôle biologique et la disponibilité des anticorps commerciaux, afin d'être étudiés plus en détails [49]. Parmi les candidats qui ont été étudiés par immunohistochimie sur microétagage de 244 tissus de tumeurs ovariennes, la protéine Ran GTPase s'est avéré présenter la plus haute combinaison de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic. En plus de différencier les tumeurs à faible potentiel de malignité des tumeurs invasives, l'expression de cette protéine corrèle avec un stade et un grade avancés de la maladie et est ainsi étroitement reliée à un pauvre pronostic ( $p < 0,001$ ) (Figure 16) [96]. Mon projet de maîtrise a donc été entièrement dédié à la caractérisation de ce gène différentiellement exprimé entre les LMP et les TOV, la Ran GTPase.



**Figure 16 Expression de la GTPase Ran dans des tissus du cancer épithélial de l'ovaire de différents grades variant de GO (LMP) à G3 (tirée de [96])**

## 1.6 La GTPase Ran

La protéine Ran fait partie de la superfamille des GTPases Ras. Ce facteur, essentiel à plusieurs processus cellulaires, a tout d'abord été découvert pour son rôle dans la régulation du transport nucléocytoplasmique, puis dans la progression du cycle cellulaire. La superfamille des GTPases Ras, ainsi que les diverses fonctions de Ran, sont décrites dans cette section.

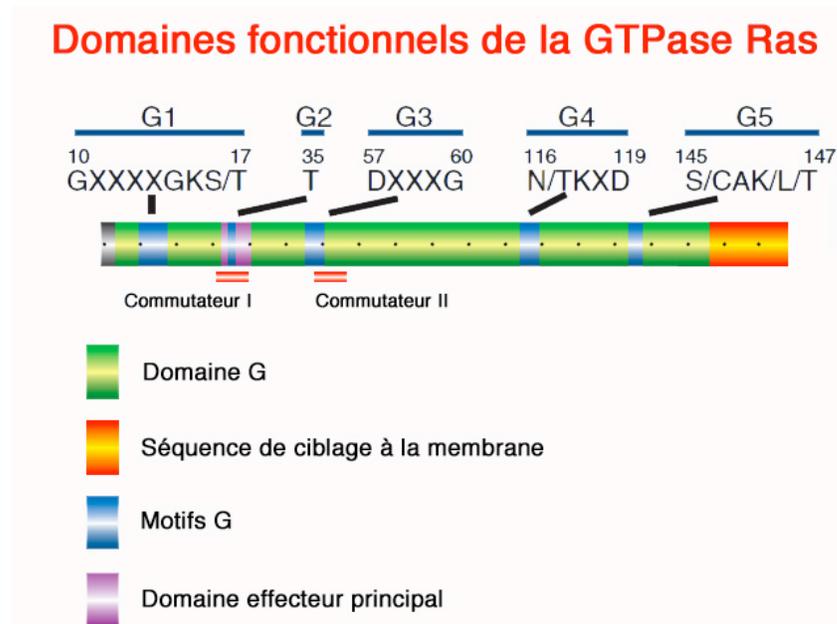
### 1.6.1 La superfamille des GTPases Ras

Les GTPases de la superfamille Ras ont été conservées à travers l'évolution des espèces. Des protéines orthologues à la protéine humaine ont été retrouvées chez les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, de même que chez la drosophile et les plantes [97]. Cette superfamille comporte plus de 150 membres chez l'humain, regroupés en cinq sous-familles principales, soit Ras, Rho, Rab, Ran et Arf. Neuf GTPases orphelines n'ont été classées dans aucune de ces cinq sous-familles. Les GTPases sont classées dans l'une ou l'autre des familles selon leur séquence nucléotidique et leurs fonctions [98]. Tous les membres de la superfamille partagent les mêmes mécanismes biochimiques, quoique la régulation de leur activité soit effectuée par différentes protéines. Ces protéines régulatrices peuvent être partagées dans une même sous-famille [99]. Les protéines de cette superfamille sont actives lorsqu'elles sont liées au GTP alors qu'elles sont inactives lorsque liées au GDP.

#### 1.6.1.1 La structure des GTPases Ras

Les études réalisées sur les différentes GTPases de la superfamille Ras ont permis de mieux comprendre leur mode de fonctionnement et de mettre en place la structure générale de ces protéines. Ces GTPases partagent une structure commune, composée de six feuillets bêta reliés par des hélices alpha et des boucles qui constituent les éléments principaux de la GTPase, formant un domaine G d'environ 20 kDa. Les motifs G sont des régions hautement conservées importantes pour le remplacement du GDP par le GTP, pour l'hydrolyse du GTP et pour le changement de conformation induit par la liaison au GTP. Ils sont retrouvés dans cinq boucles d'un même côté de la protéine [100]. Le motif G1, situé en N-terminal, comporte la séquence GXXXXGKS/T. Le motif G2 est T, le motif G3 est DXXGQ/H/T, le motif G4 est T/NKXD et enfin le motif G5 est C/SAK/L/T (Figure 17) [98, 100]. C'est principalement la conformation des acides aminés des motifs G2 et G3 qui change entre les formes de la protéine liée au GDP ou au GTP. Ces motifs importants sont nommés commutateurs (*switch*) I et II. Enfin, les GTPases de certaines

sous-familles subissent des modifications post-traductionnelles par des lipides afin de les cibler à une membrane, d'où elles opèrent.

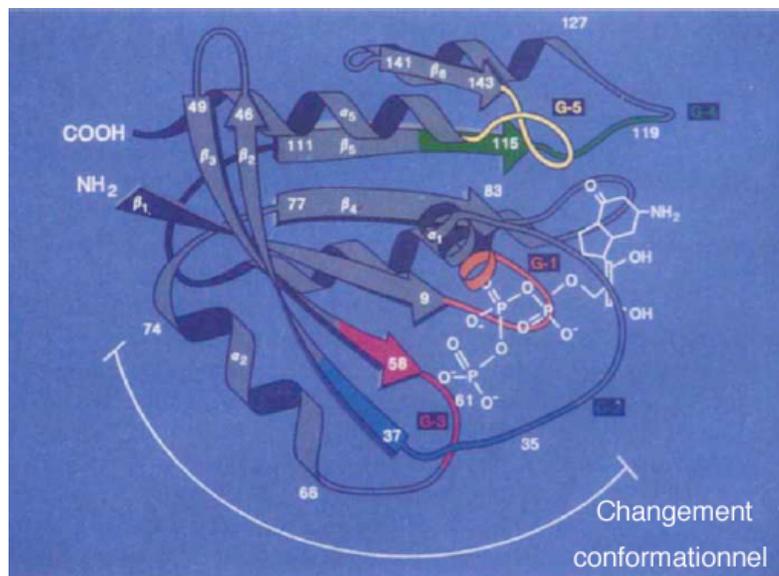


**Figure 17 Domaines fonctionnels de la protéine Ras** (adapté de [98])

### 1.6.1.2 La régulation des GTPases Ras

Les GTPases de la superfamille Ras dépendent de cycles d'hydrolyse du GTP et de la recharge en GTP afin de pouvoir exercer leurs rôles au sein des cellules. Ces protéines possèdent une forte affinité au GTP et au GDP. Cependant, elles ne possèdent que de faibles activités intrinsèques d'hydrolase et d'échange du GTP et dépendent donc de différents facteurs qui catalysent les réactions d'hydrolyse et de recharge en GTP [98]. Les GAPs (*GTPase-activating proteins*) sont les facteurs qui accélèrent l'hydrolyse du GTP, augmentant ainsi la quantité de GTPases liées au GDP, soit la forme inactive de ces protéines. Inversement, les GEFs (*Guanine-nucleotide exchange factors*) sont les facteurs responsables de la recharge nucléotidique des GTPases. En remplaçant le GDP par un GTP,

les GEFs augmentent la quantité de GTPases actives ayant le potentiel d'effectuer diverses fonctions au sein de la cellule [100]. La conformation générale de la protéine demeure inchangée suite à la liaison au GTP ou à l'hydrolyse du GTP en GDP. Cependant, les commutateurs I et II subissent de grands changements conformationnels lorsque ces réactions surviennent (Figure 18). C'est en grande partie grâce à ces domaines que les protéines effectrices, soit les GAPs et les GEFs, peuvent percevoir l'état d'une GTPase [98].



**Figure 18** Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine Ras liée au GTP et des régions qui subissent des changements conformationnels suite à la liaison au GTP (adaptée de [100]).

### 1.6.2 Ras-related nuclear protein (Ran)

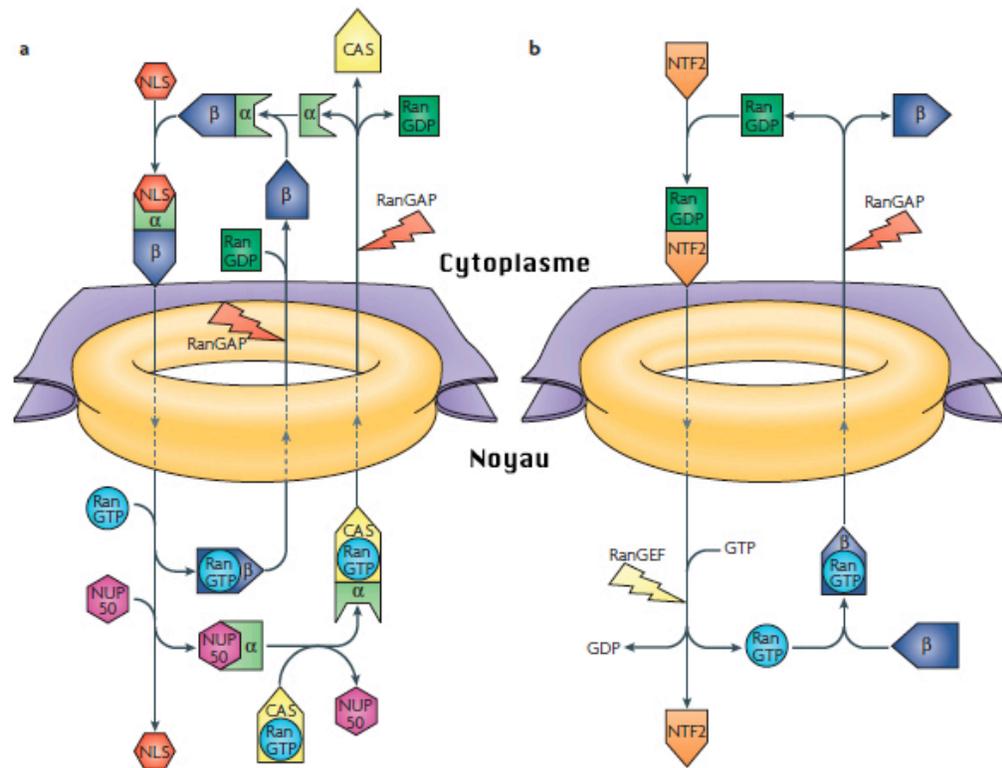
La protéine Ran est la seule représentante de la sous-famille des GTPases Ran. Elle n'est pas liée à une membrane et n'est par conséquent pas régulée par des modifications post-traductionnelles ajoutant des lipides à la protéine. À l'instar des autres

GTPases, Ran est active lorsqu'elle est liée au GTP. Le cycle d'hydrolyse et de recharge en GTP est essentiel pour ses activités et différentes fonctions sont associées à chacun des états de la protéine, ce qui est particulier des sous-familles Ran, Arf et Rab. Enfin, une accumulation de Ran-GTP au noyau et de Ran-GDP au cytoplasme, formant un gradient de Ran-GTP, est essentielle aux fonctions de Ran, ce qui est unique à cette sous-famille de GTPases [98].

#### 1.6.2.1 Le transport nucléocytoplasmique

Lors des années 1990, Ran a été caractérisée pour son rôle dans la régulation du transport de macromolécules par le complexe du pore nucléaire [101]. La régulation de l'état de Ran (liée au GTP ou au GDP) dépend de sa GEF, RCC1 (*Regulator of chromosome condensation 1*), et de RanGAP1. Durant l'interphase, la protéine RCC1 est retrouvée au noyau, où elle est associée à la chromatine, alors que RanGAP1 est localisée au cytoplasme, où elle stimule l'activité hydrolase de Ran (Figure 18) [102]. Il se crée ainsi un bassin de Ran-GDP au cytoplasme, alors qu'au noyau, Ran est retrouvée liée au GTP en plus grande quantité. Le maintien du gradient de Ran-GTP vers le noyau, qui régule l'assemblage et le désassemblage des complexes d'import et d'export permet d'orienter le transport nucléocytoplasmique [103]. Ran est responsable du transport de la majorité des macromolécules qui ne passent pas librement le pore nucléaire, incluant des protéines membranaires, des sous-unités ribosomales et certains ARNs. L'import et l'export de ces molécules nécessitent la participation de protéines conservées, les karyophérines- $\beta$ . Ces protéines sont nommées importines ou exportines selon qu'elles opèrent l'import ou l'export nucléaire, respectivement, et seules quelques karyophérines peuvent effectuer l'import et l'export de molécules [103]. La plupart des protéines sont transportées vers le noyau à l'aide de l'importine- $\beta$ , alors que l'export est réalisé, dans la majorité des cas, avec l'exportine CRM1. Les pre-microARNs et les shRNAs sont exportés par l'exportine-5 et les ARNt par l'exportine-t, deux homologues de l'importine- $\beta$  [104, 105].

Le cycle classique d'import protéique débute par la reconnaissance du signal de localisation nucléaire (NLS) d'une protéine cargo par une karyophérine. La majorité des NLS sont directement reconnus par la protéine importine- $\beta$ , mais certaines protéines nécessitent la présence de l'importine- $\alpha$ , qui sert d'adaptateur à l'importine- $\beta$ . Dans un cas comme dans l'autre, l'importine- $\beta$  facilite l'import des protéines cargo à travers le complexe du pore nucléaire. Au noyau, Ran-GTP est en grande quantité et sa liaison à l'importine- $\beta$  cause la dissociation du complexe d'import, occasionnant la relâche du cargo. La protéine importine- $\alpha$  liée par Ran-GTP est retournée au cytoplasme par le facteur CAS, un membre de la famille des karyophérines- $\beta$ , permettant ainsi la recharge des facteurs d'import au cytoplasme. L'importine- $\beta$  peut aussi retourner au cytoplasme lorsqu'elle est liée à Ran-GTP. Au cytoplasme, RanGAP1 est retenue à la membrane nucléaire par association à RanBP2 (Nup358), une protéine du complexe du pore nucléaire. Lorsque Ran-GTP passe la membrane nucléaire, son activité GTPase est stimulée, créant du Ran-GDP. L'association de RanGAP1 à Ran-GTP nécessite la présence de RanBP1, qui contient un domaine de liaison à Ran. RanBP1 séquestre le domaine C-terminal de Ran et libère les domaines avec lesquelles RanGAP1 interagit, notamment le commutateur II. L'hydrolyse du GTP induit la dissociation de Ran et des importines, qui sont à nouveau libres de participer à un autre cycle d'import. Ran est recyclée au noyau par le transporteur NTF2, qui interagit avec les domaines commutateurs I et II de Ran. Le recyclage de NTF2 vers le cytoplasme se fait de façon indépendante à Ran. Au noyau, RCC1 s'associe à Ran et altère la conformation du commutateur II et de son domaine carboxy-terminal, ce qui déstabilise l'interaction entre Ran et le GDP, permettant la recharge en Ran-GTP (Figure 19) [103, 104, 106-108].



**Figure 19 Vue d'ensemble de l'import de protéines nucléaires (adaptée de [104]) :**

- A) Import d'un cargo contenant un NLS par Ran
- B) Recyclage de Ran-GTP et de l'importine- $\beta$

Le mécanisme d'export permet le transport, vers le cytoplasme, de molécules comportant un signal d'export nucléaire (NES). Le NES est reconnu par une exportine, la plupart du temps CRM1. La liaison de Ran-GTP au complexe cargo/exportine stabilise leur interaction et permet la translocation à travers le pore nucléaire. Au cytoplasme, l'hydrolyse de Ran-GTP, catalysée par RanGAP1 et RanBP1, provoque la dissociation du complexe d'export et par le fait même la relâche de la molécule cargo. Le Ran-GDP généré par l'hydrolyse du GTP est encore une fois recyclé au noyau par le facteur NTF2. Le recyclage de CRM1 au noyau est indépendant de la protéine Ran [106].

### 1.6.2.2 La progression du cycle cellulaire

Lors de l'interphase, Ran participe au transport nucléocytoplasmique. Ce processus essentiel à la cellule est assuré par le gradient en Ran-GTP créé entre le noyau et le cytoplasme. Le transport de différentes macromolécules est utilisé par la cellule afin de réguler divers mécanismes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Lors de la mitose, la membrane nucléaire se désagrège et la machinerie du transport nucléocytoplasmique est réutilisée pour d'autres fonctions [109].

#### 1.6.2.2.1 *Inhibition de la re-réplication*

Lors de la phase S du cycle cellulaire, des complexes de pré-réplication (CPR) sont formés sur l'ADN afin de le dupliquer. Cependant, il est essentiel de ne copier qu'une seule et unique fois chaque information du génome lors d'un cycle cellulaire. Ainsi, des mécanismes de régulation sont en place dans les cellules permettant de bloquer la formation de CPR lorsque la réplication a déjà été initiée. La formation du CPR est un processus ordonné : le complexe de reconnaissance de l'origine (ORC) lie d'abord la chromatine, puis Cdc6 et Cdt1 viennent s'y ajouter. Ensuite, Cdc6 et Cdt1 recrutent l'hélicase MCM et la kinase Cdc2 initie la réplication de l'ADN lors de la transition G<sub>1</sub>/S [110]. Le processus d'inhibition de la re-réplication nécessite la présence de Ran-GTPase dans le noyau et empêche l'hélicase MCM de se ré-assembler dans un CPR. En fait, l'inhibition de MCM est dépendante de Cdk2, dont l'activation à la transition G<sub>1</sub>/S induit la formation d'un complexe Ran-GTP/CRM1/MCM. Enfin, l'inhibition de la re-réplication ne requiert pas l'export de MCM du noyau, mais seulement sa liaison à CRM1 [111].

#### 1.6.2.2.2 *L'entrée en mitose*

Dans les cellules eucaryotes, l'entrée en mitose est régulée par l'activation de Cdc2/Cycline B. Bien que les cyclines B produites lors de l'interphase puissent interagir avec Cdc2, le complexe est retenu dans un état inactif jusqu'à la transition G<sub>2</sub>/M. Cette inactivation est due à la phosphorylation de Cdc2 par deux kinases, Wee1 et Myt1. La

déphosphorylation ultérieure de Cdc2 par Cdc25 mène à l'activation du complexe et donc à l'entrée en mitose [112]. L'inactivation du complexe Cdc2/Cycline B est aussi régulée par la compartimentalisation des différents régulateurs du complexe. Dans les cellules HeLa, le complexe Cdc2/Cycline B2 se retrouve au cytoplasme, associé au Golgi, alors que le complexe Cdc2/Cycline B1 est associé aux microtubules et transite au noyau lors de la transition G<sub>2</sub>/M. La kinase inactivatrice Wee1 est retrouvée au noyau alors que Myt1 et Cdc25 sont plutôt retrouvées au cytoplasme. Les premières hypothèses sur la localisation cytoplasmique de la Cycline B1 stipulaient qu'une séquence de rétention cytoplasmique (SRC) ancrerait cette protéine au cytoplasme. Cependant, une étude a par la suite montré que le SRC de la cycline B1 est en fait un NES et que l'accumulation cytoplasmique de la protéine résulte d'un import nucléaire actif continu suivi d'une rapide exportation au cytoplasme plutôt que d'une immobilisation cytoplasmique. Le transport de la cycline B1 de part et d'autre de la membrane nucléaire est régulé par la GTPase Ran. Enfin, la liaison de CRM1 à la cycline B1 est inhibée par une phosphorylation dans le SRC de la cycline, ce qui permet de réduire l'export nucléaire de la protéine et de provoquer l'entrée en mitose [113].

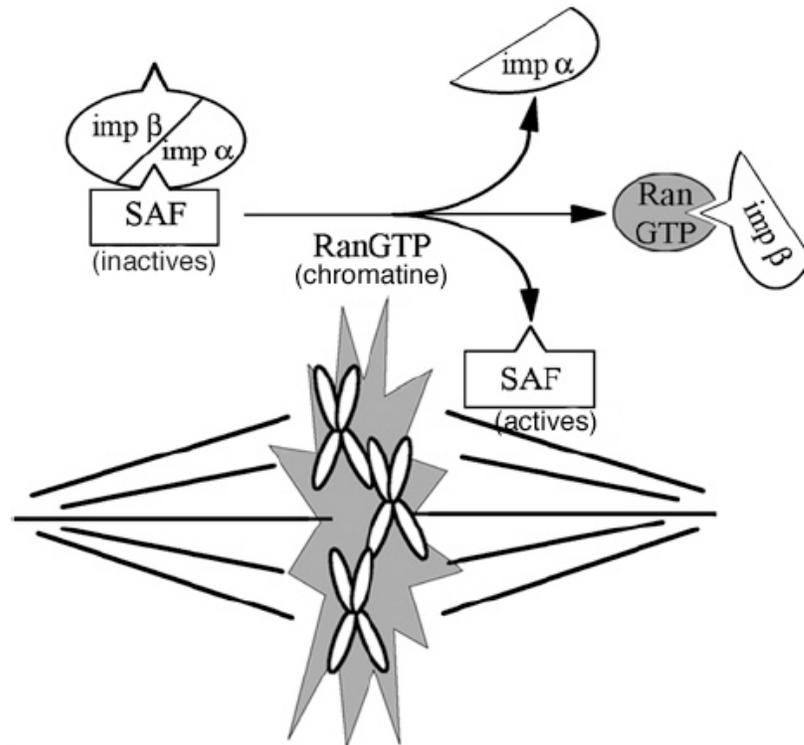
#### 1.6.2.2.3 *La mitose*

La GTPase Ran participe à différents processus impliqués dans la mitose. Certaines fonctions ont été largement décrites, alors que pour la majorité, les détails des mécanismes d'action restent encore à élucider. Plusieurs des rôles joués par Ran ont été découverts suite à des expériences effectuées avec des extraits d'oocytes de *Xenopus*, un système modèle largement validé pour l'étude des phénomènes mitotiques et particulièrement dans l'assemblage du fuseau mitotique [114]. Cette section décrit les différents mécanismes régulés par Ran, et son réseau, lors de la mitose.

La duplication du centrosome lors de la mitose permet de créer un fuseau mitotique bipolaire. Bien que cette étape soit critique, puisqu'une amplification des centrosomes peut mener à une mauvaise ségrégation des chromosomes et à l'aneuploïdie, aucun point de

contrôle connu n'est en place pour détecter une anomalie du nombre de centrosomes [114]. Deux évidences suggèrent que Ran et son réseau pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la duplication des centrosomes. Premièrement, la protéine CRM1 contribue à la localisation centrosomique de la nucléophosmine (NPM), une protéine qui prévient la re-duplication des centrosomes au cours d'un cycle cellulaire en s'associant aux centrosomes nouvellement dupliqués. La liaison de CRM1 à NPM, qui contient un NLS, est stabilisée par la présence de Ran-GTP. Deuxièmement, la protéine virale E1A, qui peut normalement perturber le contrôle de la duplication du centrosome, ne peut exercer cette fonction que si elle interagit avec Ran et que si RCC1 est présente. Le mécanisme précis et les cibles de Ran dans le contrôle de l'organisation du centrosome ne sont pas encore bien caractérisés [106, 115].

Le fuseau mitotique est essentiel à la cellule en division, car il permet l'organisation et la ségrégation des chromosomes. Puisqu'une mauvaise ségrégation des chromosomes entraîne de graves conséquences sur les cellules, l'assemblage du fuseau mitotique doit être finement régulé [106]. Ce processus, régulé par Ran, est contrôlé par un mécanisme semblable au transport nucléocytoplasmique, soit en dissociant des complexes de macromolécules à un endroit précis de la cellule. Les protéines TPX2 et NuMA sont des facteurs connus d'organisation des pôles du fuseau mitotique et font partie de la famille des facteurs d'activation du fuseau mitotique (SAF). Ces deux facteurs contiennent un NLS et leur liaison à une importine les retient dans un complexe inhibiteur. À proximité des chromosomes condensés, Ran-GTP est générée en grande quantité par l'action de RCC1, ce qui permet la relâche des SAFs (Figure 20) [114-116]. Ainsi, la formation du fuseau mitotique n'est activée qu'à proximité des chromosomes dans la cellule en mitose.



**Figure 20** Représentation schématique de l'assemblage du fuseau mitotique dépendant de Ran-GTP (adattée de [115]).

Lorsque la membrane nucléaire se désagrège à la mitose, les facteurs du transport nucléocytoplasmique sont réutilisés et doivent être relocalisés. Les protéines CRM1, RanBP2 et RanGAP1 se retrouvent alors aux kinétochores, où RanGAP1/RanBP2 contribuent à la structure de la connexion microtubule-kinétochore. Dans des cellules où RCC1 est manquante, RanBP2 et RanGAP1 ne se retrouvent plus aux kinétochores, indiquant que Ran-GTP est importante pour la localisation de ces facteurs. L'absence de CRM1 dans des cellules en mitose produit aussi une mauvaise localisation de RanGAP1/RanBP2, en plus de provoquer un retard de la métaphase. Ces observations indiquent que CRM1 et Ran-GTP sont importantes à la bonne localisation de RanGAP1/RanBP2 et sont essentielles au maintien de la stabilité des chromosomes [106, 117].

Durant la métaphase, Ran-GTP facilite la capture des chromosomes par les microtubules. À l'extrémité positive des microtubules, la concentration de la protéine HURP est dépendante de son association à l'importine- $\beta$  et de Ran. HURP est un facteur important de la régulation de la formation des kinétochores. La formation des fibres K dépend de la localisation de HURP aux microtubules, de RCC1 aux chromosomes et de CRM1 au kinétochore [115].

Enfin, Ran régule la transition métaphase à anaphase. Les protéines Rae1 et Nup98 sont des facteurs responsables de l'inhibition de la dégradation de la sécurine. Lors de la transition métaphase à anaphase, ces protéines sont liées directement par l'importine- $\beta$ , un phénomène qui rend possible la dégradation de la sécurine. La séparase devient alors catalytiquement active et les chromatides sœurs sont séparées [115].

#### *1.6.2.2.4 La régénération de la membrane nucléaire*

Suite à la mitose, le fuseau mitotique est désassemblé et la membrane nucléaire et les complexes des pores nucléaires sont reformés autour des chromosomes. Les mécanismes exacts du recrutement et de la fusion des vésicules ne sont pas tout à fait caractérisés, mais il paraît clair que la GTPase Ran joue un rôle direct dans la régénération de la membrane nucléaire [116]. Cette fonction de Ran est d'ailleurs indépendante du transport nucléocytoplasmique [118].

Ran-GTP peut s'associer directement aux histones H3 et H4 par une liaison de faible affinité. Cette association permet de localiser Ran à proximité de l'ADN, où elle est requise pour la décondensation des chromosomes. Les vésicules précurseurs de l'enveloppe nucléaire sont ensuite recrutées autour de la chromatine [115, 119]. D'après les résultats obtenus en utilisant des mutants de Ran bloqués sous les formes GDP ou GTP, l'hydrolyse du GTP de Ran serait essentielle à la décondensation de la chromatine et à la régénération de l'enveloppe nucléaire, puisque aucun des mutants ne peut compléter ces processus [115, 116]. Ces mécanismes nécessitent aussi la présence de l'importine- $\beta$ . Selon certaines

études, Ran agirait en localisant les protéines cargo de l'importine- $\beta$  autour des noyaux en formation, mais plusieurs détails du phénomène restent toujours à élucider [115].

Enfin, Ran et l'importine- $\beta$  sont aussi requises pour l'insertion des complexes de pores nucléaires (NPC) dans la membrane nucléaire en formation. Les NPCs peuvent être ajoutés du côté cytoplasmique, comme du côté nucléaire, ce qui indique que le Ran-GTP cytoplasmique pourrait exercer certaines fonctions [116]. Cependant, les mécanismes précis du réassemblage des pores nucléaires ne sont pas encore bien compris.

### 1.6.3 Ran et le cancer

Une forte expression de Ran a été observée dans différents tissus tumoraux. Il a été montré que la GTPase Ran est surexprimée dans les tumeurs gastriques, du colon, du pancréas, du poumon, du rein et du nasopharynx lorsque comparées aux tissus normaux correspondants [120-122]. Ces observations indiquent que la dérégulation de l'expression de Ran pourrait être un évènement important dans la transformation cellulaire ou la progression tumorale, mais la fonction précise de Ran dans la tumorigenèse n'est pas encore connue [120].

Ran régule une multitude de processus essentiels à la cellule au cours de la progression du cycle cellulaire. Lors de l'interphase, l'ARN messenger doit être exporté du noyau, de même que les ARN ribosomiaux et les ARN de transfert, afin de pouvoir procéder à la traduction. Inversement, les protéines essentielles à la transcription doivent pouvoir atteindre l'ADN au noyau. La dérégulation du transport nucléocytoplasmique peut donc altérer la localisation de ces macromolécules et déréguler les évènements de transcription et de traduction. Différentes protéines, tels des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs, ont montré avoir une localisation nucléaire anormale dans des tissus tumoraux. Ce phénomène pourrait être dû à une modification de l'expression de Ran ou des protéines de sa signalisation [123]. Ran est aussi impliquée dans la progression de la mitose. La dérégulation des fonctions mitotiques de Ran peut mener à des altérations génétiques, qui sont communes dans le cancer de l'ovaire, ainsi qu'au dérèglement du contrôle de la prolifération cellulaire [116].

## **1.7 Objectif du projet de maîtrise**

L'hypothèse de mon projet de maîtrise s'est fondée sur des résultats antérieurs obtenus au laboratoire, qui indiquaient que Ran est surexprimée dans les tumeurs invasives (TOV) par rapport aux tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP) dans le cancer épithélial de l'ovaire. Il a de plus été montré que certains oncogènes et suppresseurs de tumeurs ont une localisation anormale dans les cellules tumorales, ce qui pourrait être causé par un dérèglement du transport nucléocytoplasmique. La dérégulation de Ran, ou de ses régulateurs, pourrait aussi mener à des altérations génétiques, communes dans le cancer épithélial de l'ovaire. Les travaux réalisés lors de ma maîtrise se sont donc basés sur l'hypothèse que la surexpression de la GTPase Ran est impliquée dans la tumorigenèse ovarienne. L'objectif principal de mon projet consistait à moduler l'expression de Ran dans différentes lignées cellulaires agressives du cancer de l'ovaire, puis à caractériser les effets engendrés par la perte de Ran sur la prolifération et la viabilité cellulaire.

## **CHAPITRE 2 : An essential role for Ran GTPase in epithelial ovarian cancer cells survival**

**Véronique Barrès<sup>1</sup>, Véronique Ouellet<sup>1</sup>, Julie Lafontaine<sup>1</sup>, Patricia N. Tonin<sup>2,3,4</sup>,  
Diane M. Provencher<sup>1,5,6</sup> and Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,6</sup>**

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

<sup>2</sup>Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

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

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

<sup>5</sup>Division of Gynecologic Oncology/Université de Montréal, Montreal, Canada;

<sup>6</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada;

Article en préparation

**Keywords** : Serous epithelial ovarian cancer, Ran GTPase, apoptosis

*\*V. Barrès est responsable d'environ 90% de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. V. Ouellet a participé à la génération d'une lignée cellulaire et J. Lafontaine a réalisé l'infection des cellules par les lentivirus. P.N. Tonin, D.M. Provencher et A-M. Mes-Masson ont supervisé l'ensemble de l'étude.*

## **Résumé**

Nous avons précédemment identifié la protéine Ran, un membre de la superfamille des GTPases Ras, comme marqueur fortement exprimé dans les cancers épithéliaux de l'ovaire de haut grade et stade dont la surexpression est associée avec un mauvais pronostic. Ran est connue pour contribuer au transport nucléocytoplasmique et à la progression du cycle cellulaire, mais son rôle dans le cancer ovarien n'est pas bien défini. En utilisant une approche de shRNA inductibles à la tétracycline basée sur les lentivirus, nous avons montré que la diminution de l'expression de Ran dans des lignées cellulaires agressives du cancer de l'ovaire affecte drastiquement la prolifération cellulaire par l'induction d'une apoptose caspase-3 dépendante. Par un essai de tumeurs en xénogreffes, nous avons démontré que la déplétion de Ran résulte en une diminution de la tumorigenèse et que la formation éventuelle de tumeurs est associée à une sélection des cellules tumorales ayant la capacité de ré-exprimer la protéine Ran. Ces résultats suggèrent un rôle critique pour Ran dans la survie et la tumorigénicité des cellules du cancer ovarien, indiquant que Ran pourrait être une cible thérapeutique intéressante.

## **Abstract**

We previously identified that Ran protein, a member of the Ras GTPase family, is highly expressed in high grade and high stage serous epithelial ovarian cancers, and that its over-expression is associated with a poor prognosis. Ran is known to contribute to both nucleocytoplasmic transport and cell cycle progression, but its role in ovarian cancer is not well defined. Using a lentivirus-based tetracycline inducible shRNA approach, we show that down-regulation of Ran expression in aggressive ovarian cancer cell lines drastically affects cellular proliferation by inducing a caspase-3 dependent apoptosis. Using a xenograft tumor assay, we demonstrate that depletion of Ran results in decreased tumorigenesis, and eventual tumor formation is associated with the selection of tumor cells able to re-express the Ran protein. These results suggest a critical role for Ran in ovarian cancer cell survival and tumorigenicity and suggest that this critical GTPase may be suitable as a therapeutic target.

## Introduction

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynecological cancer in western countries [1,2]. Being largely asymptomatic, more than 70% of patients are diagnosed with advanced stage disease. Despite various modifications in ovarian cancer therapy, there has been very little progress in overall patient survival for the past 30 years and screening programs to detect early disease have not been successful to date [3]. Approximately 90% of ovarian cancers are of epithelial origin (EOC) and these tumors can be classified into different histopathologies, of which the serous histotype is the most common [4]. Low malignant potential serous tumors have a five years survival rate of 90-95%, whereas the survival rate for invasive serous cancers drops dramatically to 35-40% [3].

Using a molecular profiling analysis, we previously identified different genes that can distinguish between low malignant potential tumors and invasive EOC [5]. Among interesting candidates, we studied the expression of the Ras-related nuclear protein Ran [5] using an immunohistochemistry approach on an EOC serous tissue microarray. Ran over-expression was associated with higher tumor grade and advanced stage disease. Moreover, Ran was the most significant marker able to predict patient survival with the highest combination of sensitivity and specificity[6].

The Ran protein is a small GTPase of the Ras superfamily known to play different roles in normal cell physiology. One of its major functions is to regulate the nucleocytoplasmic transport of molecules through the nuclear pore complex [7,8]. It has been proposed that the unusual localization of oncogenes and/or tumor suppressor proteins can be affected by Ran signaling in different types of cancer [9]. Ran is also involved in cell cycle progression through the regulation of mitotic spindle formation [10]. Deregulation of this process may lead to genomic instability, which is common in EOC. Over-expression of Ran GTPase has also been observed in various other malignancies when compared to their normal tissue, including stomach, colon, pancreas, lung and kidney cancer [11,12]. These observations

indicate that the deregulation of Ran expression may be an important event in cell transformation or cancer progression [11].

To better understand the role of the Ran GTPase in ovarian tumorigenesis, we investigated the effects of Ran depletion in two aggressive EOC cell lines. Here, we show that loss of Ran expression led to cell death by a caspase-3 dependent apoptosis in vitro and in vivo. Downregulation of Ran was also associated with tumor regression in SCID mice. This study demonstrates that the expression of Ran is important for EOC cell survival and suggests that Ran may be a suitable therapeutic target for the treatment of ovarian cancers.

## Materials and methods

### *Cell culture and generation of cell lines expressing the Tetracycline repressor*

Two cell lines derived from aggressive EOC tumors were used to downregulate the expression of Ran. Both the TOV112D and TOV1946 ovarian cancer cell lines have been described [13,14] and are known to express high levels of Ran. Cells were grown as previously described, in OSE complete medium (Wisent, Montreal, Qc) containing 10% FBS, 2.5 µg/mL amphotericin B and 50 µg/mL gentamicin (Gibco, Grand Island, NY), at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> [13,14]. We generated stable cell lines expressing the tetracycline repressor (TetR) by transfection of the pcDNA6/TR vector (Invitrogen, cat. No. V1025-20, Carlsbad, CA) with Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). TOV112D TetR and TOV1946 TetR cell lines were grown in OSE complete medium supplemented with blasticidin. The tetracycline repressor was required to prevent basal target gene knockdown.

### *Construction of shRNA vector targeting RAN expression*

To knockdown the expression of Ran, we used the Block-it kit from Invitrogen. An oligonucleotide encoding a stem-loop structure targeting Ran was cloned in the pENTR/H1/T0 vector to generate an entry vector. The sequence of the oligonucleotide (5'-caccagaagaatcttcagtactattcgaaaatagtactgaagattcttc-3') was derived from an siRNA oligonucleotide previously shown to target Ran [15]. As a non-specific control, an shRNA targeting LacZ with the sequence: 5'-caccaaatcgcctgatttgtagtcggagacgactacacaaatcagcga-3' was used. An LR recombination between the entry vector and the pLenti X1 Puro DEST destination vector (694-6; Addgene #17297) was performed to obtain the final expression vector [16].

### *Lentiviral production and transfection*

The lentiviruses were produced by co-transfecting the pLenti X1 Puro DEST-shRNA vector and the ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) in the 293FT packaging cell line.  $2 \times 10^5$  cells per well were plated in 6-wells plate in 2 mL growth culture medium one day before transfection. Transfections were performed with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  polybrene on cells at 50-70% confluence. Media was changed 16h after the transfection and puromycin selection was added after two days.

### *Preparation of RNA and Real-Time RT-PCR*

Total RNA was extract from cells grown to 80% confluence in 100 mm Petri dishes using TRIzol<sup>TM</sup> reagent (Gibco/BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY). Cells expressing shRNA were induced three days before RNA extraction with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tetracycline. The quality of RNA was tested with the RNA 6000 nano LabChip kit using a 2100 bioanalyser (Agilent Technologies, Mississauga, ON).

Synthesis of cDNA was done using the QuantiTect Reverse Transcription Kit for RT-PCR (QIAGEN Inc., Mississauga, ON) according to the manufacturer's protocol, using 1  $\mu\text{g}$  of total RNA and 1  $\mu\text{L}$  of RT primer mix (oligo-dT and random primers). RNA samples were diluted 1:50 in water for the Q-RT-PCR reaction. The Q-RT-PCR was performed using the Rotor-gene 3000 Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Research, Montreal Biotech Inc., Montreal, Qc). 5  $\mu\text{L}$  of the sample cDNA was mixed with 10 pg of the primers and 12,5  $\mu\text{L}$  Quantitech<sup>TM</sup> SYBR Green PCR (QIAGEN Inc., Mississauga, ON) for a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . Negative controls were done in all experiments and ERK-1 served as the control. Experiments were repeated twice. Sequence of the primers were: Ran 5'-agccccaggtccagttcaaac-3' and 5'atggcacactgggcttgata-3', and ERK-1 5'-gcgctggetcaccctacct-3' et 5'-gccccaggtgcagagatgctc-3'. To measure the relative quantity of gene expression, the Pfaffl analysis method was used [17].

### *Antibodies*

The following antibodies were used for western blotting and immunohistochemistry analysis: anti-Ran goat polyclonal (sc-1156, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-cleaved Caspase-3 (Asp175) rabbit polyclonal (#9661, Cell signaling Technologies, Beverly, MA), anti-Ki67 rabbit polyclonal (RM 9106, NeoMarkers, Montreal, Qc) and anti- $\beta$ -actin (AC15, Abcam, Cambridge, MA).

### *Western blotting analysis*

Equal amount of total protein extracts were loaded and electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and transferred on a nitrocellulose or PVDF membrane. The membranes were blocked with 5% milk and probed with primary antibodies. Used dilutions were 1:500 for Ran and 1:250 for cleaved caspase-3. Each primary antibody was detected with a secondary antibody-HRP conjugated and visualized by the enhanced chemiluminescence (ECL) method. Loading control of the samples was confirmed by reprobing membranes with anti-actin.

### *Cellular growth*

Cells were induced with 1  $\mu$ g/mL tetracycline three days prior plating cells (day 0). On day 0,  $2 \times 10^5$  cells were seeded onto 6-well plates. Cells were trypsinized, resuspended in media and counted using a hemacytometer every 24 h for the 5 following days. Each experiment was performed in duplicate and was repeated three times.

### *Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )*

$\Delta\Psi_m$  was measured by loading cells with tetramethylrhodamine ethylester (TMRE), a cell permeable, cationic, non toxic fluorescent dye that specifically stains live mitochondria. TMRE is accumulated specifically by the mitochondria in proportion to membrane potential [18]. Briefly, cells induced with 1  $\mu$ g/mL tetracycline for different time were

incubated with 1,25  $\mu$ M TMRE (cat. no 87917, Fluka, St. Louis, MO) for 20 minutes at 37°C. Cells were then trypsinized, washed 4 times with phosphate buffered saline (PBS), resuspended in 500  $\mu$ L of PBS and analyzed with the FL2 channel of a Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer.

#### *Nuclear apoptosis detection*

Frequency of hypoploid cells (sub-G1) was quantified by flow cytometry after staining the cells with propidium iodide (PI). Briefly, cells induced with 1  $\mu$ g/mL tetracycline for different times were washed and fixed with 70% cold ethanol for 1 h at 4°C and stored at -20°C until staining was performed. Cells were incubated 30 minutes at room temperature with 500  $\mu$ L of PBS containing 250  $\mu$ g of RNase A (Roche, Mississauga, ON). 50  $\mu$ g/mL of PI (P-4864, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added and incubated for 10 more minutes at room temperature. Cells were analyzed with the FL3 channel of a Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer.

#### *Mice and tumor formation*

Six week old female SCID CB17 mice (Charles River, Montreal, QC) were injected with  $1 \times 10^6$  cells suspended in a mix of 50:50 PBS and matrigel (BD Biosciences, Mississauga, ON) at subcutaneous sites. Doxycycline-supplemented food (625 mg/kg) (Harlan, Indianapolis, IN) was given from day 9 in experimental groups and control groups continued to receive normal food. One tumor from each group of seven mice was collected in formalin on day 0, 3 and 6 of the doxycycline-supplemented food and two tumors per group of mice were collected at the moment of the sacrifice. Data on weight of the mice and dimensions of the tumors were collected twice a week. Animals were housed under sterile conditions during all experimentations and were sacrificed before neoplastic masses reached limit points established by the Institutional Committee on Animal Protection (CIPA) according to the Canadian Council on Animal Care.

*Immunohistochemistry analysis*

Tumors collected from mice were embedded in paraffin after two days of formalin fixation at 4°C. A tissue microarray (TMA) was constructed from the xenograft blocks. Two punches of 0.6 mm diameter were taken from each tumor. The TMA was cut with a 4 µm thickness, sectioned onto glass slides, and stained by an immunoperoxidase method. Briefly, TMA slides were heated at 60°C for 20 minutes, deparaffinized in xylene and rehydrated in an ethanol gradient. Slides were then submerged in citrate buffer (pH 6.0) and heated under pressure (Cuisinart Pressure Cooker) for 15 minutes to unmask antigens. Following a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment to eliminate endogenous peroxidase activity, slides were blocked with a protein blocking reagent (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) for 15 minutes at room temperature. Section was incubated with primary antibodies for 60 minutes at room temperature. Tissues were incubated with secondary antibodies horseradish peroxidase (HRP) conjugated (Santa-Cruz, Santa Cruz, CA) for 20 minutes at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Substitution of the primary antibody with PBS served as negative control.

*Statistical analysis*

For statistical analysis, Mann-Whitney U-tests were carried out using SPSS software (version 16.0). P-value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### *Ran expression in transfected cells.*

We have previously shown that Ran GTPase is over-expressed in invasive serous EOC as compared to low malignant potential serous tumors [6]. To better understand the role of Ran in ovarian tumorigenesis, we downregulated its expression using a lentivirus-based inducible short-hairpin RNA (shRNA) strategy in two aggressive EOC cell lines derived in our laboratory (Fig. 1) [13,14]. TOV112D is derived from a high grade endometrioid tumor and has been extensively characterized [14]. TOV1946 originates from a high grade serous carcinoma, which is the most common histotype of EOC. Transfection of the pcDNA 6/TR generated clonal derivatives of these cell lines expressing the tetracycline repressor (TetR), which allows the inducible expression of the shRNA when tetracycline is added to the media, thus preventing basal target gene knockdown. After transfection of the pLenti-X1 Puro DEST vector containing the shRNA sequence specific to Ran or LacZ (as a control) in cells, we generated mix populations and different independent clones of TOV112D TetR and TOV1946 TetR expressing shRNA Ran or LacZ. Q-RT-PCR (Figure 1A and 1B) as well as immunoblot (Figure 1C and 1D) assays showed decreased Ran expression in both mix populations and clones expressing shRNA specific to Ran after induction. Despite some variation seen by Q-RT-PCR in Ran expression after induction of the control shRNA LacZ (Fig. 1A and 1B), no variation in protein expression was observed (Fig. 1C and 1D).

### *Effects of Ran downregulation on cellular proliferation*

We measured cellular proliferation of TOV112D TetR and TOV1946 TetR transfected with shRNA Ran in order to examine if cellular growth was affected by the loss of Ran. Cells expressing shRNA Ran or LacZ were induced with 1 µg/mL tetracycline three days prior to being seeded. We noted a significant decrease in cellular proliferation in both the mixed population and the clones with reduced Ran expression in comparison to their non-induced

counterparts (Fig. 2A and 2B). Induction of the shRNA LacZ did not affect cell proliferation (Fig. S1).

*Loss of Ran expression triggers apoptosis in EOC cells.*

After induction of shRNA expression, cells depleted for Ran were round and tended to detach from the culture surface, a morphology characteristic of apoptotic cells (Fig. 2C and 2D). Moreover, cell number decreased during shRNA Ran induction (Fig. 2A and 2B). In order to determine if these cells were dying of apoptosis, we used propidium iodide (PI) to analyze the DNA content of the cells induced with tetracycline for different time periods and examined the sub-G1 population. Sub-G1 cells represent hypodiploid DNA typically associated with late apoptosis or necrosis [19]. Since the different clones expressing shRNA Ran all behaved similarly, we conducted experiments with one representative clone in addition to the mixed population. We observed a rapid sub-G1 peak after tetracycline induction in TOV112D TetR shRNA Ran, and a similar sub-G1 peak appeared although more slowly in TOV1946 TetR cells (Fig. 3A and 3B). The proportion of sub-G1 fragments was comparable in mixed populations and clones, but was greater in the TOV112D TetR shRNA Ran than in the TOV1946 TetR shRNA Ran. No increase in the sub-G1 fraction was observed at any time in the shRNA LacZ controls (Fig. 3A and B).

Sub-G1 DNA is generated by late apoptotic or necrotic cells. To confirm that cells had undergone apoptosis and not necrosis following Ran depletion, we examined caspase-3 activation, a key downstream step in the apoptosis pathway [20]. After three days of induction with tetracycline, caspase-3 was cleaved in mixed populations and clones expressing shRNA Ran in both cell lines (Fig. 3C and 3D). We assayed caspase-3 cleavage under different induction time periods, and observed that the cleavage appeared on western blot after 60 h in both cell lines, and a slight band was apparent after 48 h induction of the clone shRNA Ran in both cell lines (Fig. 3E and 3F). Therefore, the caspase-3 cleavage appears before the sub-G1 cells population in both cell lines. No cleavage of the caspase-3 was observed in the controls.

Mitochondria play a key role in the regulation of apoptosis and depolarization of the outer mitochondrial membrane is a point of no return in the apoptotic cascade [21,22]. Using tetramethylrhodamine ethylester (TMRE), we assayed the outer membrane depolarization and noted that, in both cell lines, decrease Ran expression resulted in a reduction of the outer membrane potential, observable after 48-60 h (Fig. 3G and 3H). This membrane potential reduction was not seen in control shRNA LacZ. Thus, apoptosis was triggered between 48-60 h after Ran depletion in both cell lines, indicating that loss of Ran expression promotes caspase-3 dependant apoptosis.

#### *Knockdown of Ran causes regression of tumors in vivo*

We showed that EOC cells are dependant on Ran expression to survive in vitro. In order to understand if Ran is also important for tumor cell survival in vivo, we injected TOV112D TetR cells containing inducible shRNA in SCID mice. After nine days, tumors reached 150 mm<sup>3</sup> in average and mice started to receive doxycycline-supplemented food to induce shRNA expression in tumor cells. Loss of Ran expression in tumors expressing mixed population shRNA Ran resulted in a small delay in tumor growth and the difference in tumor size was only statistically significant at day 19 (Fig. 4A). In mice injected with cells containing an inducible clone of shRNA Ran, tumor growth was delayed for several days after induction of the shRNA expression and tumor size were statistically different at every measure after day 15. Mice were sacrificed when tumor reached 2300 mm<sup>3</sup>. All mice of the clone shRNA Ran non-induced group were sacrificed by day 27, while in the group where shRNA Ran was expressed, the last mouse was sacrificed at day 54. No major difference was observed in tumor volume between the induced and non-induced group of mice expressing shRNA LacZ in mixed populations or clones (Fig. S2). At day 0, 3 and 6 after shRNA induction and at the day of sacrifice, one mouse of each group was sacrificed to analyze tumor histology. Analysis of Ran protein expression by immunohistochemistry demonstrated a reduced expression in shRNA Ran mice after 6 days of induction with the doxycycline-supplemented food (Fig. 4B). In these tumors, we noted the presence of cleaved caspase-3, which was absent in the controls and Ki67 staining showed that nuclear

localization of the protein was impaired when Ran was downregulated (Fig. 4B). Analysis of the tumors of the mice shRNA Ran/doxycycline-supplemented food group at day of sacrifice showed that Ran levels were comparable to controls (Fig.4B). Despite the fact that tumors from shRNA LacZ mixed population grew faster than the clone, no differences were seen in shRNA LacZ with or without induction (Fig. S3). These results not only suggest that reduced expression of Ran is associated with tumor growth inhibition, but also suggest a strong selection pressure for Ran expression in those tumors that eventually develop in mice.

## Discussion

We previously showed that Ran GTPase is over-expressed in invasive EOC in comparison to low malignant potential tumors and its expression was associated with a poor prognosis in patients with invasive EOC [6]. Ran was also described as over-expressed in several other cancers [11,12,23,24]. In this study we demonstrated, using an shRNA approach, that Ran is essential for EOC cell survival as decrease in its expression resulted in caspase-3 dependent apoptosis.

We showed here that downregulation of Ran not only affects cellular proliferation but also results in decreased cell numbers. This result is in line with other studies, which showed that Ran depletion in cancer cells, using shRNA or siRNA, was associated with inhibition of cell growth and cell death [12,24]. We also noted that reduction of proliferation was correlated with Ran expression level in the cells. For example, tetracycline induction of clone shRNA Ran #3 / TOV1946 TetR only resulted in partial reduction in Ran expression and the effect on the proliferation was more modest when compared to clones 1 and 2, where Ran inhibition is stronger.

When inhibiting Ran expression, cells were dying of apoptosis. However, Ran plays many essential roles in the cell and we do not know which one of these functions of Ran could be responsible for the ovarian tumor cells death. On one hand, deregulated transport of several proteins has already been observed in cancer cells, such as NF $\kappa$ B, AKT, p53, PTEN and other tumor suppressors or oncogenes [9]. Moreover, localization of different essential proteins for the cell cycle progression, such as cyclins, is regulated by Ran and its regulators [25]. On the other hand, Ran also regulates progression of the cell cycle and mitosis, and deregulation of these processes can lead to cell death.

Because Ran is important for mitotic progression, we analyzed the effect of shRNA expression on cell cycle. We did not observe an arrest of the cells in any phase of the cell cycle. As our cell line bears wild-type K-Ras, this result is in line with a recent study which

showed that downregulation of Ran in human colon cancer cells provoked S-phase arrest in K-Ras mutated cell line, but not in cells that express wild-type K-Ras [15]. However, here we noted an increase in the sub-G1 phase, indicating a possible apoptosis following Ran depletion, that was not observed in the colon cancer cell lines also analyzed with propidium iodide [15]. This may be explained by the fact that they tested the cell cycle after 48 h of Ran depletion, and there was only a slight difference in the sub-G1 cells proportion for TOV112D TetR at this time point, while there was no difference in TOV1946 TetR. Nevertheless, the induction of apoptosis in colon cancer cells was noted by a caspase-3 activation assay after 72 h, showing that Ran downregulation leads to a caspase-3 dependant apoptosis in both systems. The fast induction of apoptosis and the extent of the response of the ovarian cancer cells to Ran depletion suggest a particular sensitivity of ovarian cancer cells to the loss of Ran.

Ran depletion seems to affect cell viability in a variety of cancer cells. In fact, inhibition of Ran expression in ovarian, colon, breast, renal and nasopharyngeal tumor cells leads to growth inhibition and/or cell death [12,15,24]. In 2008, the group of Xia and al. showed that Ran inhibition with siRNA for 72h in normal fibroblasts was well tolerated, and does not induce mitotic defects or loss of cell viability [12].

As Ran depletion showed a dramatic effect on proliferation in vitro, we were interested in the effect of its downregulation in vivo. All TOV112D TetR cell line formed tumors when injected sub-cutaneously in mice, which indicates that the repressor did not impair the capacity of these cells to grow as xenografts in a murine model. When induced, shRNA targeting Ran resulted in a clear delay in tumor outgrowth and was associated with the induction of apoptosis within the tumors, as seen by a cleaved caspase-3 staining of the tumors. In addition, this delay was most evident when suppression of Ran was highest. These results are in line with a study where siRNA was used to downregulate Ran in a murine neuroblastoma model [26]. This group showed that Ran depletion in mice resulted in a reduced tumor growth and was also associated with the induction of apoptosis in tumor cells. When working in vivo, it is likely that selective pressure resulted in the outgrowth of

cells able to escape Ran depletion. Indeed, the initial observation of Ran expression following induction, compared to its high expression in the eventual tumors which formed, support this notion. In the shRNA Ran mixed population, the small growth delay can be due to induction of shRNA Ran in some cells, but since the cells with high Ran expression grow faster than those without Ran, the effect of the induction of the shRNA was rapidly lost. In line with this hypothesis, the immunohistochemistry of these tumors 6 days after induction showed only a slight decrease of Ran expression in contrast to the inhibition seen in tumors derived from the clonal populations.

It has already been shown that Ran GTPase is involved in host innate immune response [27]. In transgenic mice overexpressing Ran, nuclear accumulation of c-Jun and c-Fos (AP-1 factors) in T cells is reduced, leading to diminished cytokines secretion, decreased proliferation and impaired in vivo T cell functions [28]. Thus, Ran plays important regulatory functions in T-cell activation.

It has recently been shown that Ran over-expression in human glioblastoma cells increase their resistance to paclitaxel treatment. In these cells, Ran can inhibit Bcl-2 phosphorylation and thereby suppress paclitaxel-induced apoptosis [29]. In EOC, gold standard treatment is carboplatine/paclitaxel [30]. Unfortunately, only 60-80% of women treated with these drugs respond to the first-line treatment and the majority will relapse [31]. Here, we showed that depletion of Ran as a major impact on apoptosis of EOC cells. Therefore, Ran could be a player in the resistance of EOC cells by allowing the bypass of paclitaxel-induced apoptosis. Moreover, downregulation of Ran has been shown to induce aberrant mitotic formation, mitochondrial dysfunctions and apoptosis in tumor cells, while normal cells were not affected by the loss of Ran [12]. Together, these results highlight the potential of Ran as a therapeutic target.

In conclusion, we demonstrated in this study that Ran GTPase is essential for EOC cells survival in vitro and in vivo. Ran downregulation triggers a caspase-3 dependent apoptosis and causes a delay in tumors outgrowth. These results suggest that Ran could be a suitable therapeutic potential target in ovarian cancer.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Lise Portelance, Manon de Ladurantaye, Kim Leclerc-Desaulniers and Jason Madore for technical assistance. We thank Jason Madore for thoughtful comments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to A.-M.M.-M., P.N.T. and D.M.P. V.B. and V.O. were supported by Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal and V.O. was supported by a studentship from the CIHR.

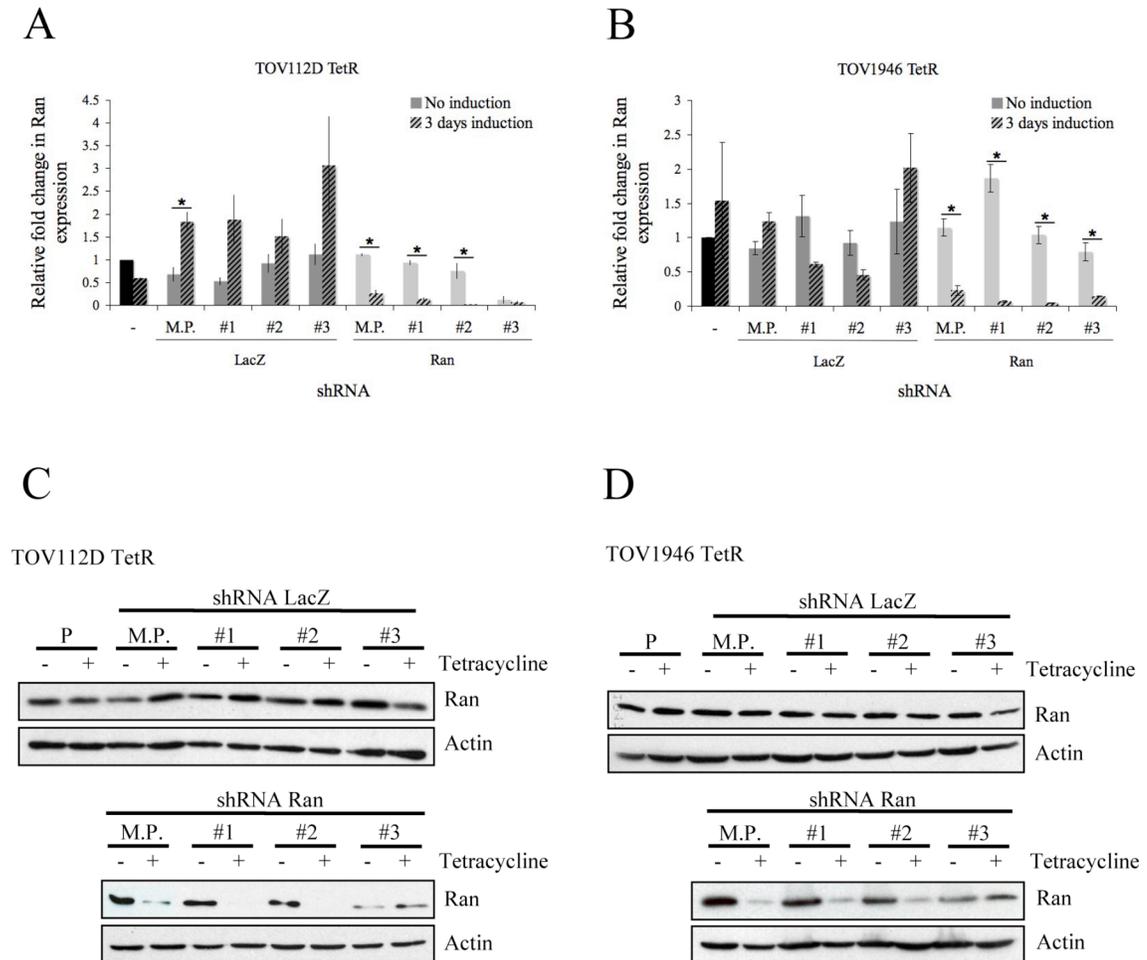
## References

1. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Worldwide patterns of cancer mortality, 1990-1994. *Eur J Cancer Prev* 1999;8(5):381-400.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80(6):827-841.
3. Colombo N, Van Gorp T, Parma G et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;60(2):159-179.
4. Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG. Ovarian carcinogenesis and the biology of ovarian surface epithelium. *J Cell Physiol* 1997;173(2):261-265.
5. Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM et al. Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 2005;24(29):4672-4687.
6. Ouellet V, Guyot MC, Le Page C et al. Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006;119(3):599-607.
7. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72(13):1439-1457.
8. Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(3):195-208.
9. Kau TR, Way JC, Silver PA. Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer* 2004;4(2):106-117.
10. Clarke PR, Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(6):464-477.
11. Azuma K, Sasada T, Takedatsu H et al. Ran, a small GTPase gene, encodes cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes capable of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(19):6695-6702.
12. Xia F, Lee CW, Altieri DC. Tumor cell dependence on Ran-GTP-directed mitosis. *Cancer Res* 2008;68(6):1826-1833.

13. Ouellet V, Zietarska M, Portelance L et al. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer* 2008;8:152.
14. Provencher DM, Lounis H, Champoux L et al. Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000;36(6):357-361.
15. Morgan-Lappe SE, Tucker LA, Huang X et al. Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res* 2007;67(9):4390-4398.
16. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 2009;4(8):e6529.
17. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
18. Zhou K, Zhang L, Xi J, Tian W, Xu Z. Ethanol prevents oxidant-induced mitochondrial permeability transition pore opening in cardiac cells. *Alcohol* 2009;44(1):20-24.
19. Lecoq H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp Cell Res* 2002;277(1):1-14.
20. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 ( Pt 1):1-16.
21. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 2006;13(8):1396-1402.
22. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281(5381):1309-1312.
23. Abe H, Kamai T, Shirataki H, Oyama T, Arai K, Yoshida K. High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122(10):2391-2397.
24. Li H, Ren CP, Tan XJ et al. Identification of genes related to nasopharyngeal carcinoma with the help of pathway-based networks. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2006;38(12):900-910.
25. Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 1998;12(14):2131-2143.

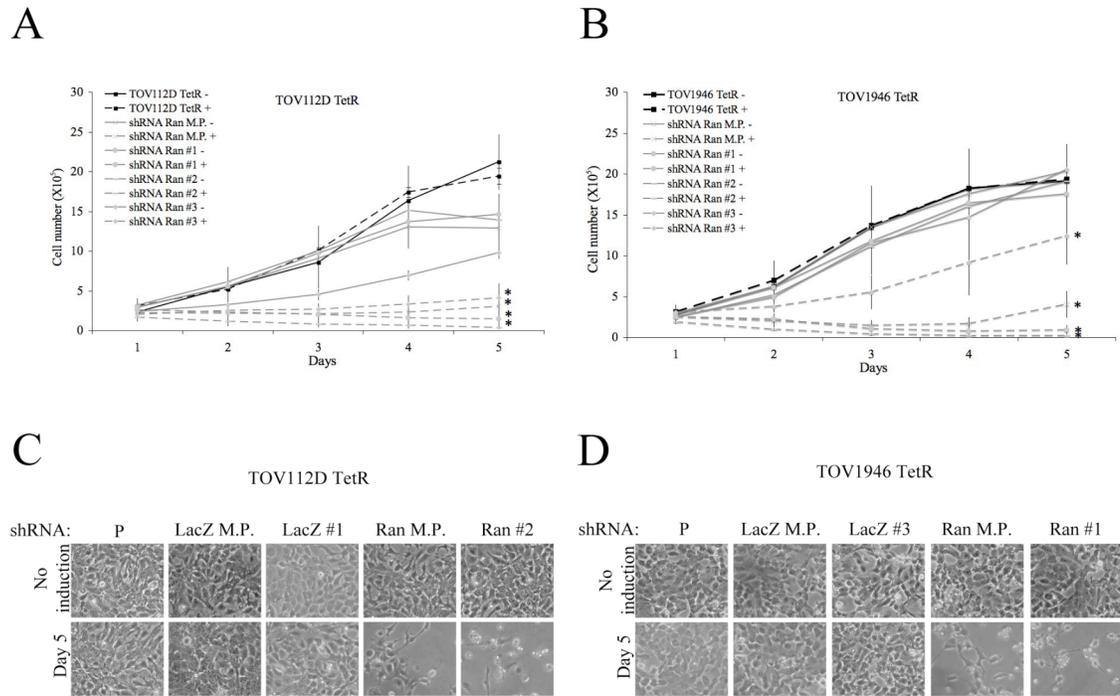
26. Tietze N, Pelisek J, Philipp A et al. Induction of apoptosis in murine neuroblastoma by systemic delivery of transferrin-shielded siRNA polyplexes for downregulation of Ran. *Oligonucleotides* 2008;18(2):161-174.
27. Chung SW, Huang XY, Song J, Thomas R, Wong PM. Genetic immune modulation of Ran GTPase against different microbial pathogens. *Front Biosci* 2004;9:3374-3383.
28. Qiao X, Pham DN, Luo H, Wu J. Ran overexpression leads to diminished T-cell responses and selectively modulates nuclear levels of c-Jun and c-Fos. *J Biol Chem* 2009.
29. Woo IS, Jang HS, Eun SY et al. Ran suppresses paclitaxel-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Apoptosis* 2008;13(10):1223-1231.
30. Sugiyama T, Konishi I. Emerging drugs for ovarian cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008;13(3):523-536.
31. Collinson F, Jayson G. New therapeutic agents in ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21(1):44-53.

Figure 1



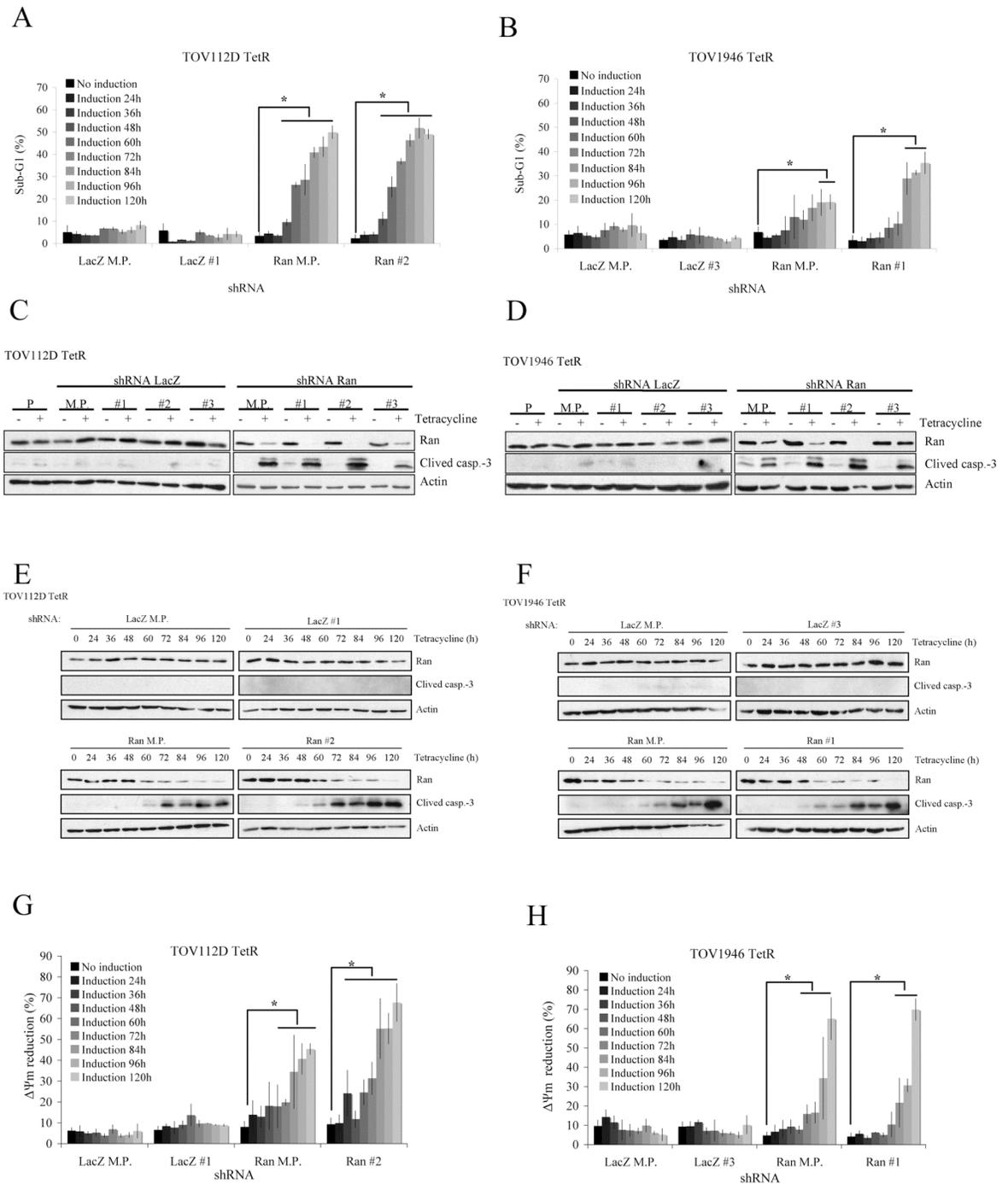
**Fig. 1 Ran expression in parental cell lines, mix populations and clones.** Comparison of Ran mRNA levels by Q-RT-PCR in TOV112D TetR (a) and TOV1946 TetR (b) parental cell lines, shRNA Ran or LacZ mix populations and clones. Levels were normalized to parental cell line without induction. Values represent the mean  $\pm$  SD of two experiments in duplicate. Western blot analysis of TOV112D TetR (c) and TOV1946 TetR (d) parental cell lines, mix populations and clones shRNA Ran or LacZ without and after three days of induction.  $\beta$ -actin was used as loading control. P: Parental cell line, M.P.: Mix population, #1, #2 and #3: independent clones. Mann Withney test indicates a significant difference with a p-value  $< 0.05$  (\*).

Figure 2



**Fig. 2 Effect of Ran depletion on proliferation.** Growth curves for TOV112D TetR (a) and TOV1946 TetR (b) parental cell lines, mix populations and clones expressing shRNA Ran. Cells were induced with tetracycline three days prior to day 0. Cells were trypsinized and counted every 24 h for five days. Values represent mean  $\pm$  SD of duplicate wells from three independent experiments. Cellular morphology of TOV112D TetR (c) and TOV1946 TetR (d) on day 5 of the growth curve. Loss of Ran GTPase expression results in cell number reduction and round shaped cells. All pictures were taken at 100X magnification. P: Parental cell line, M.P.: Mix population, #1, #2 and #3: independent clones. Mann Withney test indicates a significant difference relative to the non-induced parental cell line with a p-value  $< 0.05$  (\*). There was no significant difference between the different non-induced cells.

Figure 3

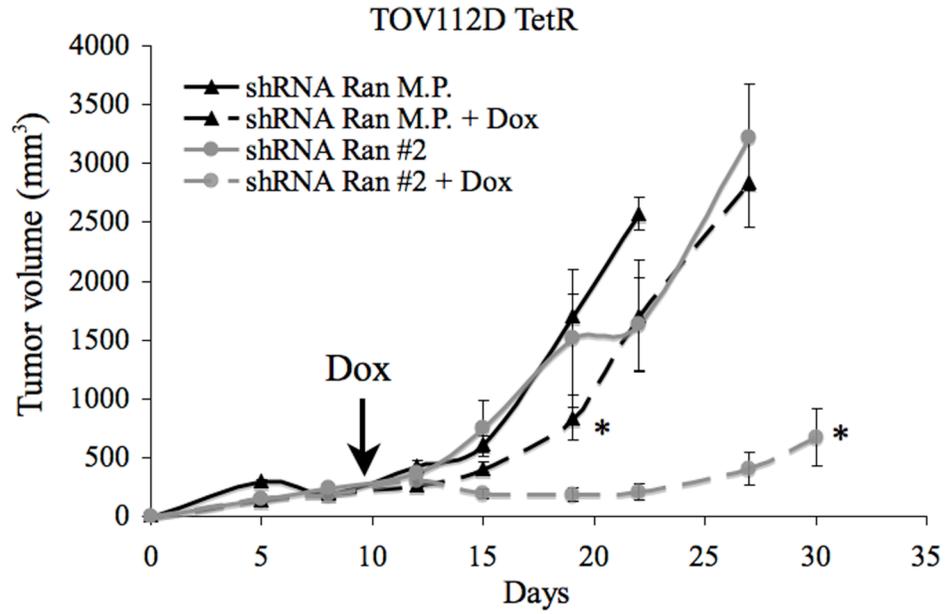


**Fig 3 Loss of Ran expression results in a caspase-3 dependant apoptosis in ovarian cancer cell lines.**

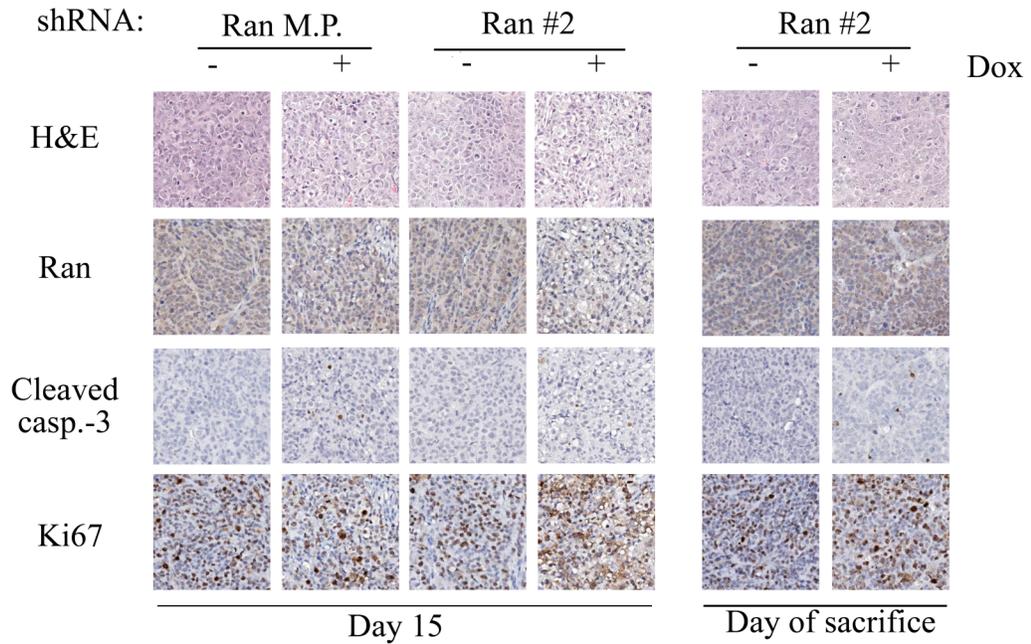
**Fig 3 Loss of Ran expression results in a caspase-3 dependant apoptosis in ovarian cancer cell lines.** TOV112D TetR (a) and TOV1946 TetR (b) parental cell lines, mix populations and clones expressing shRNA LacZ and Ran were induced with tetracycline for the indicated times and then fixed in 70% ethanol. Cells were treated with propidium iodide and sub-G1 peaks were quantified by flow cytometry. Values represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Western blot analysis showing caspase-3 cleavage in cell depleted in Ran expression after 3 days of induction in TOV112D TetR (c) and TOV1946 TetR (d). Kinetic of caspase-3 cleavage by western blot analysis in TOV112D TetR (e) and TOV1946 TetR (f) parental cell lines, mix populations and clones expressing shRNA LacZ and Ran. TOV112D TetR (g) and TOV1946 TetR (h) parental cell lines, mix populations and clones expressing shRNA LacZ and Ran were induced with tetracycline for the indicated time and then treated with TMRE for 20 minutes.  $\Delta\Psi_m$  reduction was measured by flow cytometry. Values represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. P: Parental cell line, M.P.: Mix population, #1, #2 and #3: independent clones. Mann Withney test indicates a significant difference relative to the non-induced sample with a p-value  $<0.05$  (\*).

Figure 4

A

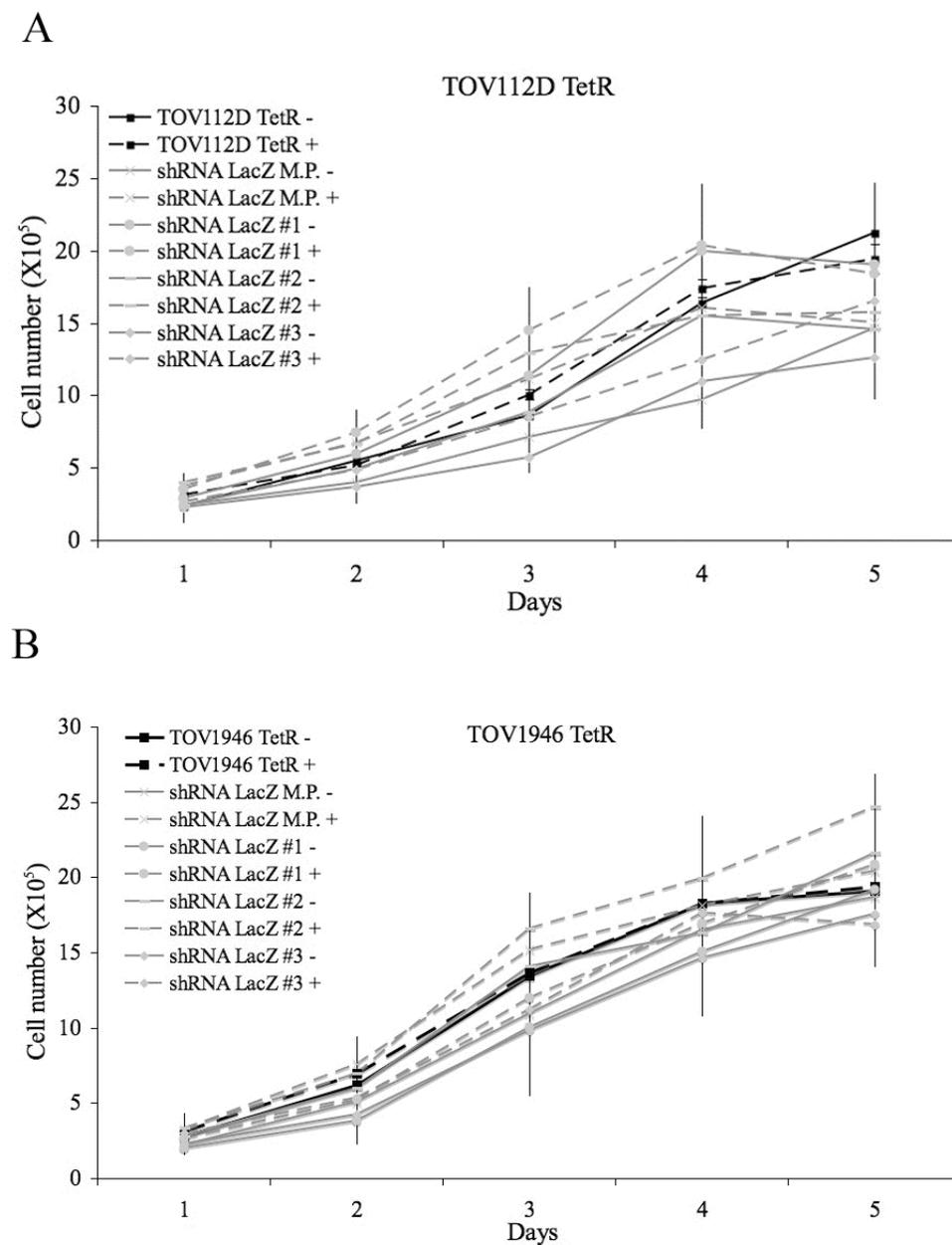


B

Fig. 4 Loss of Ran expression results in tumor regression *in vivo*.

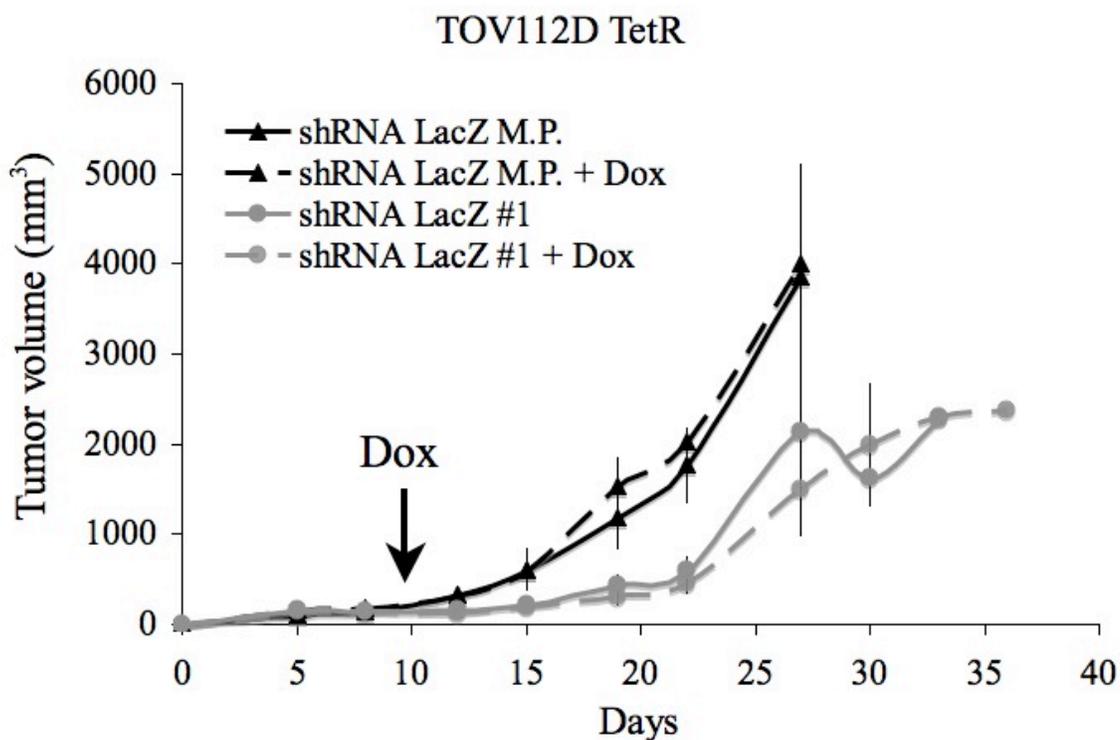
**Fig. 4 Loss of Ran expression results in tumor regression *in vivo*.** (a) TOV112D TetR mix population and clone expressing shRNA Ran were subcutaneously injected in SCID mice and tumor growth was measured biweekly. All mice developed tumors albeit of varying size and tumor volume. Doxycycline-supplemented food inducing shRNA expression started at day 9. M.P: Mix population, Ran #2: clone. Values represent mean  $\pm$  SE of groups of 4 mice. Mann-Whitney test indicates a significant p-value  $<0.05$  (\*). (b) Immunohistochemistry analysis of the xenografts on day 6 of the doxycycline-supplemented food showing morphological hematoxylin eosin (HE) staining and Ran, cleaved caspase-3 and Ki67 expression.

Figure S1



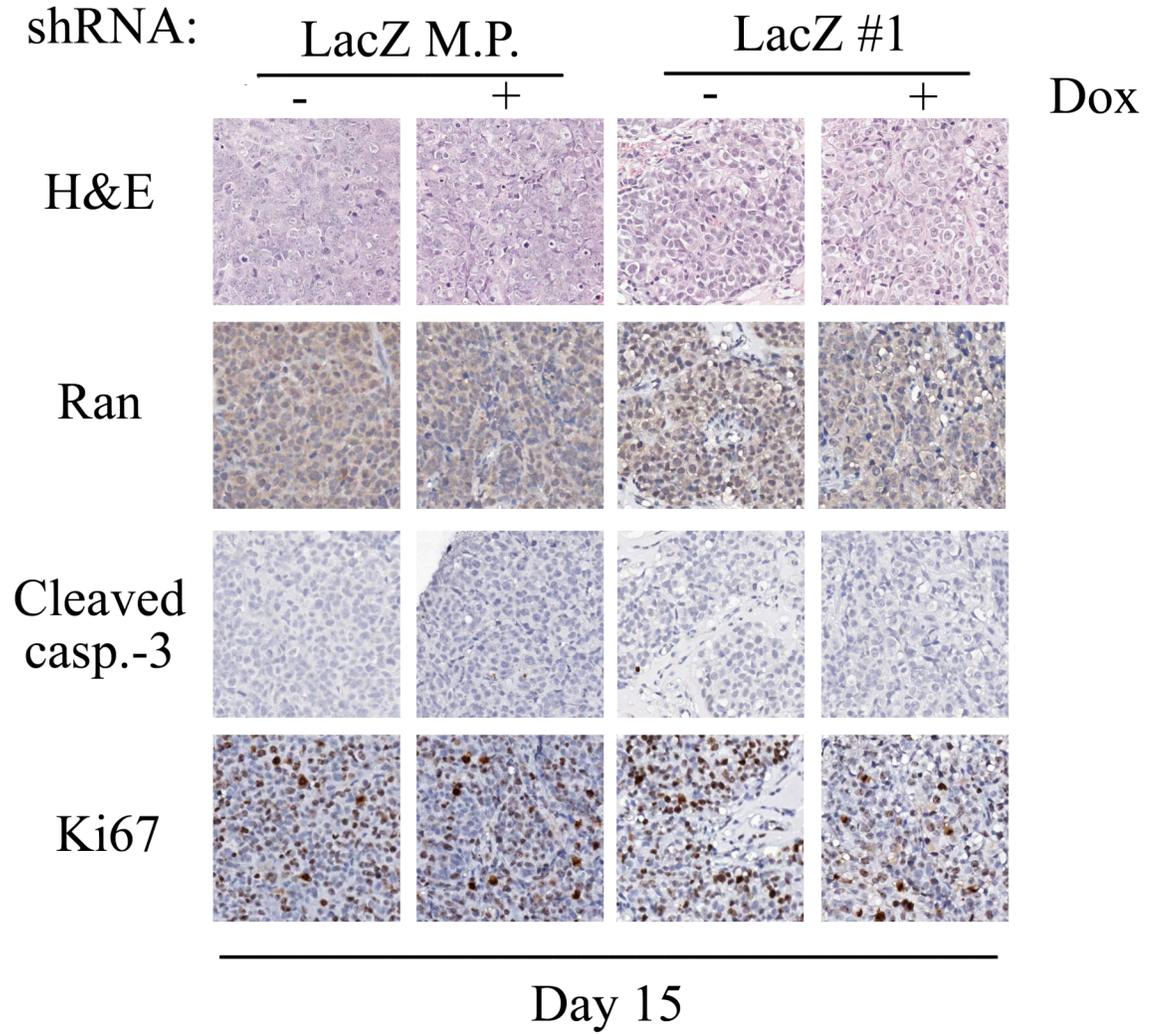
**Fig. S1 Effect of Ran depletion on proliferation.** Growth curves for TOV112D TetR (a) and TOV1946 TetR (b) parental cell lines, mix populations and clones expressing shRNA Ran or LacZ. Cells were induced with tetracycline three days prior to day 0. Cells were trypsinized and counted every 24 h for five days. Values represent the mean  $\pm$  SD of duplicate wells from three independent experiments. Mann-Whitney test indicates no significant difference relative to the non-induced parental cell line with p-value  $<0.05$ .

Figure S2



**Fig S2 Tumor growth of mice injected with TOV112D TetR shRNA LacZ.** TOV112D TetR mix population and clone expressing shRNA LacZ were subcutaneously injected in SCID mice and tumor growth was measured biweekly. All mice developed tumors albeit of varying size and tumor volume. Doxycycline-supplemented food inducing shRNA expression started at day 9. M.P.: Mix population, #1: clones. Values represent the mean  $\pm$  SE of groups of 4 mice. Mann-Whitney test indicates no significant difference relative to the group of mice that did not received doxycycline, with a p-value  $<0.05$ .

Figure S3



**Fig. S3 Immunohistochemistry analysis of the xenografts in control tumors.** Analysis of the xenografts on day 6 of the doxycycline-supplemented food showing morphological hematoxylin eosin (HE) staining and Ran, cleaved caspase-3, and Ki67 expression.

## **CHAPITRE 3 : DISCUSSION**

### **3.1 Expression différentielle de Ran suite à l'induction à la tétracycline**

La protéine Ran a été identifiée dans notre laboratoire comme candidat pouvant distinguer les tumeurs ovariennes à faible potentiel de malignité des cancers invasifs. Une analyse sur microétagage de tumeurs de l'ovaire séreuses a confirmé ce résultat, en plus de montrer qu'une forte expression de Ran corrèle avec les tumeurs de haut stade et de haut grade et avec un mauvais pronostic [96]. Par ailleurs, dans une étude comparant l'expression de Ran entre les tissus normaux et les tissus tumoraux du rein, un groupe japonais a démontré qu'une forte expression de la GTPase était associée à l'invasion locale et à la formation de métastases, à un haut grade tumoral et à une mauvaise survie [124]. Différentes études ont aussi montré une surexpression de Ran dans les tissus tumoraux lorsque comparés aux tissus normaux correspondants, notamment dans les tumeurs du poumon, du pancréas, du colon, du rein, du nasopharynx et de l'estomac [120-122]. Cette fréquente surexpression de Ran dans les cancers laisse présumer un rôle de la GTPase dans la tumorigénèse.

Afin d'étudier l'implication de Ran dans l'oncogénèse des tumeurs ovariennes, deux lignées agressives du cancer de l'ovaire ont été utilisées pour dériver des populations mixtes et des clones sous-exprimant la protéine Ran. Les clones offrent l'avantage de pouvoir être étudiés à long terme et de ne pas varier au fil du temps. Cependant, la méthode d'insertion des shRNA dans les cellules ne permet pas de diriger l'intégration de l'ADN à un site précis du génome. Ainsi, certains des effets observés lors des expériences pourraient être dus à l'intégration du shRNA dans un gène important ou dans des régions qui affectent l'expression d'autres gènes. Pour contrer cet effet clonal, plusieurs clones indépendants sont utilisés lors des essais, en plus de la population mixte. La population mixte permet aussi d'éviter l'effet clonal, mais a le désavantage de ne généralement pas pouvoir être

utilisée à long terme. Si l'introduction de l'ADN ou de la protéine étudié altère un comportement cellulaire, par exemple la survie ou la croissance cellulaires, la population variera au fil du temps. L'utilisation d'un système inductible permet de prolonger l'étude d'une population mixte, mais puisque les systèmes ne sont pas complètement étanches, la population mixte évolue tout de même au cours du temps.

L'analyse des taux d'ARNm des clones et de la population mixte shRNA Ran montre que l'induction à la tétracycline permet bien de réduire la quantité d'ARNm Ran. La quantité d'ARNm Ran varie dans les contrôles shRNA LacZ. Ces variations sont cependant non significatives, à l'exception de la population mixte TOV112D TetR, et peuvent être simplement dues à la présence de la tétracycline. Malgré cela, la quantité de protéines exprimées dans les contrôles shRNA LacZ ne varie pas, et ce dans les deux lignées cellulaires. Puisque c'est la quantité de protéines présentes dans la cellule, plus que le taux d'ARNm produits, qui influe sur le comportement cellulaire, nous pouvons donc affirmer que la simple présence d'un shRNA dans les cellules n'affecte pas la quantité de Ran. Dans les cellules shRNA Ran, la diminution de l'expression de Ran est similaire à ce qui est observé en ARNm.

### **3.2 Prolifération des cellules sous-exprimant Ran**

En 2006, un groupe de recherche a mené une étude sur les gènes différentiellement exprimés entre les tissus normaux et les tissus tumoraux du nasopharynx [122]. La GTPase Ran a été remarquée pour sa surexpression dans les tissus tumoraux. La comparaison de l'expression protéique de Ran entre les différents tissus a montré que cette protéine est surexprimée dans 80% des tumeurs du nasopharynx. Par un essai MTT, visant à analyser la prolifération cellulaire, ce groupe a montré que la sous-expression de Ran par shRNA inhibait la croissance des cellules tumorales [122]. Une équipe américaine a aussi testé l'effet de la diminution de l'expression de Ran, cette fois dans les lignées du cancer du sein MDA-MB-468, du cancer du côlon DLD-1 et du cancer du poumon à cellules non-petites H1299. Ils ont montré que, dans ces trois lignées, un traitement de 72 h avec un

siRNA ciblant Ran provoquait une diminution de 60-70% de la survie cellulaire. Ils avaient initialement identifié Ran par un criblage de siRNAs causant la mort cellulaire. Lors de leur étude, cette équipe a utilisé quatre différentes séquences de siRNAs, chacune diminuant l'expression de Ran. Ils ont ainsi pu démontrer que l'effet observé n'est pas dû à une séquence spécifique, mais bien au ciblage de Ran [125]. La séquence du shRNA utilisée lors de nos expériences a d'ailleurs été dérivée de la séquence de l'un de ces quatre siRNAs. Deux des quatre séquences ont été testées et un seul de ces deux shRNA réprimait l'expression de Ran. C'est donc ce shRNA qui a été utilisé pour les travaux présentés.

Dans notre modèle d'étude, l'induction de l'expression des shRNAs par la tétracycline provoque une diminution de la croissance cellulaire dans les cellules dont l'expression de Ran est diminuée. Dans les clones qui montrent une délétion presque totale de l'expression de Ran, le nombre de cellules diminue de jour en jour, ce qui indique que la perte de Ran pourrait affecter la survie cellulaire en plus de ralentir la croissance. Lors des expériences de prolifération, les cellules étaient traitées à la tétracycline trois jours avant d'être comptées et mises en plaques. De cette façon, les cellules étaient déjà déplétées en Ran lorsque la courbe de croissance débutait. Compte tenu du fait que le nombre de cellules diminue très rapidement, il aurait été intéressant de refaire l'expérience en ne pré-traitant pas les cellules, mais en commençant plutôt l'induction à la tétracycline en même temps que la courbe de prolifération. Ainsi, il aurait été possible de suivre la diminution de l'expression de Ran par immunobuvardage Western et d'évaluer l'effet du niveau d'expression protéique sur la croissance cellulaire. Le clone shRNA Ran #3 de la lignée TOV1946 TetR est celui dont la diminution de l'expression de Ran est la plus faible. De la même façon, c'est aussi le clone dont la croissance cellulaire est la moins affectée après induction à la tétracycline. Ce résultat confirme l'effet de la déplétion de Ran sur la prolifération cellulaire et semble indiquer que l'effet de la perte de Ran est dose-dépendant.

### 3.3 Survie cellulaire des cellules sous-exprimant Ran *in vitro*

Puisque la sous-expression de la GTPase Ran dans les cellules tumorales de l'ovaire semblait agir sur la survie cellulaire, nous avons voulu vérifier si le cycle cellulaire était affecté par la perte de Ran. Pour y parvenir, nous avons utilisé un essai de cytométrie en flux, avec des cellules traitées à l'iodure de propidium. L'iodure de propidium est une molécule fluorescente qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN, permettant de mesurer le contenu en ADN des cellules [126]. À l'aide de cette technique, nous avons remarqué l'apparition d'une sous-population de cellules en sub-G<sub>1</sub> (ADN hypodiploïde) lorsque l'expression du shRNA était induite par la tétracycline. L'apparition de cette sous-population de cellules était beaucoup plus rapide dans la lignée TOV112D TetR que dans les TOV1946 TetR, et la proportion de cette sous-population était aussi plus grande dans les TOV112D TetR. Néanmoins, la quantité de cellules en sub-G<sub>1</sub> était importante dans les deux lignées cellulaires, atteignant près de 50% et 35% pour les TOV112D TetR et les TOV1946 TetR, respectivement.

L'iodure de propidium permet aussi de déterminer les proportions de cellules qui sont dans les différentes phases du cycle cellulaire, soit G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>/M [126]. En utilisant cette technique, une étude a montré que la déplétion de Ran dans des cellules du cancer du côlon mutantes pour KRAS provoque un arrêt en phase S en 48 h. Cependant, cet arrêt n'est pas remarqué dans une lignée du cancer du côlon dont la protéine KRAS est sauvage [125]. L'hypothèse que Ran pourrait coopérer avec la protéine KRAS activée pour faire progresser le cycle cellulaire des cellules tumorales et que la perturbation de cette collaboration résulterait en un arrêt irréversible en phase S et éventuellement en une mort cellulaire a donc été émise. Contrairement à ce résultat, le groupe de Li *et al.* observait un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> suite à la déplétion de Ran. Dans ces cellules du cancer du nasopharynx, le nombre de cellules en G<sub>1</sub> augmentait de 8% après traitement des cellules au shRNA, alors que le pourcentage de cellules en S ne variait pas. Lors de nos études, aucun arrêt du cycle n'a été observé. Cependant, les lignées que nous avons utilisées ne présentaient pas de mutation du gène KRAS. De plus, le nombre de cellules en sub-G<sub>1</sub>

augmentait rapidement et il est possible que cela ait masqué une faible variation de la proportion de cellules en G<sub>1</sub>, S ou G<sub>2</sub>/M. Afin de vérifier si un arrêt du cycle se produit dans les lignées du cancer épithélial de l'ovaire, il serait intéressant de tester l'induction du shRNA Ran dans les clones où la diminution de l'expression est moins marquée. Ainsi, l'accumulation des cellules dans une phase ou une autre du cycle cellulaire pourrait être visible avant une augmentation trop drastique du nombre de cellules en sub-G<sub>1</sub>.

Ensuite, nous avons vérifié le clivage de la caspase-3, une protéase importante dans l'exécution de l'apoptose, afin de comprendre comment les cellules sous-exprimant Ran mourraient. Trois jours après l'induction de l'expression des shRNAs, le clivage de la caspase-3 était apparent dans tous les clones et dans la population mixte shRNA Ran, et ce, dans les deux lignées cellulaires étudiées. Il est intéressant de remarquer que le clivage de la caspase-3 semble moins marqué dans les clones 3 des deux lignées, qui correspondent aux clones dont l'expression de Ran diminue le moins après induction. En analysant la cinétique du clivage de la protéase, il est possible de remarquer que le clivage de la caspase-3 semble survenir en même temps dans les deux lignées cellulaires. Enfin, Morgan-Lappe *et al.* ont aussi vérifié l'activation de la caspase-3 dans la lignée du cancer du poumon à cellules non-petites H1299. Ils ont observé une augmentation de l'activité de la caspase-3 suite à 72 h de déplétion de Ran par siRNA.

Afin de confirmer l'activation de l'apoptose dans les cellules déplétées en Ran, nous avons voulu observer si la perte de Ran induisait la dépolarisation de la membrane externe de la mitochondrie. Quoique cette étape précède le clivage de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, la perte de potentiel de la membrane externe de la mitochondrie n'a été observée qu'après 60 h dans les TOV112D TetR et 72-84 h dans les TOV1946 TetR, ce qui est un peu plus tard que les deux autres événements. Ceci pourrait probablement être expliqué en partie par la différence de sensibilité entre les tests, puisque les différentes expériences ont été réalisées en parallèle. Un autre mécanisme possiblement responsable du clivage de la caspase-3 découle de l'activation de la caspase-8 par la voie extrinsèque de l'apoptose. Ceci implique

que les récepteurs de la mort (*death receptors*), tels Fas et TNFRI et II, soient activés [127, 128]. Ainsi, un premier clivage de la caspase-3 pourrait être effectué par la caspase-8 (voie extrinsèque). La caspase-9, activée par la sortie du cytochrome c de la mitochondrie (voie intrinsèque), pourrait aussi activer la caspase-3 par la suite afin d'amplifier le phénomène. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait vérifier si les récepteurs de la mort sont activés dans les cellules suite à la déplétion de Ran. Enfin, bien que la dépolarisation de la mitochondrie se produise plus rapidement dans les TOV112D TetR que dans les TOV1946 TetR, le pourcentage de cellules présentant une réduction du potentiel membranaire est similaire dans les deux lignées cellulaires, soit d'environ 70%.

Une étude réalisée en 2008 sur différents types cellulaires a évalué l'effet de la perte de Ran sur la survie cellulaire dans différentes cellules tumorales. Lorsque les cellules HeLa (cancer du col de l'utérus), H460 et H1975 (cancer du poumon), A431 (carcinome épithélial) et MDA-MB-231 (adénocarcinome du sein) étaient traitées avec un siRNA contre Ran, une mort cellulaire due à des défauts mitotiques induisant l'apoptose survenait en 72 h. Étonnamment, l'introduction du même siRNA dans les WS-1 (fibroblastes primaires humains), les HEK293 (cellules humaines épithéliales du rein) ou les HUVEC (cellules humaines endothéliales de la veine ombilicale) n'a pas affecté la progression du cycle cellulaire ni la viabilité cellulaire de ces cellules saines [121]. Cette étude semble indiquer un rôle thérapeutique potentiel intéressant de l'inhibition de Ran dans le traitement de divers cancers. Cependant, il sera important de confirmer ces résultats et il serait intéressant de prolonger la durée de l'étude, puisque tous les résultats étaient obtenus suite à 72 h de traitement au siRNA. Puisque Ran régule plusieurs processus essentiels à la cellule, il se peut que d'importantes répercussions aient lieu suite à la déplétion de Ran même dans les cellules normales mais que ces effets soient plus tardifs que dans les cellules tumorales.

### 3.4 Progression tumorale des cellules sous-exprimant Ran en souris SCID

Comme la perte de Ran affectait la viabilité cellulaire *in vitro*, nous avons ensuite voulu savoir si sa déplétion se répercutait de la même façon sur les cellules *in vivo*. Des cellules de la lignée TOV112D TetR ont été injectées dans des souris SCID et nous avons clairement montré que la sous-expression de Ran provoquait un retard de croissance des tumeurs. Le volume des tumeurs des souris exprimant le shRNA Ran clone est demeuré stable du début de l'induction par la nourriture supplémentée en doxycycline jusqu'au jour 27 environ. Les volumes des tumeurs des souris injectées avec les cellules shRNA Ran (clone #2) recevant la nourriture avec et sans doxycycline était significativement différents à toutes les prises de mesures du jour 15 au jour 27. Un marquage par immunohistochimie des cellules tumorales exprimant le shRNA Ran clone a montré qu'au jour 15 (6 jours d'induction), une diminution marquée de l'expression de Ran était associée avec un marquage de la caspase-3 clivée, absent des tumeurs contrôles.

Les souris devaient être sacrifiées lorsque les tumeurs atteignaient le point limite fixé par la CIPA (Comité Institutionnel de la Protection des Animaux) en ce qui a trait aux volume maximal des tumeurs, soit 2300 mm<sup>3</sup>. Au jour 27, les souris du groupe contrôle shRNA Ran clone avaient toutes été sacrifiées suite à l'atteinte de ce point limite, alors que les souris ayant été injectées avec les mêmes cellules, mais dont l'expression du shRNA était induite par la doxycycline ont vécu beaucoup plus longtemps. La dernière souris de ce groupe a être sacrifiée a vécu 54 jours, soit deux fois plus longtemps que les souris contrôles. Par ailleurs, les tumeurs des souris du groupe doxycycline/shRNA Ran clone ont recommencé à pousser à partir du jour 27 environ. Néanmoins, l'analyse de l'expression de Ran par immunohistochimie a permis de démontrer qu'au jour du sacrifice, les cellules tumorales des souris de ce groupe avaient ré-exprimé Ran à un niveau similaire aux cellules des tumeurs contrôles. Ceci pourrait être causé par la perte du shRNA en l'absence de sélection dans les cellules tumorales *in vivo*, puisqu'une sélection à la puromycine forçait les cellules à le garder *in vitro*. En effet, la culture *in vitro* des cellules en présence de

l'agent de sélection ne permet que la survie des cellules qui contiennent le shRNA de survivre, puisque le vecteur contenant la séquence du shRNA contient aussi le gène codant pour la puromycine, que les cellules n'ayant pas été infectées n'expriment pas. La perte du shRNA pourrait aussi être le résultat de réarrangements génomiques, puisque ces derniers sont fréquents dans les cellules tumorales, dû à l'instabilité génomique. Ainsi, Ran pourrait s'être ré-exprimée, ce qui aurait permis la reprise de la croissance des tumeurs. Enfin, la différence entre les volumes tumoraux des souris shRNA Ran population mixte n'a été statistiquement significative qu'au jour 19, et l'expression du shRNA dans la population mixte n'a que très peu retardé la progression tumorale dans ces souris. Il est fort probable que les cellules exprimant peu ou pas le shRNA dans la population ont rapidement pris l'avantage sur les cellules exprimant le shRNA Ran et ont formé la majorité de la tumeur, n'affectant alors que peu la croissance tumorale. Bien que le retard de croissance des tumeurs sous-exprimant Ran pourrait être dû à un effet clonal, la reprise de la croissance tumorale concorde avec la réexpression de Ran. Ceci semble indiquer que la déplétion spécifique de cette protéine serait à l'origine des effets observés. Afin de confirmer ce résultat, l'expérience pourrait être reprise en utilisant plusieurs clones indépendants.

Ces résultats suggèrent que Ran pourrait devenir une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer épithélial de l'ovaire. Dans une étude portant sur des cellules de glioblastome humain, une équipe coréenne a montré que la surexpression de Ran mène à l'atténuation de la réponse apoptotique induite par un traitement au paclitaxel. La surexpression de la GTPase permettrait d'empêcher la phosphorylation de Bcl-2 par le paclitaxel en plus d'inhiber la translocation de Bax, la relâche du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 [129]. Rappelons que le traitement standard du cancer épithélial de l'ovaire comprend l'utilisation d'un taxane, généralement le paclitaxel [130]. Malheureusement, seules 60-80% des patientes répondent au traitement et la rechute de la maladie est fréquente [131]. Puisque la déplétion de Ran a un impact majeur sur l'apoptose des cellules du cancer ovarien, elle pourrait donc jouer un rôle dans la résistance des cellules du CÉO. Il serait donc intéressant de vérifier si la GTPase Ran permet le même contournement de l'induction de l'apoptose suite à un traitement au paclitaxel dans les

tumeurs de l'ovaire. De plus, si un traitement seul de déplétion de Ran s'avérait non optimal pour le traitement du cancer, la sous-expression de Ran pourrait à tout le moins sensibiliser les cellules au paclitaxel et ainsi augmenter l'efficacité du traitement. Les cellules normales, qui ne contiennent que peu de Ran par rapport aux cellules tumorales, seraient possiblement moins sensibilisées au paclitaxel. La déplétion de Ran pourrait être produite par l'administration d'ARNi. Cependant, cette technique n'a pas montré être réellement efficace lors de divers essais cliniques. L'inhibition de Ran pourrait aussi être réalisée par de petites molécules conçues pour inhiber l'activité de Ran. Ainsi, il sera important de comprendre quelles fonctions de la protéine sont essentielles à la survie cellulaire pour connaître les domaines de la protéine à inhiber.

Enfin, la GTPase Ran pourrait devenir une cible immunothérapeutique intéressante. Tel que discuté précédemment, la forte concentration de Ran dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux fait de cette protéine une cible intéressante dans le traitement du cancer. De plus, deux peptides de Ran, qui correspondent aux acides aminés 48-56 et 87-95, représentent des épitopes ayant la capacité d'induire l'action des lymphocytes T cytotoxiques dans les cancers épithéliaux HLA-A33<sup>+</sup> [120]. Ainsi, une immunothérapie spécifique contre Ran ciblerait les cellules tumorales dont l'expression en Ran est dérégulée, alors que les cellules normales ne seraient pas attaquées.

## Conclusion

Ce projet de maîtrise avait pour objectif principal la sous-expression de la GTPase Ran dans deux lignées cellulaires agressives du cancer épithélial de l'ovaire et l'étude des effets engendrés sur différents paramètres biologiques, notamment la prolifération et la survie cellulaires. Nous avons pu observer que, *in vitro*, la perte de l'expression de Ran mène à une diminution de la prolifération dans les deux lignées cellulaires, qui peut être expliquée par une augmentation de la mort cellulaire. Le clivage de la caspase-3 et la diminution du potentiel de la membrane externe de la mitochondrie indiquent que la perte de viabilité cellulaire est causée par l'induction de l'apoptose suivant la diminution de l'expression de

la protéine Ran. Nous avons également induit la sous-expression de Ran dans des cellules ayant formé des tumeurs en souris SCID. Nous avons ainsi montré que la sous-expression de Ran *in vivo* compromet aussi la viabilité cellulaire. En effet, un retard de la croissance tumorale est observé suite à la déplétion de Ran dans les tumeurs des souris. Une analyse par immunohistochimie sur les xénogreffes de souris a permis de confirmer la diminution de l'expression de la GTPase Ran, en plus d'un clivage de la caspase-3, quelques jours suivant l'induction de l'expression des shRNA par la doxycycline.

En conclusion, la sous-expression de la GTPase Ran a permis de démontrer que cette protéine est essentielle à la survie des cellules du cancer épithélial de l'ovaire, *in vitro* et *in vivo*. Cette dépendance des cellules tumorales face à l'expression de Ran indique qu'elle pourrait être une cible thérapeutique appropriée dans le traitement de la maladie.

## Perspectives

Nous avons jusqu'à maintenant démontré que Ran est indispensable à la survie des cellules du cancer de l'ovaire. Cependant, nous ne savons toujours pas pourquoi ni comment ces cellules tumorales meurent lorsqu'elles sont privées de cette protéine. Ran régule plusieurs processus essentiels à la cellule, tant lors de l'interphase que de la mitose. Si Ran s'avère être une cible thérapeutique intéressante, il sera important de comprendre les mécanismes exacts qui sont activés ou inhibés lors de sa déplétion. À cette fin, l'étude de diverses protéines partenaires de Ran, ou de son réseau, par immunohistochimie sur des tissus de tumeurs de l'ovaire pourrait aider à cibler le rôle particulier effectué par Ran menant à l'apoptose lors de la déplétion de son expression.

De plus, il a été montré que la perte de l'expression de Ran dans les cellules normales n'affecte pas la viabilité cellulaire contrairement aux cellules tumorales. Puisque Ran est surexprimée dans plusieurs cancers et est peu exprimée dans la majorité des tissus sains, ce résultat suggère que Ran constituerait une thérapie ciblée contre les cellules tumorales. Cependant, un seul groupe jusqu'à maintenant a étudié ce phénomène. Il serait donc

important de vérifier si ces résultats sont reproductibles et de pousser les expériences sur une plus longue période de temps, puisque l'effet de la déplétion de Ran n'a été analysée que sur une période de 72 h. Il est probable que les cellules normales soient réellement moins sensibles à la perte de Ran que les cellules tumorales, mais nous devons nous assurer que la réponse des cellules saines n'est pas simplement plus longue à apparaître que dans les cellules tumorales. Les expériences devraient aussi analyser l'effet de la déplétion de Ran dans des cellules qui prolifèrent rapidement et qui sont essentielles au corps humain, par exemple des cellules du système immunitaire ou du système digestif. En effet, des cellules se divisant fréquemment seraient potentiellement plus sensibles à la perte de Ran que des cellules en quiescence.

Enfin, nous avons démontré que Ran est essentielle à la survie des cellules tumorales, mais nous ne savons pas si Ran est impliquée dans la progression tumorale des cellules ovariennes. Puisque la surexpression de Ran a montré être corrélée à un haut stade et à un haut grade dans les tumeurs de l'ovaire, il serait intéressant de vérifier l'effet de sa surexpression sur une lignée cellulaire peu ou non agressive exprimant faiblement Ran. Ces expériences pourraient nous renseigner sur l'importance de la surexpression de Ran dans les cellules tumorales.

## **CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE**

1. Gilbert Scott F., S.S.R. (2004). *Biologie du développement*, De Boeck Edition, (Bruxelles).
2. Larsen, W.J. (2003). *Embryologie Humaine*, 2e édition Edition, (Bruxelles).
3. Teixeira, J., Maheswaran, S., and Donahoe, P.K. (2001). Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 22, 657-674.
4. DiNapoli, L., and Capel, B. (2008). SRY and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol* 22, 1-9.
5. Satoh, M. (1991). Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 177, 85-107.
6. Tortora, G.J. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*, (Montréal).
7. Chen, V.W., Ruiz, B., Killeen, J.L., Cote, T.R., Wu, X.C., and Correa, C.N. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 97, 2631-2642.
8. Dauplat, J., and Guastalla, J. (1996). *Cancer de l'ovaire*, (Paris).
9. Marieb, E. (1993). *Anatomie et physiologie humaine*, (Montréal).
10. Osterholzer, H.O., Streibel, E.J., and Nicosia, S.V. (1985). Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 33, 247-258.
11. Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K., and Leung, P.C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22, 255-288.
12. Richard, W.P., Barbara, Y., and W., H.J. (2001). *Histologie fonctionnelle*, 1e édition Edition, (Bruxelles).
13. Heffner, L.J. (2003). *Reproduction humaine*, 1e édition Edition, (Bruxelles).
14. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

15. Botti, C., Seregini, E., Ferrari, L., Martinetti, A., and Bombardieri, E. (1998). Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *Int J Biol Markers* *13*, 51-69.
16. Levi, F., Lucchini, F., Negri, E., and La Vecchia, C. (1999). Worldwide patterns of cancer mortality, 1990-1994. *Eur J Cancer Prev* *8*, 381-400.
17. Parkin, D.M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* *80*, 827-841.
18. (2008). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2008*. (Toronto: Société canadienne du cancer, Institut national du cancer du Canada, Statistiques Canada, Régistres du cancer des provinces et des territoires, Agence de la santé publique du Canada).
19. (2009). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2009*. (Toronto: Société canadienne du cancer, Institut national du cancer du Canada, Statistiques Canada, Régistres du cancer des provinces et des territoires, Agence de la santé publique du Canada).
20. Colombo, N., Van Gorp, T., Parma, G., Amant, F., Gatta, G., Sessa, C., and Vergote, I. (2006). Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* *60*, 159-179.
21. Brekelmans, C.T. (2003). Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* *15*, 63-68.
22. Salehi, F., Dunfield, L., Phillips, K.P., Krewski, D., and Vanderhyden, B.C. (2008). Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* *11*, 301-321.
23. Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Pelucchi, C., Talamini, R., Montella, M., Conti, E., and La Vecchia, C. (2001). Diet and ovarian cancer risk: a case-control study in Italy. *Int J Cancer* *93*, 911-915.
24. (2005). *L'OCDE en chiffres 2005*. L.É.d. l'OCDE, ed. (Paris).
25. (2008). *L'OCDE en chiffres 2008*. L.É.d. l'OCDE, ed. (Paris).
26. Olsen, C.M., Green, A.C., Whiteman, D.C., Sadeghi, S., Kolaheidoz, F., and Webb, P.M. (2007). Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* *43*, 690-709.
27. Pischon, T., Nothlings, U., and Boeing, H. (2008). Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc* *67*, 128-145.
28. Egan, K.M., Stampfer, M.J., Hunter, D., Hankinson, S., Rosner, B.A., Holmes, M., Willett, W.C., and Colditz, G.A. (2002). Active and passive smoking in breast

- cancer: prospective results from the Nurses' Health Study. *Epidemiology* 13, 138-145.
29. Green, A., Purdie, D., Bain, C., Siskind, V., and Webb, P.M. (2001). Cigarette smoking and risk of epithelial ovarian cancer (Australia). *Cancer Causes Control* 12, 713-719.
  30. Marchbanks, P.A., Wilson, H., Bastos, E., Cramer, D.W., Schildkraut, J.M., and Peterson, H.B. (2000). Cigarette smoking and epithelial ovarian cancer by histologic type. *Obstet Gynecol* 95, 255-260.
  31. Modugno, F., Ness, R.B., and Cotreau, C.M. (2002). Cigarette smoking and the risk of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* 13, 467-471.
  32. Modugno, F., Ness, R.B., and Allen, G.O. (2003). Alcohol consumption and the risk of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 102, 1336-1343.
  33. Choi, J.H., Wong, A.S., Huang, H.F., and Leung, P.C. (2007). Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev* 28, 440-461.
  34. Franco, E.L., and Rohan, T.E. (2002). *Cancer Precursors; Epidemiology, Detection and Prevention*, (New York).
  35. Green, A., Purdie, D., Bain, C., Siskind, V., Russell, P., Quinn, M., and Ward, B. (1997). Tubal sterilisation, hysterectomy and decreased risk of ovarian cancer. Survey of Women's Health Study Group. *Int J Cancer* 71, 948-951.
  36. Ness, R.B., and Cotreau, C. (1999). Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1459-1467.
  37. Fathalla, M.F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2, 163.
  38. Fleming, J.S., Beaugie, C.R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G., and Tan, O.L. (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol* 247, 4-21.
  39. Hanna, L., and Adams, M. (2006). Prevention of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20, 339-362.
  40. 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, 559-568.

41. Siskind, V., Green, A., Bain, C., and Purdie, D. (2000). Beyond ovulation: oral contraceptives and epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* *11*, 106-110.
42. Fredrickson, T.N. (1987). Ovarian tumors of the hen. *Environ Health Perspect* *73*, 35-51.
43. Zheng, H., Kavanagh, J.J., Hu, W., Liao, Q., and Fu, S. (2007). Hormonal therapy in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* *17*, 325-338.
44. Vanderhyden, B.C. (2005). Loss of ovarian function and the risk of ovarian cancer. *Cell Tissue Res* *322*, 117-124.
45. Schumer, S.T., and Cannistra, S.A. (2003). Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol* *21*, 1180-1189.
46. Pectasides, D., Pectasides, E., and Kassanos, D. (2008). Germ cell tumors of the ovary. *Cancer Treat Rev* *34*, 427-441.
47. Hoskins, W.J., Young, R.C., Markman, M., Perez, A.P., Barakat, R.R., and Randall, M. (2005). *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*, 4th Edition Edition, (Philadelphia).
48. Seidman, J.D., Ronnett, B.M., and Kurman, R.J. (2002). Pathology of borderline (low malignant potential) ovarian tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* *16*, 499-512.
49. Ouellet, V., Provencher, D.M., Maugard, C.M., Le Page, C., Ren, F., Lussier, C., Novak, J., Ge, B., Hudson, T.J., Tonin, P.N., et al. (2005). Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* *24*, 4672-4687.
50. Dietel, M., and Hauptmann, S. (2000). Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Arch* *436*, 403-412.
51. Hart, W.R. (2005). Borderline epithelial tumors of the ovary. *Mod Pathol* *18 Suppl* *2*, S33-50.
52. Jones, M.B. (2006). Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management. *Clin Obstet Gynecol* *49*, 517-525.
53. Soslow, R.A. (2008). Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol* *27*, 161-174.
54. Hart, W.R. (2005). Mucinous tumors of the ovary: a review. *Int J Gynecol Pathol* *24*, 4-25.

55. Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., and Nakano, H. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 36, 9-17.
56. Cannistra, S.A. (2004). Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 351, 2519-2529.
57. Silverberg, S.G. (2000). Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19, 7-15.
58. Funt, S.A., and Hricak, H. (2003). Ovarian malignancies. *Top Magn Reson Imaging* 14, 329-337.
59. Feeley, K.M., and Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 38, 87-95.
60. Ahmed, N., Thompson, E.W., and Quinn, M.A. (2007). Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol* 213, 581-588.
61. Bell, D.A. (2005). Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol* 18 Suppl 2, S19-32.
62. Crum, C.P., Drapkin, R., Kindelberger, D., Medeiros, F., Miron, A., and Lee, Y. (2007). Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* 5, 35-44.
63. Crum, C.P., Drapkin, R., Miron, A., Ince, T.A., Muto, M., Kindelberger, D.W., and Lee, Y. (2007). The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 19, 3-9.
64. Bourne, T.H., Whitehead, M.I., Campbell, S., Royston, P., Bhan, V., and Collins, W.P. (1991). Ultrasound screening for familial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 43, 92-97.
65. Puls, L.E., Powell, D.E., DePriest, P.D., Gallion, H.H., Hunter, J.E., Kryscio, R.J., and van Nagell, J.R., Jr. (1992). Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 47, 53-57.
66. Landen, C.N., Jr., Birrer, M.J., and Sood, A.K. (2008). Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 26, 995-1005.
67. Chien, J.R., Aletti, G., Bell, D.A., Keeney, G.L., Shridhar, V., and Hartmann, L.C. (2007). Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer. *J Cell Biochem* 102, 1117-1129.

68. Aletti, G.D., Gallenberg, M.M., Cliby, W.A., Jatoi, A., and Hartmann, L.C. (2007). Current management strategies for ovarian cancer. *Mayo Clin Proc* 82, 751-770.
69. 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, 1331-1337.
70. Patankar, M.S., Jing, Y., Morrison, J.C., Belisle, J.A., Lattanzio, F.A., Deng, Y., Wong, N.K., Morris, H.R., Dell, A., and Clark, G.F. (2005). Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol* 99, 704-713.
71. Gogoi, R., Srinivasan, S., and Fishman, D.A. (2006). Progress in biomarker discovery for diagnostic testing in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 6, 627-637.
72. Yin, B.W., and Lloyd, K.O. (2001). Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 276, 27371-27375.
73. Verheijen, R.H., von Mensdorff-Pouilly, S., van Kamp, G.J., and Kenemans, P. (1999). CA 125: fundamental and clinical aspects. *Semin Cancer Biol* 9, 117-124.
74. Benedet, J.L., Bender, H., Jones, H., 3rd, Ngan, H.Y., and Pecorelli, S. (2000). FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 70, 209-262.
75. Hruby, G., Bull, C.A., Langlands, A.O., and Gebiski, V. (1997). WART revisited: the treatment of epithelial ovarian cancer by whole abdominal radiotherapy. *Australas Radiol* 41, 276-280.
76. Boyle, K.J., and Torrealday, S. (2008). Benign gynecologic conditions. *Surg Clin North Am* 88, 245-264, v.
77. Chambers, J.T. (1989). Borderline ovarian tumors: a review of treatment. *Yale J Biol Med* 62, 351-365.
78. Hoskins, W.J., Young, R.C., Markman, M., Perez, A.P., Barakat, R.R., and Randall, M. (2005). *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*, 4th Edition Edition, (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
79. Dauplat, J., and Guastalla, J. (1996). *Cancer de l'ovaire*, (Paris: Arnette Blackwell S.A.).

80. Chambers, J.T. (1989). Borderline ovarian tumors: a review of treatment. [Review]. *Yale Biol Med.* 62, 351-365.
81. Berek, J.S., Trope, C., and Vergote, I. (1999). Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol* 10 *Suppl 1*, 3-7.
82. Vergote, I., De Brabanter, J., Fyles, A., Bertelsen, K., Einhorn, N., Sevelde, P., Gore, M.E., Kaern, J., Verrelst, H., Sjøvall, K., et al. (2001). Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 357, 176-182.
83. Landrum, L.M., Gold, M.A., Moore, K.N., Myers, T.K., McMeekin, D.S., and Walker, J.L. (2008). Intraperitoneal chemotherapy for patients with advanced epithelial ovarian cancer: a review of complications and completion rates. *Gynecol Oncol* 108, 342-347.
84. Provencher, D.M. (2006). [Intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer: a complex strategy but what an exciting avenue!]. *Bull Cancer* 93, 959-960.
85. Holschneider, C.H., and Berek, J.S. (2000). Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 19, 3-10.
86. Zanetta, G., Rota, S., Chiari, S., Bonazzi, C., Bratina, G., Torri, V., and Mangioni, C. (1998). The accuracy of staging: an important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol* 9, 1097-1101.
87. Clark, T.G., Stewart, M.E., Altman, D.G., Gabra, H., and Smyth, J.F. (2001). A prognostic model for ovarian cancer. *Br J Cancer* 85, 944-952.
88. Cass, I., Baldwin, R.L., Varkey, T., Moslehi, R., Narod, S.A., and Karlan, B.Y. (2003). Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 97, 2187-2195.
89. 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, 303-309.
90. Tonin, P.N., Hudson, T.J., Rodier, F., Bossolasco, M., Lee, P.D., Novak, J., Manderson, E.N., Provencher, D., and Mes-Masson, A.M. (2001). Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene* 20, 6617-6626.
91. Simone, N.L., Pawletz, C.P., Charboneau, L., Petricoin, E.F., 3rd, and Liotta, L.A. (2000). Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics. *Mol Diagn* 5, 301-307.

92. Zietarska, M., Maugard, C.M., Filali-Mouhim, A., Alam-Fahmy, M., Tonin, P.N., Provencher, D.M., and Mes-Masson, A.M. (2007). Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog* *46*, 872-885.
93. Ouellet, V., Zietarska, M., Portelance, L., Lafontaine, J., Madore, J., Puiffe, M.L., Arcand, S.L., Shen, Z., Hebert, J., Tonin, P.N., et al. (2008). Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer* *8*, 152.
94. Provencher, D.M., Lounis, H., Champoux, L., Tetrault, M., Manderson, E.N., Wang, J.C., Eydoux, P., Savoie, R., Tonin, P.N., and Mes-Masson, A.M. (2000). Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* *36*, 357-361.
95. Connolly, D.C., Bao, R., Nikitin, A.Y., Stephens, K.C., Poole, T.W., Hua, X., Harris, S.S., Vanderhyden, B.C., and Hamilton, T.C. (2003). Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* *63*, 1389-1397.
96. Ouellet, V., Guyot, M.C., Le Page, C., Filali-Mouhim, A., Lussier, C., Tonin, P.N., Provencher, D.M., and Mes-Masson, A.M. (2006). Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* *119*, 599-607.
97. Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* *2004*, RE13.
98. Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* *118*, 843-846.
99. Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* *294*, 1299-1304.
100. Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.
101. Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., and Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* *123*, 1649-1659.
102. Hadjebi, O., Casas-Terradellas, E., Garcia-Gonzalo, F.R., and Rosa, J.L. (2008). The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. *Biochim Biophys Acta* *1783*, 1467-1479.

103. Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1439-1457.
104. Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 195-208.
105. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
106. Joseph, J. (2006). Ran at a glance. *J Cell Sci* 119, 3481-3484.
107. Madrid, A.S., and Weis, K. (2006). Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* 115, 98-109.
108. Pemberton, L.F., and Paschal, B.M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6, 187-198.
109. Moore, J.D. (2001). The Ran-GTPase and cell-cycle control. *Bioessays* 23, 77-85.
110. Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.
111. Yamaguchi, R., and Newport, J. (2003). A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell* 113, 115-125.
112. Heald, R., McLoughlin, M., and McKeon, F. (1993). Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74, 463-474.
113. Yang, J., Bardes, E.S., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A., and Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 12, 2131-2143.
114. Di Fiore, B., Ciciarello, M., and Lavia, P. (2004). Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* 3, 305-313.
115. Ciciarello, M., Mangiacasale, R., and Lavia, P. (2007). Spatial control of mitosis by the GTPase Ran. *Cell Mol Life Sci* 64, 1891-1914.
116. Clarke, P.R., and Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 464-477.

117. Arnaoutov, A., and Dasso, M. (2005). Ran-GTP regulates kinetochore attachment in somatic cells. *Cell Cycle* 4, 1161-1165.
118. Sazer, S., and Dasso, M. (2000). The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* 113 (Pt 7), 1111-1118.
119. Dasso, M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol* 12, R502-508.
120. Azuma, K., Sasada, T., Takedatsu, H., Shomura, H., Koga, M., Maeda, Y., Yao, A., Hirai, T., Takabayashi, A., Shichijo, S., et al. (2004). Ran, a small GTPase gene, encodes cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes capable of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin Cancer Res* 10, 6695-6702.
121. Xia, F., Lee, C.W., and Altieri, D.C. (2008). Tumor cell dependence on Ran-GTP-directed mitosis. *Cancer Res* 68, 1826-1833.
122. Li, H., Ren, C.P., Tan, X.J., Yang, X.Y., Zhang, H.B., Zhou, W., and Yao, K.T. (2006). Identification of genes related to nasopharyngeal carcinoma with the help of pathway-based networks. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38, 900-910.
123. Kau, T.R., Way, J.C., and Silver, P.A. (2004). Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer* 4, 106-117.
124. Abe, H., Kamai, T., Shirataki, H., Oyama, T., Arai, K., and Yoshida, K. (2008). High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 122, 2391-2397.
125. Morgan-Lappe, S.E., Tucker, L.A., Huang, X., Zhang, Q., Sarthy, A.V., Zakula, D., Verneti, L., Schurdak, M., Wang, J., and Fesik, S.W. (2007). Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res* 67, 4390-4398.
126. Moore, A., Donahue, C.J., Bauer, K.D., and Mather, J.P. (1998). Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol* 57, 265-278.
127. Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
128. Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Caspase activation. *Biochem Soc Symp*, 233-242.

129. Woo, I.S., Jang, H.S., Eun, S.Y., Kim, H.J., Ham, S.A., Lee, J.H., Chang, K.C., Kim, J.H., Han, C.W., and Seo, H.G. (2008). Ran suppresses paclitaxel-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Apoptosis* 13, 1223-1231.
130. Sugiyama, T., and Konishi, I. (2008). Emerging drugs for ovarian cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 13, 523-536.
131. Collinson, F., and Jayson, G. (2009). New therapeutic agents in ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21, 44-53.

