

Université de Montréal

**Développement et caractérisation de nouveaux
modèles du cancer épithélial de l'ovaire.**

par

Magdalena Zietarska

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de PhD

en biologie moléculaire

Août 2010

© Magdalena Zietarska, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée:

Développement et caractérisation de nouveaux
modèles du cancer épithélial de l'ovaire.

Présentée par :
Magdalena Zietarska

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Isabelle Royal, présidente-rapporteur
Dr. Anne-Marie Mes-Masson, directrice de recherche
Dr. Diane Provencher, co-directrice
Dr. Euredice Carmona, membre du jury
Dr. Mark Nachtigal, examinateur externe
Dr. Philippe P. Roux, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le cancer épithélial de l'ovaire (EOC) est le plus mortel des cancers gynécologiques. Cette maladie complexe progresse rapidement de façon difficilement décelable aux stades précoces. De plus, malgré une chirurgie cytoréductrice et des traitements de chimiothérapie le taux de survie des patientes diagnostiquées aux stades avancés demeure faible. Dans le but d'étudier l'EOC dans un contexte *ex vivo*, l'utilisation de modèles cellulaires est indispensable. Les lignées cellulaires d'EOC sont un outil pratique pour la recherche cependant, la façon dont l'expression des gènes est affectée en culture par comparaison à la tumeur d'origine n'est pas encore bien élucidée. Notre objectif était donc de développer et de caractériser de nouveaux modèles de culture *in vitro* qui reflèteront plus fidèlement la maladie *in vivo*. Nous avons tout d'abord utilisé des lignées cellulaires disponibles au laboratoire afin de mettre au point un modèle 3D de culture *in vitro* d'EOC. Des sphéroïdes ont été générés à l'aide de la méthode des gouttelettes inversées, une méthode pionnière pour la culture des cellules tumorales. Nous avons ensuite procédé à une analyse des profils d'expression afin de comparer le modèle sphéroïde au modèle de culture en monocouche et le modèle xéno greffe *in vivo*. Ainsi, nous avons identifié des gènes stratifiant les modèles tridimensionnels, tant *in vivo* qu'*in vitro*, du modèle 2D monocouche. Parmi les meilleurs candidats, nous avons sélectionné *S100A6* pour une caractérisation ultérieure. L'expression de ce gène fut modulée afin d'étudier l'impact de son inhibition sur les paramètres de croissance des sphéroïdes. L'inhibition de ce gène a comme effet de réduire la motilité cellulaire mais seulement au niveau du modèle sphéroïde. Finalement, toujours dans l'optique de développer des modèles d'EOC les plus représentatifs de la maladie *in vivo*, nous avons réussi à développer des lignées cellulaires uniques dérivées de patientes atteintes d'EOC du type séreux, soit le plus commun des EOC. Jusque là, très peu de lignées cellulaires provenant de ce type de cancer et de patientes n'ayant pas reçu de chimiothérapie ont été produites. De plus, nous avons pour la première fois caractérisé des lignées d'EOC de type séreux provenant à la fois de l'ascite et de la tumeur solide de la même patiente.

Mots-clés : sphéroïde, cancer de l'ovaire, S100A6, modèles de culture, lignées cellulaires.

Abstract

The epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal of gynecological cancers. This complex and heterogeneous disease progresses rapidly and is almost asymptomatic in early stages. The survival rate of patients with late stage diagnosis remains low albeit cytoreductive surgery and chemotherapy. In order to study the EOC disease in an *ex vivo* context, the use of different cellular models is necessary. EOC cell lines derived from long-term passages of malignant ovarian cancers are useful tools for molecular and cellular research but it is not clear how culture conditions affect overall gene expression and oncogenic potential as compared to the original tumor. The main goal of this research was to develop and characterize new *in vitro* model systems that will recapitulate more closely some of the growth conditions encountered by tumor cells *in vivo*. In order to develop an *in vitro* tridimensional EOC spheroid model, we have used cell lines previously established in our laboratory. Spheroids were generated using the hanging droplet method, which was innovative for the culture of cancer cells. Comparative gene expression profile analysis of monolayer cultures, 3D spheroids and *in vivo* xenografts were performed and we have shown that the spheroid transcriptome more closely reflects expression patterns of the *in vivo* model compared to that of monolayer cultures. Among the best candidates, *S100A6* gene over-expressed in the 3D models versus monolayer cultures was chosen for further analysis. To begin to address how *S100A6* might affect EOC growth parameters, we have inhibited its expression in our *in vitro* models. The loss of *S100A6* in the spheroid model results in a reduction of cellular migration, which seems to be in line with previous *in vivo* results published by other researchers. Always with the objective of developing the most relevant to the *in vivo* disease model systems, we have also succeeded in developing a unique EOC cell lines derived from patients with the most frequently diagnosed serous type of cancer. Very few cell lines derived from this type of cancers and from chemotherapy naïve patients are available. Moreover, we characterize for the first time EOC serous type cell lines derived from the ascites and the solid tumor of the same patient.

Keywords : spheroid, ovarian cancer, *S100A6*, model systems, cell lines

Table des matières

Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre 1. LE CANCER.....	1
Chapitre 2. LE CANCER DE L'OVAIRE.....	6
Chapitre 2.1 L'OVAIRE NORMAL.....	7
Chapitre 2.2 Les tumeurs ovariennes.....	20
Chapitre 2.3 La carcinogenèse d'EOC.....	28
Chapitre 2.4 Les aspects cliniques de l'EOC.....	33
Chapitre 2.5 Les modèles d'étude du cancer de l'ovaire.....	38
Chapitre 3 Objectifs.....	51
Chapitre 3.1 Objectif primaire.....	51
Chapitre 3.2 Objectif secondaire.....	52
Chapitre 3.3 Objectif tertiaire.....	53
Chapitre 4. Molecular description of a 3-D <i>in vitro</i> model for the study of épithélial ovarian cancer (EOC).....	54
Chapitre 4.1 Abstract.....	55
Chapitre 4. 2 Introduction.....	55
Chapitre 4.3 Materials and methods.....	57
Chapitre 4.3.1 Cell cultures.....	57
Chapitre 4.3.2 Growth of spheroid.....	57
Chapitre 4.3.3 Xenografts.....	58
Chapitre 4.3.4 Tumorigenicity assay.....	58
Chapitre 4.3.5 RNA preparation.....	59
Chapitre 4.3.6 Gene expression microarray experiments.....	59
Chapitre 4.3.7 Q-PCR.....	60
Chapitre 4.3.8 Immunohistochemistry.....	61
Chapitre 4.4 Results:.....	62

Chapitre 4.4.1 Establishment and characterization of spheroid EOC model.....	62
Chapitre 4.4.2 Molecular description of EOC models.....	63
Chapitre 4.4.3 Semi-quantitive Q-PCR and immunohistochemistry.....	64
Chapitre 4.5 Discussion:.....	66
Chapitre 4.5.1 The hanging droplets culture allows spheroid formation for EOC cell lines.....	66
Chapitre 4.5.2 OV-90 <i>in vitro</i> spheroids cluster with <i>in vivo</i> generated xenografts....	67
Chapitre 4.6 Conclusion.....	70
Chapitre 4.7 Bibliography.....	82
Chapitre 5. Inhibition of the S100A6 protein over-expressed in 3D spheroid models of epithelial ovarian cancer (EOC) impacts cellular migration.....	88
Chapitre 5.1 Abstract.....	89
Chapitre 5.2 Introduction.....	89
Chapitre 5.3 Material and Method.....	91
Chapitre 5.3.1 Cells and spheroid culture.....	91
Chapitre 5.3.2 Establishment of cell lines stably expressing shS100A6.....	92
Chapitre 5.3.3 Western blot analysis.....	93
Chapitre 5.3.4 Growth assay.....	93
Chapitre 5.3.5. Cell line and spheroid <i>in vitro</i> invasion assay.....	94
Chapitre 5.3.6 Spheroid <i>in vitro</i> migration assay.....	94
Chapitre 5.3.7 Wound-healing assay.....	95
Chapitre 5.4 Results.....	95
Chapitre 5.5 Discussion.....	98
Chapitre 5.6 Bibliography.....	109
Chapitre 6. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines.....	112
Chapitre 6.1 Abstract.....	113
Chapitre 6.2 Introduction.....	114
Chapitre 6.3 Material and Method.....	115
Chapitre 6.3.1 Sample and Patient data.....	115

Chapitre 6.3.2 Establishment of the cell lines and culture conditions	115
Chapitre 6.3.3 Antibodies	116
Chapitre 6.3.4 Immunohistochemistry	117
Chapitre 6.3.5 Growth rate.....	118
Chapitre 6.3.5 Anchorage independent growth in soft agarose and three-dimensional culture.....	118
Chapitre 6.3.6 Low serum growth	119
Chapitre 6.3.7 Wound-healing assay	119
Chapitre 6.3.8 <i>In vitro</i> invasion assay.....	119
Chapitre 6.3.9 <i>In vivo</i> growth in SCID mice.....	120
Chapitre 6.3.10 Mutation analyses.....	120
Chapitre 6.3.11 Conventional cytogenetics and Spectral Karyotyping (SKY) of the cell lines	121
Chapitre 6.4 Results	122
Chapitre 6.4.1 Primary culture, cell line and tumor tissue phenotype	122
Chapitre 6.4.2 Solid tumor and cell line expression of keratins, TP53 and HER2....	123
Chapitre 6.4.3 Cell growth rate and tumorigenicity assays	124
Chapitre 6.4.4.Mutation status of the new EOC cell lines.....	125
Chapitre 6.4.5 Cytogenetics and Spectral Karyotyping.....	126
Chapitre 6.5 Discussion	127
Chapitre 6.6 Conclusions	131
Chapitre 6.7 Bibliography.....	146
Chapitre 7. Discussion	153
Annexe I. Tableaux supplémentaires du chapitre 4.....	i
Annexe II. Figures supplémentaires chapitre 5.....	iv
Annexe III. Figures supplémentaires du chapitre 6	vii
Annexe IV. Article Supplémentaire : A novel method of cell embedding for tissue microarrays.....	x
Abstract	xi

Introduction	xi
Methods.....	xii
Cell cultures	xii
Histogel mold.....	xii
TMA construction.....	xiii
Immunohistochemistry.....	xiv
Results.....	xiv
Discussion	xvi
Bibliography.....	xxv

Liste des tableaux

Introduction

Table I. Description du stade de la tumeur selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) et American Joint Committee on Cancer (AJCC). ... 24

Table II. Tableau représentant quelques unes des lignées cellulaires dérivées du cancer épithélial de l'ovaire [124-134]..... 47

Chapitre 4

Table I. *In vivo* tumor growth of OV-90 monolayer and spheroid models..... 74

Chapitre 6

Table I. Patient clinical data..... 142

Table II. Summary of cell line growth characteristics and tumorigenicity..... 144

Table III. Mutation status of the new EOC cell lines..... 144

Table IV. G-banding composite karyotypes of the three ovarian cancer cell lines. 145

Chapitre 7. Discussion

Table I. Gènes candidats stratifiant les modèles 3D des modèles monocouches dont les produits de transcription constituent les protéines cibles de S100A6..... 166

Tableau II. Gènes communs entre les analyses d'expression de profils génique des modèles d'EOC ainsi que des analyses des lignées du cancer du pancréas exprimant ou non la protéine S100A6. 167

Annexe

Supplementary Table I. Primer sequences and conditions used for Q-PCR experiments. ii

Table II. Six hundred and ten probe sets which significantly separate the two groups of model systems (monolayers versus spheroids and xenografts) for the OV-90 cell line. iii

Table III. Gene Ontology (GO) terms molecular function analysis..... iii

Table I. The origin and the diseases represented by each of the cell lines. xx

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Incidence de tous les cancers au Canada reliée à l'âge et selon le sexe [1].	1
Figure 2. Les six caractéristiques des cellules cancéreuses.	4
Figure 3. Anatomie du système reproducteur féminin.	8
Figure 4. Les gonades immatures chez l'humain ont le potentiel de se différencier en un ou l'autre organe reproducteur (ovaire ou testicule) selon les signaux en place.	10
Figure 5. Le développement du tractus génital femel chez l'humain.	12
Figure 6. Représentation graphique de l'histologie d'un ovaire normal.	14
Figure 7. Coupe histologique d'un ovaire sain.	15
Figure 8. Représentation graphique du cycle ovulatoire chez la femme.	19
Figure 9. Représentation de différentes classifications selon l'origine cellulaire duquel dérivent les trois grandes classes des tumeurs ovariennes.	20
Figure 10. Patron de dissémination du cancer épithélial de l'ovaire.	25
Figure 11. Un exemple de micro-étalage de tissus (TMA).	41

Chapitre 4

Figure 1. Morphological appearance of spheroid development in hanging droplets.	72
Figure 2. Evaluation of cellular proliferation in spheroids developed from the three EOC cell lines.	73
Figure 3. Global gene expression (based on 5,611 probe sets from filtered data) hierarchical cluster analysis for OV-90.	75
Figure 4. Description of OV-90 gene expression profile separating monolayer cultures from spheroid and xenograft models.	77
Figure 5. Validation of candidate genes by Q-PCR. A) The list of the most differentially expressed genes between monolayers and spheroid/xenograft models.	79
Figure 6. <i>SI00A6</i> expression at the protein level in cell lines, spheroids, xenografts, different epithelial ovarian cancers and normal epithelia.	81

Chapitre 5

Figure 1. S100A6 expression in model systems of EOC.	102
Figure 2. Functional studies of the impact of S100A6 inhibition in the TOV-21G cell line.	104
Figure 3. S100A6 inhibition in the OV-90 cell line.	106
Figure 4. Cellular motility assays for OV-90 cell lines.	108

Chapitre 6

Figure 1: Cellular morphology of serous ovarian epithelium cancer cell lines and their corresponding tumoral tissues.	133
Figure 2 : Solid tumor and cell line expression of keratins, TP53 and HER2.	135
Figure 3 : Cell growth rate and tumorigenicity assays.	137
Figure 4. Representative G-banded and SKY analysis.	141

Chapitre 7. Discussion

Figure 1. Exemples de différentes lignées en cultures dans les gouttelettes suspendues. La formation des sphéroïdes est lignée dépendante.	155
Figure 2. Différentes conditions de co-cultures cellulaires des cellules d'EOC et des cellules endothéliales.	160
Figure 3. Deux membres de la famille de protéines S100 stratifiant les modèles 3D des modèles monocouche.	168
Figure 4. Les sphéroïdes de la lignée OV90 en présence d'autres sphéroïdes de la même lignée forment des protrusions, s'attirent et éventuellement fusionnent ensemble.	171

Annexe

Supplementary figure 1. S100A6 expression at protein level in paraffin embeded TOV21G and TOV112D cell lines, spheroids and xenografts.	i
Supplementary Figure 1. S100A6 expression in different EOC cell lines.	iv
Supplementary Figure 2. Morphology of the TOV-21G cell lines cultured as monolayers or spheroids.	v

Supplementary Figure 3. Cellular invasion of OV-90 cells was assayed using the modified Boyden chambers.....	vi
Additional Figure 1. G-banded métaphases and SKY analysis TOV-2223.....	vii
Additional Figure 2. G-banded métaphases and SKY analysis TOV-1946.....	viii
Additional Figure 3. G-banded métaphases and SKY analysis OV-1946.....	ix
Figure 1. Summary of histogel mold preparation and embedding of cell pellets.....	xix
Figure 2. Comparative morphology of scraped versus trypsinized embedded cells.....	xxi
Figure 3. Comparative morphology and immunostaining of cells fixed in formalin for different lengths of time.....	xxii
Figure 4. Examples of differential protein expression in cell lines from the cell line array.....	xxiii
Supplementary figure 1. Morphological differences observed between cell samples.....	xxiv

Liste des abréviations

2D	deux dimensionnel
3D	tridimensionnel
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMH	Anti-müllerian hormone
ADN	acide désoxyribonucléique
BOV	benign ovarian tumor
BRCA1	breast cancer gene
BSP	Bone sialoprotein
CA125	cancer antigen 125
CalcBP	calcyclin binding protein
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CIPA	Comité institutionnel de protection de animaux
CSPG2	chondroïtin sulfate proteoglycan 2
CT scan	computed tomography scan
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBA	Dilute Brown Non-Agouti
ECM	Extracellular matrix
ENO1	énolase 1
EOC	epithelial ovarian cancer
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FSH	Follicle-stimulating hormone
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescence protein
GO	gene ontology
HABP2	hyaluronic acid-binding protein 2
Her2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
Hif	Hypoxia induced factor
HMG-box	High mobility group box
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IL-1	interleukine 1
IL-6	interleukine 6
IQR	interquartile range
ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

Krt	kératine
L	lignée
LH	Luteinizing hormone
LH-RH	Luteinizing-hormone-releasing hormone
LIP	lignée intrapéritonéale
LSC	lignée sous-cutnaée
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MCDB	
MRI	Magnetic resonance imaging
MSI	Microsatellite instability
MSMB	microseminoprotein beta
MUC16	mucine 16
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NOSE	normal ovarian surface epithelium
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSE	Ovarian surface epithelium
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PECAM1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PET scan	positron emission tomography
Q-PCR	PCR en temps réel
RMA	robust multi-array average
ARN	acide ribonucléique
RNAi	acide ribonucléique interférant
RT-PCR	real time PCR
S	spheroid
S100A6	S100 calcium binding protein 6
SCID	Severe combined immunodeficiency
shRNA	short hairpin RNA
SKY	spectral karyotype
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SPRY2	sprouty 2
SRY	sex-determinating region Y
SSCP	single-strand conformation polymorphism
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II
THBS1	thrombospondin 1
TIP	tissu intra-péritonéal

TIME	telomerase-immortalized human microvascular endothelium cell line
TMA	Tissue microarray
TP53	tumor protein p53
TSC	tissu sous-cutané
USF	upstream stimulatory factor
X	xenograft

À ma mère qui m'a toujours encouragée et appuyée. À mon époux et ma fille qui ont été mes grands motivateurs. Ce travail est le témoin de votre patience et amour.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes directrices de recherche Dre. Anne-Marie Mes-Masson et Dre. Diane Provencher de m'avoir généreusement accueillie dans leur laboratoire. Je dois souligner le support continu dont elles ont fait preuve à mon égard. Une étudiante en science ne peut demander de meilleurs exemples de courage, de persévérance et de dévouement. Je tiens surtout à vous remercier pour ce travail gigantesque que vous effectuez à tous les jours pour que nous puissions faire de la recherche avec les meilleurs moyens possible et dans un environnement propice à l'épanouissement.

Je ne pourrais passer sous silence l'appui que j'ai eu de la part de mes collègues de travail. Tous et chacun ont contribué par leur expertise et savoir à l'avancement de mon projet. Vous avez été une véritable deuxième famille pour moi et les amitiés que nous avons créées resteront imprégnées dans mon cœur toute ma vie.

Mes plus profonds remerciements sont adressés à ma famille dont la générosité, le support et les encouragements ont été indispensables à la réussite de cette entreprise. Merci surtout à ma mère, mon pilier et ma force. L'amour inconditionnel dont elle fait preuve à mon égard est ressenti dans chaque geste petit et grand de tous les jours. Je tiens à remercier tout particulièrement mon époux. Ma passion pour la recherche a demandé de sa part de grands sacrifices ainsi que de la patience et de la compréhension. Il a toujours cru en moi et sans son support je n'en serais pas là. Marcin tu es ma moitié, mon âme sœur, mon amour et cette thèse est un peu la tienne aussi. Merci d'être là tous les jours. Finalement, un grand merci à Sophie. Elle est la plus petite dans notre famille mais, elle est ma plus grande source de motivation.

La réalisation de ce projet a été rendue possible grâce à la contribution financière d'Initiative René Malo, Canderel, du Programme de biologie moléculaire et de la FES de l'Université de Montréal, FRSQ et VRQ.

Introduction

Chapitre 1. LE CANCER

Le corps humain adulte est composé d'environ 3×10^{13} cellules dont plusieurs milliers sont en division à chaque instant de notre vie. Normalement cette division est strictement contrôlée pour maintenir un équilibre entre les cellules en prolifération et les cellules programmées pour mourir. Cependant, certaines cellules malignes échappent au contrôle et elles se comportent alors de manière profondément anormale.

Au Canada, une personne sur quatre va mourir du cancer, les risques étant plus élevés pour les hommes que pour les femmes (Figure 1, page 1) [1]. Le développement du cancer chez l'humain implique une succession complexe d'évènements qui normalement se produisent durant plusieurs décennies [2]. C'est la raison pour laquelle on l'appelle parfois une maladie de « l'âge » puisque les risques de développer un cancer augmentent dramatiquement avec l'âge. En effet 77% de tous les cancers sont diagnostiqués après 55 ans [3].

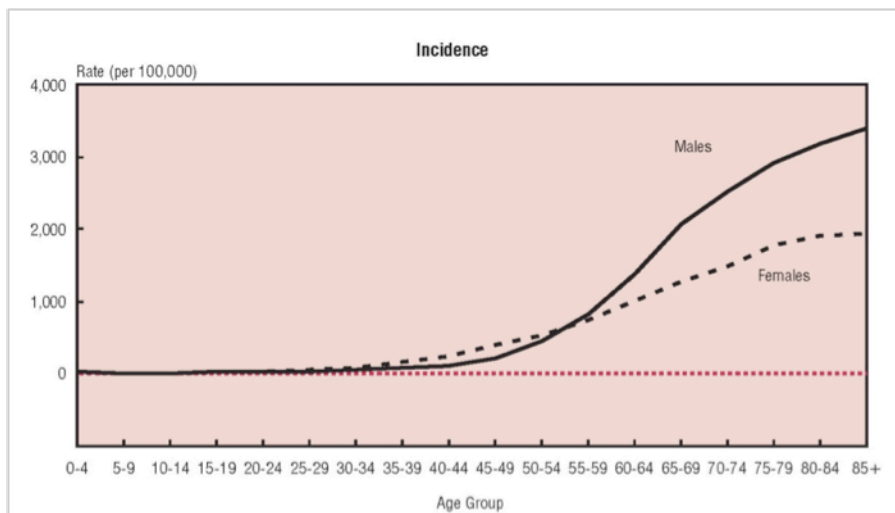


Figure 1. Incidence de tous les cancers au Canada reliée à l'âge et selon le sexe [1].

Le cancer se définit comme une croissance anarchique de cellules malignes qui éventuellement peuvent tuer l'hôte [4]. Une cellule devient maligne lorsqu'elle a accumulé des mutations génétiques au niveau de son ADN ainsi que des changements épigénétiques qui lui permettent d'échapper aux systèmes de contrôles de la prolifération. Ainsi, les cellules cancéreuses, au lieu de se développer, parvenir à maturité et mourir, vont se diviser indéfiniment. Le développement du cancer chez l'humain est un processus complexe qui peut prendre des dizaines d'années et une fois que les tumeurs sont devenues apparentes de nombreuses mutations ont eu lieu tant au niveau des oncogènes qu'au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs et tout autre gène impliqué directement ou indirectement dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Il a été démontré que dans les cellules en culture le taux de mutations spontanées est d'environ 2×10^{-7} par gène par division cellulaire [5]. Si on suppose que ce taux peut être transposé *in vivo* et qu'il reste fixe durant toute la vie d'un individu, alors chaque cellule n'accumulerait que très peu de mutations durant sa vie [6]. Des études précédentes ont démontré qu'entre quatre et dix événements étape-limitantes et stochastiques sont nécessaires pour l'initiation et la progression tumorale [7]. Les taux de mutations spontanées sont donc insuffisants pour induire les nombreux changements génétiques associés à la tumorigenèse. Cette observation a été à l'origine des recherches qui ont démontré que la progression tumorale est associée à une inactivation des gènes responsables de contrôler la stabilité génomique, ce qui résulte en une accumulation accélérée de mutations [7]. Le destin d'une cellule est cependant ultimement contrôlé par la machinerie impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et ce dernier est influencé par les signaux provenant des modifications génétiques. En effet, c'est au niveau du cycle cellulaire que la cellule décide de proliférer, de devenir quiescente ou encore d'entrer en état de différenciation post mitotique [8]. Cependant, l'objectif premier du cycle cellulaire est de conserver l'intégrité de l'ADN de la cellule et donc d'assurer la réplication correcte de l'ADN et la répartition égale de copies identiques de chromosomes entre deux cellules filles. Considérant qu'il y a des milliers de divisions cellulaires tout au long de la vie d'un individu, cette intégrité génomique est donc constamment menacée. Afin d'éviter ou de contrôler l'instabilité génomique, les cellules ont développé différents mécanismes. Ainsi,

une cellule qui a subi un dommage à l'ADN peut induire un arrêt du cycle cellulaire qui va lui permettre de réparer son ADN ou encore, si le dommage est trop grand, d'induire l'apoptose. La transformation d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse est donc le résultat des défauts au niveau de ces mécanismes essentiels au bon fonctionnement de la cellule [9].

Il y a déjà dix ans, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg publiaient dans la revue *Cell* leur article « The Hallmarks of Cancer ». Cette publication, citée des milliers de fois depuis, définissait les altérations nécessaires pour qu'une cellule soit considérée comme maligne [10]. Ainsi, ils ont défini six caractéristiques que doivent acquérir les cellules normales pour devenir cancéreuses, soit l'autosuffisance au niveau de facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'évasion face à l'apoptose, un potentiel de réplication infini, l'angiogenèse soutenue et ultimement l'invasion des tissus et la formation de métastases (Figure 2, page 4). Malgré l'immense complexité de la recherche sur le cancer, ces caractéristiques assez simples demeurent d'actualité. Depuis une décennie, des caractéristiques additionnelles ont été proposées telles l'inflammation [11] et le rôle des microRNA [12].

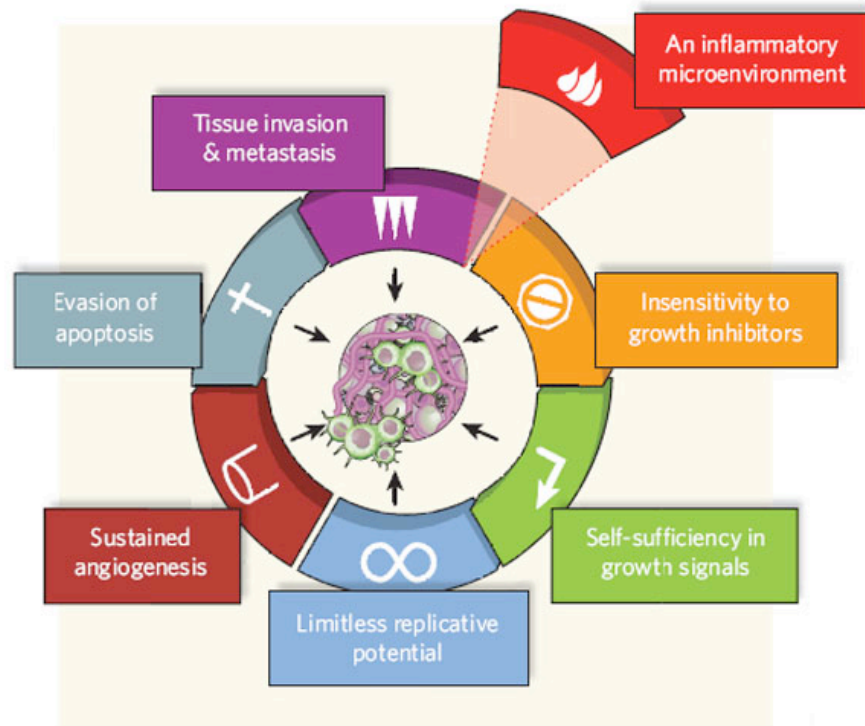


Figure 2. Les six caractéristiques des cellules cancéreuses.

Le schéma de Hanahan et Weinberg [10] inclut six caractéristiques des cellules cancéreuses. La nouvelle théorie propose l'intégration du microenvironnement inflammatoire parmi les caractéristiques contributrices au phénotype cancéreux. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, [13], copyright (2009)

En plus des facteurs génétiques, des facteurs épigénétiques peuvent également contribuer à l'instabilité génomique et induire des changements au niveau du contrôle du cycle cellulaire. La fixation de groupement chimiques (méthyl, phosphate ou acétyl) sur l'ADN et les protéines qui y sont associées constitue l'une des modifications épigénétiques qui influence l'expression des gènes. Ainsi, l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de

tumeurs, menant à leur inactivation, est un exemple de mécanisme épigénétique impliqué dans la tumorigenèse [14]. Un autre facteur épigénétique est l'organisation spatiale de l'ADN en chromatine soit l'enroulement de l'ADN autour des histones. En effet, l'organisation spatiale de l'ADN influence l'accessibilité de ce dernier à la machinerie transcriptionnelle. Finalement, l'instabilité génomique peut également être induite par le raccourcissement des télomères [15]. Lors des divisions cellulaires, les télomères protègent les chromosomes de la dégradation due à l'incapacité des ADN-polymérase à répliquer les extrémités de l'ADN. Des études précédentes ont suggéré un lien entre le raccourcissement des télomères et la formation des tumeurs chez la souris [15]. Le raccourcissement des télomères pourrait représenter un autre facteur qui augmente les risques de développer un cancer avec l'âge.

En plus des facteurs génétiques et épigénétiques, l'environnement ainsi que notre style de vie jouent un rôle important au niveau de notre santé et le potentiel de développer des tumeurs. En effet, il a été démontré que le stress et l'obésité, par exemple, pourraient avoir un lien avec le cancer [16, Lutgendorf, 2003 #6] [17]. Les procédés biochimiques par lesquels les facteurs environnementaux agissent sont à peine compris, cependant on les associe aux deux étapes principales de la mutagenèse soit l'initiation et la promotion. L'initiation est tout d'abord un processus par lequel une cellule devient maligne et donc capable de former des tumeurs. Ce changement peut avoir lieu suite à un contact avec certaines substances qui induisent des dommages à l'ADN (carcinogènes ou mutagènes). La promotion quant à elle consiste en une exposition répétée aux substances qui vont promouvoir et faciliter le processus cancéreux (par exemple, en empêchant la réparation de l'ADN endommagé). Ces substances sont appelées les promoteurs (exemple alcool ou certains gras contenus dans les aliments). Il faut souligner que l'action de ces derniers est plus difficile à démontrer. Cependant, la plupart des substances chimiques mutagéniques (comme la fumée des cigarettes ou l'asbestos) sont des carcinogènes complets et peuvent donc aussi bien initier que promouvoir le cancer [18, 19].

Certains virus peuvent également jouer un rôle dans le développement de cancers. En effet, certains cancers humains tels que les lymphomes, les leucémies ou le cancer du col utérin peuvent être causés par des virus. Les virus qui sont à l'origine de tumeurs sont alors appelés oncovirus [20]. Finalement, nous savons désormais que l'histoire familiale joue un rôle important au niveau de la détermination du risque de développer un cancer et aussi du suivi accordé à une personne à risque. En effet, les individus des familles « à risque » doivent être particulièrement vigilants et exigent une surveillance plus accrue voir même des chirurgies prophylactiques. Il faut cependant souligner que ce qui détermine le développement des cancers chez la majorité des humains est surtout relié au style de vie plutôt qu'à l'héritage génétique. En fait, seulement 10% des cancers seraient véritablement d'origine génétique [21].

Chapitre 2. LE CANCER DE L'OVAIRE

Le cancer de l'ovaire est le plus mortel des cancers gynécologiques chez la femme. Malgré une chirurgie cytoréductive agressive et des nouvelles chimiothérapies, le taux de mortalité relié à ce cancer n'a pas changé depuis les 30 dernières années. De plus, environ 60% des patientes atteintes vont mourir de cette maladie. Ceci est principalement dû au fait que le cancer de l'ovaire est souvent asymptomatique ou encore qu'il présente des symptômes difficilement reconnaissables, surtout aux stades précoces de la maladie. En effet, seulement 25% des femmes sont diagnostiquées au stade précoce de la maladie où le taux de survie est de plus de 90% [22]. Un autre facteur important qui contribue au faible taux de survie des patientes est la chimiorésistance que celles-ci peuvent développer. La prévention et la détection précoce seraient les meilleurs moyens pour éviter les conséquences graves de ce cancer et augmenter les chances de survie. Afin de mieux comprendre la complexité du cancer de l'ovaire, nous devons tout d'abord bien comprendre son origine.

Chapitre 2.1 L'OVAIRE NORMAL

Les ovaires, deux petites glandes de la grosseur d'une olive Greque, sont responsables de la propagation de notre génome et ainsi de la survie continue de l'espèce humaine. Ces glandes sont à l'origine de la production des gamètes femelles mais, également de la sécrétion des hormones nécessaires à la féminisation et à la reproduction. Il y a plus de deux mille ans, Hippocrate (460 B.C-370 B.C), le père de la médecine à qui on attribue la première description du cancer, fût le premier aussi à voir et à décrire les ovaires. Depuis, la fascination pour l'étude de ces petits organes a été maintenue jusqu'aujourd'hui et nos connaissances vont bien au delà de simples observations.

Chapitre 2.1.1 L'anatomie de l'ovaire

Les ovaires chez la femme adulte ont une forme ovoïde. Pendant la période d'activité génitale, l'ovaire a une taille d'environ quatre centimètres et un centimètre d'épaisseur. Normalement, la surface des ovaires est mamelonnée et les irrégularités corticales s'estompent avec la ménopause où les ovaires s'atrophient et présentent une surface plutôt lisse ou cérébriforme [23]. Les ovaires sont situés dans la cavité péritonéale de chaque côté de l'utérus (Figure 3, page 8). Ils ne sont pas couverts de péritoine viscéral et sont donc les seuls organes intrapéritonéaux en contact direct avec le péritoine pelvien qui délimite l'espace de la cavité péritonéale et abdominale. Les ovaires sont maintenus par quatre ligaments, soit le ligament utéro-ovarien qui lie l'ovaire à l'utérus, le ligament tubo-ovarien qui unit l'ovaire à la trompe de Fallope, le ligament lombo-ovarien qui est le ligament suspenseur de l'ovaire et finalement le mésovarium qui le relie au ligament large [23, 24]. Les ovaires sont irrigués par deux artères, soit l'artère ovarienne et l'artère utérine en plus d'être entourés par un système veineux dense et complexe. À part la vascularisation artérielle et veineuse, une riche vascularisation lymphatique assure le drainage des ovaires.

THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM

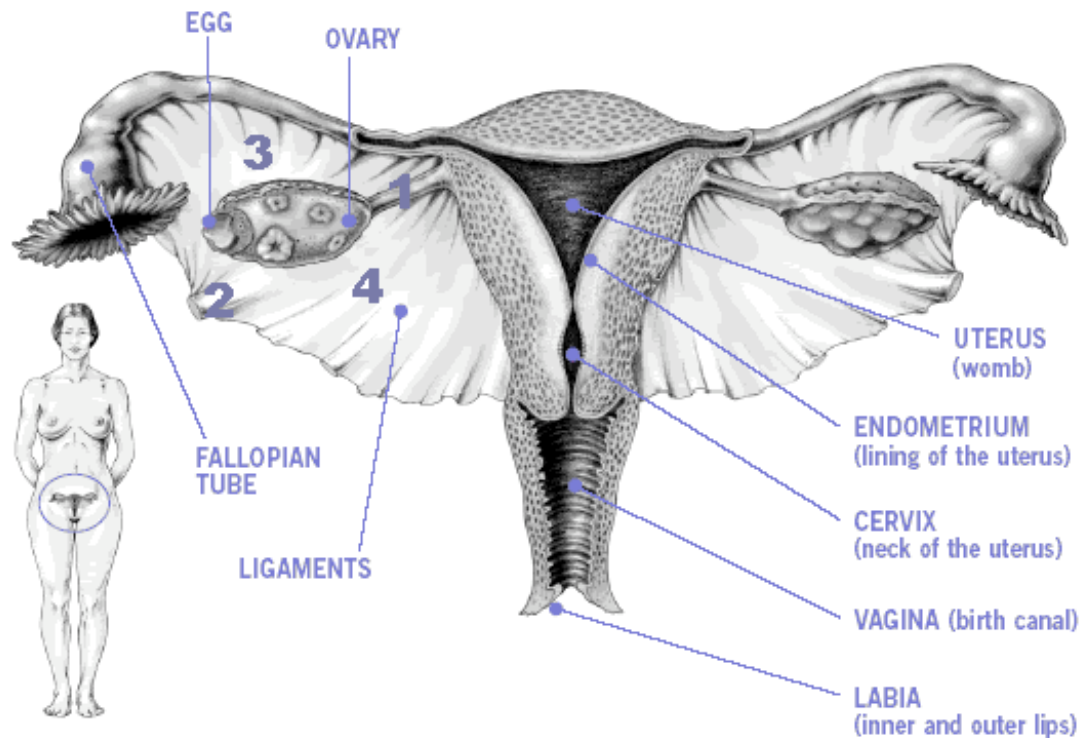


Figure 3. Anatomie du système reproducteur féminin.

L'ovaire est relié à l'utérus et aux trompes de Fallope par quatre ligaments. Le ligament large relie l'ovaire à l'utérus (1), le ligament lombo-ovarien est un ligament suspenseur (2), le ligament tubo-ovarien unit l'ovaire et la trompe de Fallope (3) et le mésovarium relie l'ovaire au ligament large (4). L'image est adaptée de la brochure « Ovarian Cancer 08 » de Cancer Council Victoria. L'illustration a été effectuée par M. Con Stanis.

Chapitre 2.1.2 Le développement embryologique de l'ovaire.

Le développement des gonades mâles et femelles s'effectue en deux phases distinctes. Lors de la première phase, il y a formation d'une crête génitale qui est alors indifférenciée et qui a le potentiel de former tant les organes reproducteurs mâles que femelles (Figure 4, page 10). Lors de la seconde phase, le destin des gonades indifférenciées vers les testicules ou encore des ovaires est déterminé. Lors de cette phase, l'acteur principal de la détermination de sexe est un gène situé sur le chromosome Y, soit le gène *SRY* (sex-determining region Y) [25]. Ce gène encode pour un facteur de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN caractéristique des protéines à boîte de groupement à haute mobilité HMG-box qui agissent en tant que régulateurs de l'expression génique [26]. La détermination du sexe a lieu très tôt dans la gestation, soit à la septième semaine de grossesse. En fait, en présence du produit de transcription du gène *SRY* du chromosome Y, il y a déclenchement de la différenciation des cellules Sertoli à partir des cellules précurseurs et des cellules de Leydig de la crête génitale dans le but de former des testicules. Inversement, en absence de ce gène, les ovaires se développeront. En plus du gène *SRY*, les facteurs de croissance encodés par *NR5A1* et *SOX9* jouent un rôle important dans la détermination du sexe. La majorité des défauts observés au niveau de la détermination du sexe peuvent être expliqués par des mutations à l'un ou l'autre des ces trois gènes [27].

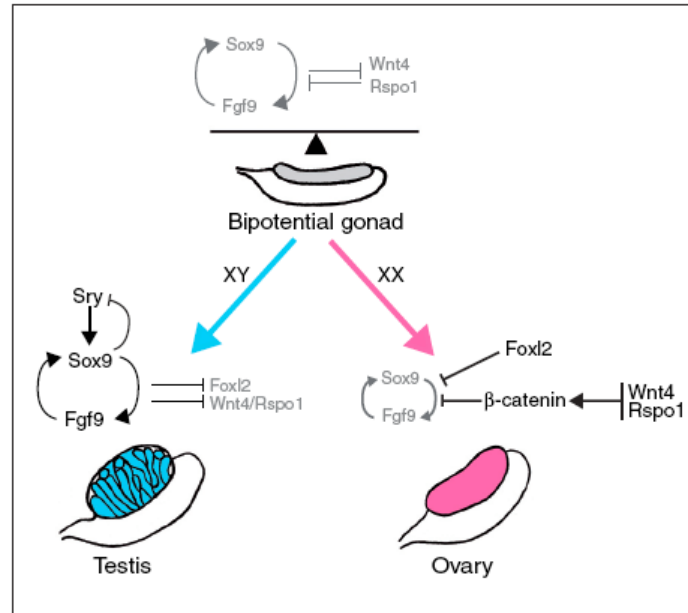


Figure 4. Les gonades immatures chez l'humain ont le potentiel de se différencier en ovaire ou testicule selon les signaux en place.

L'acteur principal lors de la différenciation est le gène *SRY*. En présence du produit de transcription du gène *SRY* du chromosome Y il y aura développement des testicules. Dans le cas contraire, la différenciation sera orientée vers les ovaires. Original Publisher BioMed Central [28].

Le processus de différenciation des gonades en ovaires chez l'humain n'a été démontré que relativement récemment. En effet, c'est seulement au début des années 90 que trois groupes ont illustré la conception moderne de l'embryogenèse ovarienne [29] [30] [31]. Ainsi, à la quatrième semaine post-conception, il y a formation de canaux de Müller à partir d'une invagination de l'épithélium cœlomique. Ces canaux vont ultérieurement se développer en voies génitales féminines chez les embryons qui sont génétiquement

femelles (XX). En parallèle des canaux müllériens, il y a formation des canaux de Wolff ancêtres des voies génitales masculines (Figure 5, page 12). En même temps que la formation de ces canaux, les cellules germinales primordiales (précurseurs des gamètes) quittent le sac vitellin pour migrer vers le mésonéphros qui correspond à la crête urogénitale. Ensuite l'épithélium cœlomique recouvrant une partie du mésonéphros se stratifie et s'épaissit pour former une protrusion dans le cœlome qui correspond alors à la gonade indifférenciée. Les cellules germinales se multiplient alors et prennent le nom de gonocytes (cellules à l'origine des gamètes). Jusque là, les voies génitales sont représentées par les deux systèmes de canaux parallèles et l'embryon a encore la capacité de former l'un ou l'autre des sexes. Durant la septième semaine, si l'embryon est génétiquement un mâle, l'expression du gène *SRY* va entraîner la sécrétion d'une hormone anti-müllérienne (AMH) par des cellules somatiques testiculaires Sertoli et Leydig. Cette hormone agit alors comme un inhibiteur de canaux de Müller. En absence du chromosome Y, il aura différenciation dans le sens femelle. Ainsi, vers la huitième semaine les canaux müllériens vont commencer à former l'utérus, les trompes de Fallope et la partie supérieure du vagin, et vers la dixième semaine, la gonade en différenciation deviendra ovaire [23, 30].

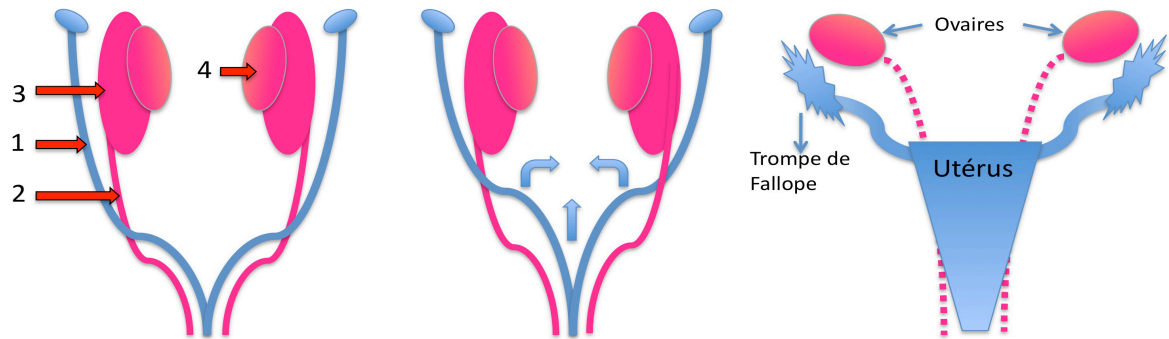


Figure 5. Le développement des voies génitales femelle chez l'humain.

La première image représente les canaux de Müller (1) et de Wolff (2), le mésonéphros (3), et la gonade indifférenciée (4) à la sixième semaine du développement. Ensuite, en absence du chromosome Y, les canaux de Müller vont fusionner pour former les voies génitales femelles, les canaux de Wolf vont dégénérer et la gonade indifférenciée se développera en ovaire.

Douze semaines après la fécondation, deux régions peuvent être distinguées dans l'ovaire sur le plan histologique. Tout d'abord, la partie superficielle ou corticale, qui est formée de cellules épithéliales et de gonocytes en prolifération dont le nombre peut atteindre jusqu'à 7 millions. Ensuite, la partie profonde ou médullaire qui contient du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Vers la seizième semaine, chaque gonocyte cherche à s'entourer de cellules épithéliales pour former les premiers follicules primordiaux. Les gonocytes incapables de le faire vont disparaître et on assiste alors à une diminution drastique d'ovocytes (à 1 million). Il y a également formation du stroma cortical à partir du mésenchyme qu'on retrouve entre les follicules primordiaux, de la thèque interne à partir du tissu endocrine et de la thèque externe à partir du tissu conjonctif. À la trentième semaine, une autre chute du nombre des ovocytes a lieu de sorte que seulement

300 000 subsistent à la naissance [23]. À la naissance, tous les ovocytes de la petite fille sont bloqués à la prophase de la première division méiotique et ont donc atteint un stade qu'on appelle diplotène. Ces ovocytes vont rester au stade de repos (dictyotène) jusqu'à la puberté, cependant l'ovaire continue de subir des changements tissulaires et morphologiques. À la puberté, l'ovaire atteint sa maturité physiologique et acquiert alors la capacité de produire et sécréter des hormones ainsi que de libérer des gamètes. Il y a alors maturation et croissance des organes reproducteurs ainsi que la féminisation des organes sexuels secondaires grâce à la sécrétion de l'œstrogène produite par l'ovaire. Vers la quarantaine, la sécrétion de l'œstrogène s'affaiblit et la femme entre en préménopause. Cette étape s'accompagne de changements hormonaux importants et les fonctions reproductrices s'éteignent ultimement à la ménopause qui est marquée par une absence du cycle menstruel.

Chapitre 2.1.3 L'histologie de l'ovaire

L'ovaire est constitué de trois zones distinctes, soit l'épithélium de surface, la zone corticale (ou zone périphérique), ainsi que la zone médullaire (ou centrale) (Figure 6, page 14). Chacune des trois zones de l'ovaire possède des rôles physiologiques distincts et chacun des tissus composant l'ovaire peut mener à une dégénérescence maligne particulière.

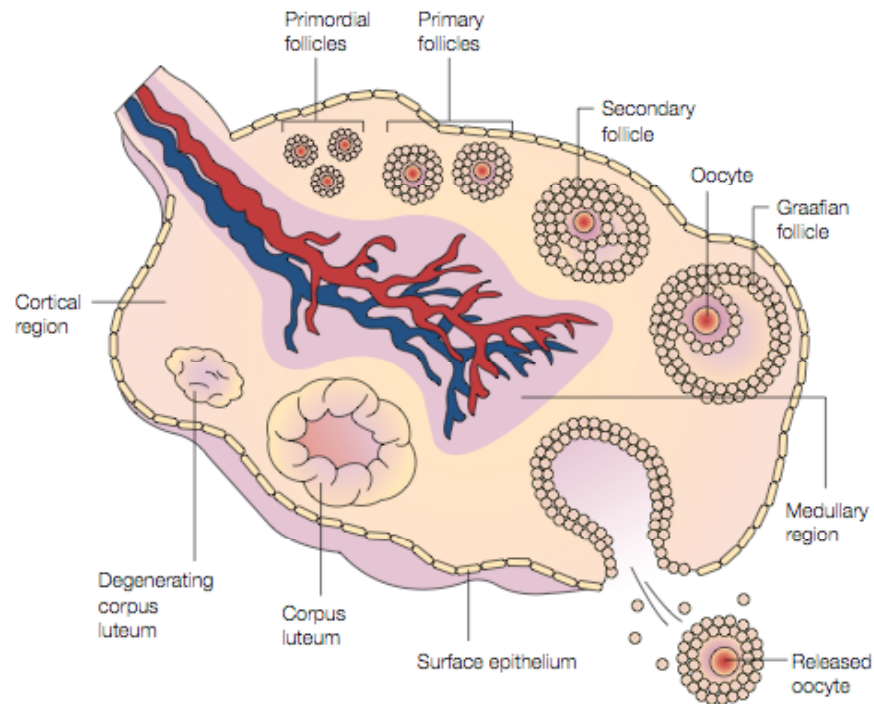


Figure 6. Représentation graphique de l'histologie d'un ovaire normal.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer [32], copyright 2005.

L'épithélium de surface (OSE) est une monocouche de cellules dérivées de l'épithélium cœlomique qui se trouve sur la surface extérieure des ovaires (Figure 7, page 15). Ces cellules ont une forme allongée ou cuboïdale, avec des noyaux hyperchromatiques et un cytoplasme peu abondant [24, 33]. Les cellules de l'épithélium sont séparées du stroma cortical par une mince matrice extracellulaire appelée la membrane basale. L'OSE a pour origine le revêtement pavimenteux du mésovarium dont il est en fait la prolongation. D'ailleurs, on réfère souvent à l'épithélium de surface comme un mésothélium puisque ces deux tissus partagent la même origine embryologique et quelques caractéristiques mésothéliales.

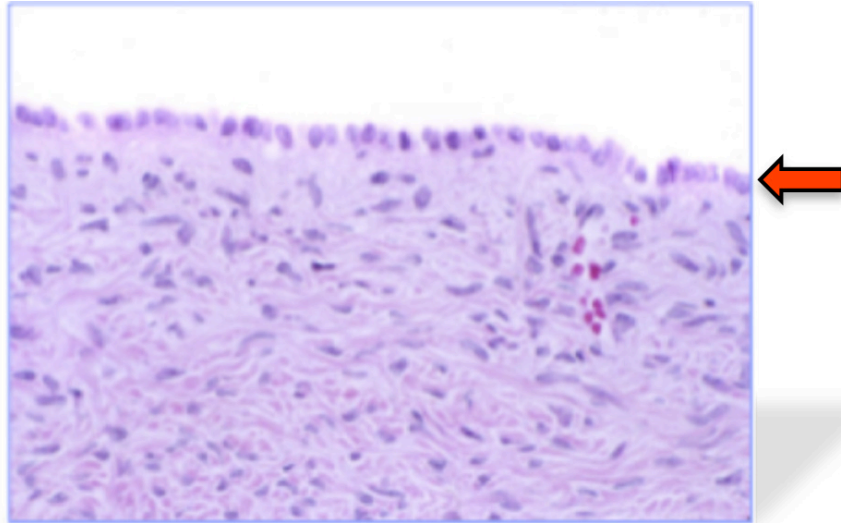


Figure 7. Coupe histologique d'un ovaire sain.

La flèche pointe la région où l'on peut voir en bordure l'épithélium de surface. Immédiatement sous la couche des cellules épithéliales se situe la membrane basale. (L'image est tirée des travaux effectués au sein du laboratoire).

Ainsi, l'épithélium de surface possède des caractéristiques mésenchymateuses ou stromales telles que la vimentine ou la N-cadhérine et l'absence de marqueurs de différenciation épithéliale tels que le CA125 et la E-cadhérine. Parmi les caractéristiques typiquement épithéliales on retrouve au niveau du OSE les kératines, les mucines, les desmosomes, les microvilli apicales et la lame basale. Malgré sa structure relativement simple, l'épithélium de surface joue un rôle important au niveau des ovaires. Les cellules de l'épithélium de surface sont tapissées par des microvillosités, ce qui suggère un rôle au niveau du transport d'ions et/ou autres molécules de et vers la cavité péritonéale. L'OSE

possède également des récepteurs pour les hormones, les facteurs de croissance et les cytokines qui ont des capacités régulatrices au niveau de la croissance et de la différenciation [33-35]. De plus, l'épithélium de surface prend part dans le cycle ovulatoire lors de la rupture des follicules matures afin de libérer l'ovule. En effet, les cellules de l'épithélium de surface humain des ovaires secrète des enzymes lysosomiaux qui détruisent les tissus conjonctifs constituant la paroi des ces follicules matures. Après l'ovulation, les cellules de l'épithélium de surface participent également dans le processus de réparation du follicule ovarien. Cette réparation peut résulter en une formation d'inclusions épithéliales dans le stroma qu'on appelle aussi kystes d'inclusion. Dû à leur origine épithéliale, ces derniers sont soupçonnés d'avoir la capacité de générer des cancers ovariens [36].

La zone corticale se retrouve immédiatement sous l'épithélium de surface et elle est composée tout d'abord d'une couche de tissu conjonctif dense et fibreux majoritairement composée de collagène qu'on appelle albuginée. Sous cette dernière, on retrouve le stroma cortical qui est parsemée d'organites ovariens aux différents stades de leur évolution. Parmi ces organites, on compte entre autres les follicules ovariens évolutifs, les follicules ovariens gamétogènes contenant des ovocytes, les follicules involutifs, les corps jaunes (dont l'origine est le follicule déhiscent après l'ovulation), les cellules germinales souches et les kystes d'inclusion. Les follicules sont entourés de cellules de la granulosa ainsi que des cellules de la thèque interne.

Finalement la zone médullaire n'a pas de limites précises et elle est située au centre de l'ovaire. Cette zone est en continuité avec le mésovarium et elle est composée de deux zones distinctes. Tout d'abord, une zone spongieuse parenchymateuse contiguë au stroma cortical composée de tissu conjonctivo-vasculaire et ensuite d'une zone hilaire fibreuse. Cette dernière est dépourvue d'organite et elle est parcourue par de gros vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cette zone contient également des cellules de Berger qui sont des cellules homologues des cellules de Leydig présents dans les testicules et qui sont spécialisées dans la sécrétion de l'androgène [23].

Chapitre 2.1.4 La physiologie des ovaires

Les deux principales fonctions des ovaires sont la sécrétion des hormones féminines, soit l'œstrogène et la progestérone (c'est la fonction endocrine) ainsi que la production et la libération tous les mois des ovules (fonction exocrine) [37] [24]. Le cycle hormonal des ovaires est un processus qui évolue normalement en quatre phases toujours dans le but ultime de libérer un ovule (Figure 7, page 19). Ce processus débute par la phase folliculaire au cours de laquelle s'effectue la maturation du follicule. Ainsi, au début de chaque cycle une cinquantaine d'ovocytes entourés de cellules folliculaires (follicule primordial) deviennent sensibles aux sécrétions hormonales sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, le taux d'œstrogène étant très bas à ce stade, l'hypothalamus sécrète l'hormone gonadotrophine (GnRH) qui à son tour stimule la sécrétion de l'hormone leutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) par l'hypophyse. Cette dernière intervient dans le développement et la maturation folliculaire ainsi qu'au niveau de la stimulation de la sécrétion de l'œstrogène. Le follicule poursuit sa maturation en accumulant des couches de cellules de la granulosa autour de l'ovocyte (follicule primaire). Les follicules continuent à grossir en follicules secondaires et tertiaires. À cette étape, il y a formation par les cellules de la granulosa d'une cavité (appelée « corps de Call-Exner ») remplie de liquide folliculaire. L'apport en nutriments aux cellules de la granulosa est assuré par les cellules stromales adjacentes au follicule qui sont alors différenciées en cellules de la thèque. Au fur et à mesure que le follicule grossit, les cellules de l'ovaire sécrètent de plus en plus d'œstrogène ce qui par rétrocontrôle stimule la sécrétion de la FSH par l'hypophyse. L'augmentation de la sécrétion de l'œstrogène entraîne également la modification des muqueuses vaginales et utérines dans le but de préparer le corps de la femme à une éventuelle fécondation et implantation d'un embryon. De plus, la sécrétion de l'œstrogène stimule la sécrétion de l'hormone LH qui s'accumule avec la maturation du follicule pour atteindre un pic de sécrétion. Le follicule atteint alors sa maturité et porte le nom de follicule mature ou follicule De Graaf. La maturation des ovules se fait par vagues, ainsi une vingtaine de follicules antraux répondent initialement à la stimulation hormonale cependant, normalement un seul, soit le follicule dominant, se

rend jusqu'à l'ovulation. Les autres follicules disparaissent par un processus apoptotique qu'on appelle l'atresie folliculaire. À la phase ovulatoire, LH joue alors un rôle au niveau du déclenchement de l'ovulation qui est manifestée par la rupture du follicule mature et la libération de l'ovocyte. Suite à cette rupture on atteint la phase lutéale au cours de laquelle, par un processus appelle la lutéinisation, les cellules de la granulosa et de la thèque augmentent de volume et accumulent des lipides dans leur cytoplasme pour former le corps jaune. Cette nouvelle unité, sous l'influence de la LH, a pour rôle de sécréter un peu d'œstrogène mais surtout des grandes quantités de progestérone. Cette dernière a pour fonctions d'inhiber la sécrétion de la LH et donc empêcher la maturation des autres follicules ainsi que de maintenir l'endomètre prêt à accueillir l'embryon suite à une fécondation. En cas d'absence de fécondation, le corps jaune dégénère, la sécrétion de progestérone chute et il y a déclenchement des règles ce qui correspond au début d'un nouveau cycle [24, 37].

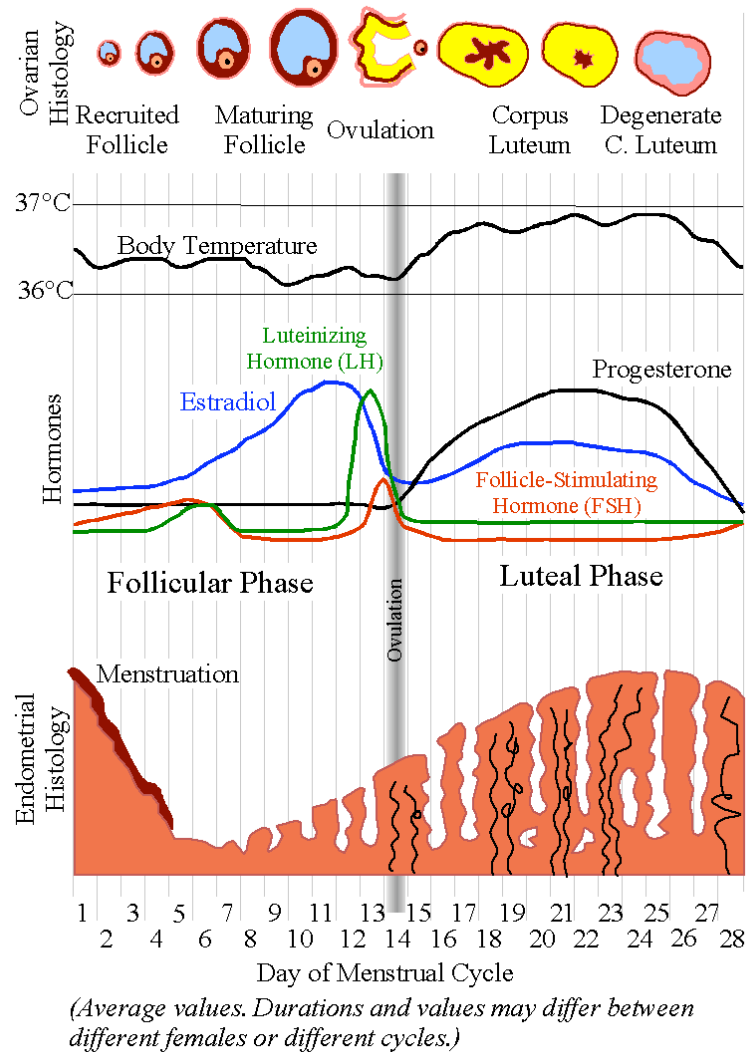


Figure 8. Représentation graphique du cycle ovulatoire chez la femme.

Les variations hormonales induisent la maturation des follicules, l'ovulation ainsi que des modifications de l'histologie de l'endomètre. Image tirée de www.Wikipedia.org sous la définition « menstrual cycle ».

Chapitre 2.2 Les tumeurs ovariennes

La composition cellulaire variée de même que l'embryogenèse sophistiquée des ovaires font en sorte que les pathologies de ces organes sont complexes. Afin de classer les tumeurs ovariennes, on utilise le plus souvent la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elle consiste à distinguer des groupes de tumeurs ovariennes en se basant sur les corrélations morphologiques de l'aspect histologique de la tumeur et celui des constituants de l'ovaire normal (Figure 9, page 20). De façon générale, les tumeurs ovariennes sont classées selon leur origine cellulaire en trois différentes catégories et chacune inclut un nombre de sous-types. Ainsi, plus de 80% des tumeurs ovariennes sont d'origine épithéliale. Les tumeurs germinales et les tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels comptent pour environ 20% des cancers ovariens [38].

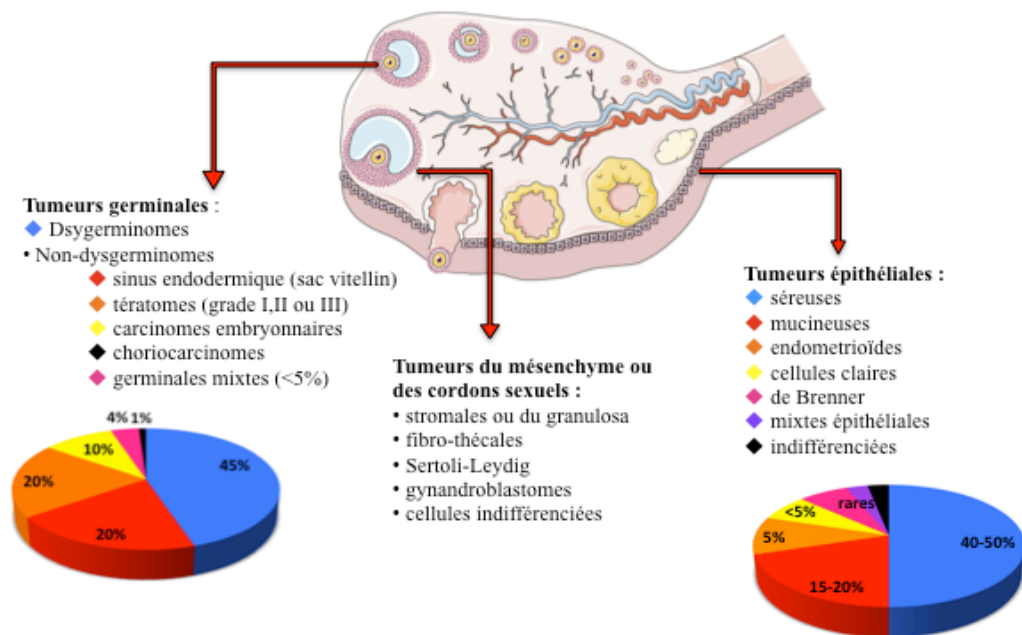


Figure 9. Représentation de différentes classifications selon l'origine cellulaire du quel dérivent les trois grandes classes des tumeurs ovariennes.

Chapitre 2.2.1 Les tumeurs du mésenchyme des cordons sexuels

Les tumeurs dérivées des cordons sexuels et du mésenchyme de l'ovaire comptent pour environ 5 à 8% de l'ensemble des tumeurs ovariennes et regroupent une variété des lésions dérivées de ces cellules [39, 40]. Les éléments qui composent le mésenchyme et les cordons sexuels ont une apparence cytologique ou une disposition architecturale qui semblent être indifférenciées. Cependant ces cellules comportent souvent un certain degré de différenciation penchant vers le sens ovarien ou testiculaire. Ainsi, les tumeurs dérivant des ces tissus sont composées de différents éléments « féminins » et « masculins ». Les tumeurs dites féminines sont surtout représentées par les tumeurs stromales ou de la granulosa, alors que les tumeurs masculines correspondent aux tumeurs de Sertoli-Leydig (androblastomes). Les tumeurs stromales peuvent être associées avec une sécrétion anormale d'hormones stéroïdiennes puisque la production de ces hormones a lieu dans le stroma. Il y a également des tumeurs gynandroblastomes qui proviennent d'une combinaison en proportion variables des deux types de cellules, cependant ces tumeurs sont plutôt rares. Les tumeurs développées à partir du mésenchyme ou des cellules thécales forment le groupe des tumeurs du groupe fibro-thécal. Un dernier groupe de tumeurs originant du mésenchyme et des cordons sexuels dérive d'un groupe de cellules indifférenciées [23, 41-43]. Finalement, il faut souligner que les tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels sont parmi les plus rares des cancers ovariens, et qu'environ 70% des patientes présentant ce type de tumeurs sont diagnostiquées au stade I de la maladie. Ceci est dû au fait que ces tumeurs présentent souvent des symptômes spécifiques dû à leur activité hormonale.

Chapitre 2.2.2 Les tumeurs des cellules germinales

Les tumeurs germinales sont le deuxième groupe de cancers de l'ovaire en terme de fréquence et représentent environ 15 à 20% des tumeurs ovariennes. Les lésions tumorales des cellules germinales se développent à partir des cellules germinales primordiales de la gonade embryonnaire. Ce type de cancer peut être diagnostiqué chez les femmes de tous les

âges. Cependant le pic d'incidence est observé chez les femmes près de la vingtaine. La majorité des tumeurs des cellules germinales, soit 95%, forment des tératomes kystiques bénins qui sont plutôt faciles à diagnostiquer. Cependant, les 5% restantes sont des tumeurs malignes qui sont plus problématiques au niveau du diagnostique, particulièrement en cas d'association avec plusieurs types histologiques de tumeurs [23, 44]. La classification des tumeurs de cellules germinales est basée sur la différenciation des cellules retrouvées à l'intérieur de la tumeur même. Ainsi, les tumeurs sont divisées en deux groupes histologiques, soit les dysgerminales (l'équivalent des séminomes dans les testicules) et les tumeurs non-dysgerminales. Ce dernier groupe comprend cinq sous-types de tumeurs, soit les tumeurs du sinus endodermique ou du sac vitellin, les tératomes (qui sont eux classifiés en trois grades selon l'extension de la maladie), les carcinomes embryonnaires (très rares et composés de cellules multipotentes et pauvrement différenciées), les choriocarcinomes (extrêmement rare et le pronostic est souvent très mauvais) et finalement les tumeurs germinales mixtes (associant au moins deux composantes malignes de type germinal) [23, 38, 41, 43].

Chapitre 2.2.3 Les tumeurs épithéliales

Les cancers épithéliaux de l'ovaire (EOC) sont le plus important groupe des cancers ovariens. En effet plus de 80% des ces derniers sont d'origine épithéliale, ce qui rend l'épithélium de surface de l'ovaire central au niveau de la tumorigenèse de l'ovaire. La classification des tumeurs épithéliales est établie selon quatre différents critères : la malignité des cellules, le stade selon le degré d'étendue de la maladie, le grade selon le degré de différenciation cellulaire et l'origine histologique des tumeurs.

Tout d'abord, les tumeurs peuvent être classées selon la malignité des cellules. La définition du mot malignité est le caractère de quelque chose qui cherche à nuire. D'ailleurs, l'origine de ce mot vient des mots grecs « *mal* » qui veut dire mauvais et « *ignis* » qui signifie feu. Par analogie on peut imaginer le cancer comme un mauvais feu qui au fur et à mesure qu'il grandit cause de plus en plus de dommages. Ainsi, les tumeurs

bénignes sont représentées par des cellules qui n'ont pas de prolifération exubérante et de comportement invasif. Ensuite, les tumeurs à faible potentiel de malignité (ou « borderline ») ont la capacité de proliférer de façon importante mais, le plus souvent, sans lieu d'invasion. Finalement, on a les tumeurs malignes lorsque les cellules ont acquis la capacité d'invasion.

En plus de cette classification, on évalue l'étendue et la sévérité de l'atteinte tumorale en y attribuant un stade (de I à IV) (Table I, page 24). Le premier stade correspond aux tumeurs qui sont limitées aux organes à partir desquels ils se développent, en occurrence les ovaires. Les tumeurs du stade II présentent la caractéristique de dissémination aux organes pelviens sans atteindre les organes abdominaux. Ainsi, les tumeurs au stade II sont soit unilatérales (IIA) ou bilatérales (IIB) avec extension pelvienne qui peut être au niveau génital (utérus et trompes) ou viscéral (vessie, intestin grêle adjacent) respectivement, ou encore avec une présence d'ascite (IIC). Au troisième stade, les tumeurs sont unilatérales ou bilatérales avec métastases intrapéritonéales et extrapelviennes. Enfin, le stade IV correspond aux tumeurs unilatérales ou bilatérales avec des métastases à distance comme par exemple des métastases hépatiques, pleurales ou pulmonaires (Figure 10, page 25) [45].

Le degré de différenciation de la tumeur permet également de les classer en grades (G0 à G3). Les tumeurs à faible potentiel de malignité sont de Grade 0 et les tumeurs invasives sont classées en Grade 1 (bien différenciées), en Grade 2 (modérément différenciées) ou Grade 3 pauvrement différenciées. Ce système de gradation, établi par FIGO, est basé sur trois variables. Tout d'abord l'indice mitotique qui varie de 0 à 3 selon le nombre de mitoses retrouvées par champs d'observation. Ensuite, on observe le nombre d'atypies nucléaires (0 à 3). Le dernier critère est l'architecture histologique dominante qui peut être glandulaire (Grade 1, <5% de la tumeur est solide), papillaire (Grade 2, 5 à 50% de la tumeur est solide) ou encore solide (Grade 3 >50% de la tumeur est solide).

Stage I	Limited to ovaries
Ia	One ovary
Ib	Both ovaries
Ic	Ruptured capsule, surface tumor or positive washings ^a
Stage II	Pelvic extension
IIa	Uterus, tube(s)
IIb	Other pelvic tissue
IIc	Positive washings, ascites
Stage III	Abdominal extension and/or regional lymph nodes
IIIa	Microscopic peritoneal metastases
IIIb	Macroscopic peritoneal metastases ≤ 2 cm
IIIc	Macroscopic peritoneal metastases > 2 cm and/or regional lymph nodes
Stage IV	Distant metastases outside peritoneal cavity

Table I. Description du stade de la tumeur selon la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) et American Joint Committee on Cancer (AJCC) [46].

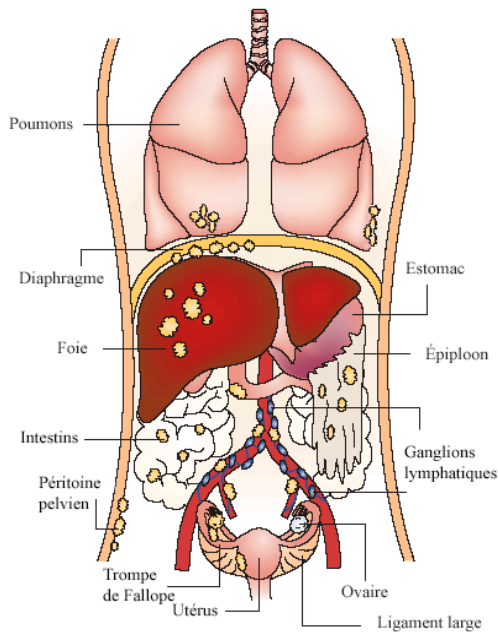


Figure 10. Patron de dissémination du cancer épithélial de l’ovaire.

Au départ la tumeur est confinée aux ovaires sans que la capsule ovarienne ne soit brisée. Une fois cette barrière traversée, la tumeur se répand aux tissus avoisinants tels que les trompes de Fallope, l’utérus, le péritoine pelvien ou encore au ligament large. La circulation normale du liquide péritonéal fait en sorte que la dissémination des cellules tumorales se fait vers la gouttière para-ortique droite et sous la surface de l’hémi-diaphragme droit. Puisque les ovaires sont des organes uniques en contact direct avec la cavité péritonéale, les cellules tumorales peuvent facilement cibler les organes recouverts de péritoine ainsi que l’épiploon. La voie lymphatique rétro-péritonéale permet également la dissémination des cellules tumorales. Finalement, les organes distants comme les poumons, le foie et le cerveau peuvent être atteints via la voie hématogène [23, 47, 48]. Adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer [32], copyright 2005.

Finalement, on distingue également les groupes de tumeurs épithéliales ovariennes en se basant sur les corrélations morphologiques de l'aspect histologique de la tumeur et celui des constituants de l'ovaire normal. Ainsi, les tumeurs épithéliales peuvent être classées en tumeurs séreuses (les plus communes), mucineuses, endométrioïdes, de Brenner, des adénocarcinomes à cellules claires, mixtes épithéliales et des carcinomes indifférenciés [23]. En fait, si la classification d'EOC en plusieurs types histologiques, en théorie tous dérivés de l'épithélium de surface, est possible, c'est largement dû au fait que la différenciation de cet épithélium n'est pas complètement déterminée comme dans les autres épithéliums chez l'adulte (ex. : celui de l'utérus). En absence d'ovulation, l'OSE normal est dans un état de mésothélium stationnaire qui possède autant des caractéristiques épithéliales que mésenchymateuses. Contrairement à d'autres mésothéliums, l'OSE a la capacité d'altérer son état de différenciation. Ainsi, lors de la réparation de la surface ovarienne suite à une ovulation, les cellules de l'OSE acquièrent un phénotype stromal. Cependant, lors de la progression tumorale ou en métaplasie, les cellules de l'épithélium développent des caractéristiques complexes des épithéliums dérivés comme par exemple les canaux Müllériens. Ces caractéristiques démontrent qu'en fait l'épithélium de surface des ovaires serait plus rapproché de son précurseur embryonnaire pluripotent que les autres organes dérivés de l'épithélium cœlomique [33]. Les changements de différenciation de cet épithélium à la base assez simple font en sorte qu'au niveau de l'histologie, les carcinomes ovariens sont parmi les cancers humains les plus complexes.

Les tumeurs ovariennes du type séreux représentent l'histopathologie la plus fréquente, en effet de 40 à 60% (certains affirment jusqu'à 80%) des carcinomes ovariens seraient de ce type [23, 49]. Environ 50% des ces tumeurs seraient malignes, 33% bénignes et 17% à faible potentiel de malignité. Les tumeurs malignes séreuses présentent surtout une architecture cellulaire papillaire qui ressemble à celle des cellules des trompes de Fallope. Cependant, les apparences histologiques internes de ces tumeurs peuvent grandement varier. Aux stades avancés, elles sont bilatérales dans environ 75% des cas. Les tumeurs séreuses sont diagnostiquées le plus souvent chez les femmes de 40 à 60 ans et

le taux de survie à cinq ans de ces patientes n'est que de 20 à 30% suite au diagnostic [23, 50].

Environ 15 à 20% des EOC sont du type histopathologique endométrioïde et les cellules qui composent ces tumeurs présentent des caractéristiques des cellules de l'endomètre. De plus, la majorité des ces tumeurs (soit environ 80%) sont malignes et elles sont surtout diagnostiquées chez les femmes péri- ou post-ménopausées (50-70 ans). Comme les tumeurs endométrioïdes sont surtout diagnostiquées au stade I ou II de la maladie, le pronostic des patientes diagnostiquées est meilleur avec un taux de survie à cinq ans de plus de 50%. Les cancers endométrioïdes sont bilatéraux dans environ 30% des cas et 15 à 20% sont associés avec un carcinome de l'endomètre [50].

Les tumeurs mucineuses sont caractérisées par la prolifération de cellules qui peuvent sécréter de la mucine et dont l'histologie rappelle celle de l'épithélium endocervical ou intestinal. Elles sont moins fréquentes que les tumeurs séreuses et représentent environ 12 à 15% des tumeurs ovariennes. Ce sont des tumeurs habituellement assez grosses (>20 cm de diamètre) mais dont la majorité sont bénignes (75-80%). Les tumeurs mucineuses malignes comptent pour moins de 5% des cancers épithéliaux de l'ovaire. Les tumeurs mucineuses sont rarement bilatérales et la survie des patientes à cinq ans est similaire à celle des patientes atteintes d'une tumeur endométrioïde (50%) [23, 49, 50].

Un autre type d'EOC est représenté par les tumeurs à cellules claires qui comptent pour environ 6% des tumeurs épithéliales. Ces tumeurs se caractérisent par la présence de larges cellules remplies de glycogène. Leur architecture histologique est assez complexe avec des caractéristiques papillaires, glandulaires, tubulo-kystiques ou encore comportant des zones de cellules compactes. Malgré le fait que la plupart de ces tumeurs sont diagnostiquées aux stades précoces (I ou II), le pronostic n'est pas très favorable et la survie à 5 ans chute de 69% au premier stade à 14% au deuxième. Cependant, il faut souligner que les tumeurs à cellules claires sont plus difficiles à traiter puisqu'elles ont un taux de réponse à la chimiothérapie plus faible.

Finalement, une dernière catégorie comprend les tumeurs qu'on qualifie de rares, soit les tumeurs de Brenner, les tumeurs à cellules transitionnelles, les tumeurs mixtes épithéliales et les carcinomes indifférenciés. Les tumeurs de Brenner sont majoritairement bénignes, mais lorsque malignes, elles peuvent être associées aux cellules transitionnelles. Les tumeurs mixtes épithéliales sont diagnostiquées lorsqu'au moins deux des cinq éléments histologiquement distincts décrits plus haut sont présents et que chacun constitue au moins 10% de la tumeur. La catégorie des carcinomes indifférenciés regroupe toutes les tumeurs épithéliales trop peu différenciées pour être incluses dans une ou l'autre des catégories précédentes. Environ 2% des tumeurs sont des carcinomes indifférenciés [23, 49, 50].

Chapitre 2.3 La carcinogenèse d'EOC

Chapitre 2.3.1 Ovulation incessante

La majorité des cancers ovariens ont pour origine l'épithélium de surface des ovaires et différentes hypothèses ont été émises afin d'expliquer la fréquence et la carcinogenèse du cancer épithélial de l'ovaire. Le fait que les cellules de l'épithélium de surface soient appelées à se diviser rapidement et possèdent un haut taux de prolifération suite à la réparation d'une blessure post-ovulatoire peut être un facteur important dans l'initiation du cancer épithélial de l'ovaire [36]. Ainsi, il est connu que les femmes nullipares ont un risque accru (de 30 à 60%) de développer le cancer de l'ovaire versus les femmes multipares [51, 52]. Basé sur cette observation, le pathologiste du nom de Fathalla fut le premier à proposer en 1971 l'hypothèse de l'ovulation incessante [53]. Selon cette théorie, la rupture fréquente de la surface de l'épithélium durant l'ovulation serait un processus de prédisposition maligne. Il a également fait référence aux données des études sur des poules forcées à ovuler incessamment et qui présentaient une haute fréquence de carcinomatose péritonéale probablement d'origine ovarienne [54]. Fathalla croyait qu'il devait y avoir un lien entre la transformation et les répétitions fréquentes de divisions

cellulaires de l'épithélium de surface afin de réparer la blessure suite à l'ovulation. De nombreuses études épidémiologiques ont effectivement démontré que l'accumulation des cycles ovulatoires est un facteur qui augmente le risque du cancer de l'ovaire [55]. De plus, nous savons que le simple processus de réplication d'ADN est mutagénique en soi puisqu'il est prompt à l'erreur [56]. Ceci est encore plus important au niveau du OSE qui est un tissu génétiquement fragile à la transformation. En effet, en comparaison aux épithéliums qui doivent être régénérés fréquemment (ex. : intestin ou peau), les cellules de l'épithélium ovarien sont moins bien adaptées pour réparer les blessures. Des études *in vitro* ont montré que les cellules maintenues en quiescence par l'inhibition de contact présentent moins de signes de transformation que les cellules de l'OSE en croissance [57, 58]. Ainsi, les facteurs comme les contraceptifs oraux et la grossesse protègent entre autres contre le cancer de l'ovaire en diminuant le nombre d'ovulations [33, 34, 55, 59]. Des éléments supplémentaires sont venus appuyer l'hypothèse de l'ovulation incessante comme l'augmentation de l'incidence des cancers ovariens chez les femmes ayant subi des stimulations d'ovulation dans le cadre d'un traitement de stérilité et une incidence plus élevée des EOC chez les religieuses et les femmes célibataires [23, 41, 48, 60].

Chapitre 2.3.2 Kystes d'inclusion

Les cancers épithéliaux de surface peuvent également être originaires des cellules épithéliales à l'intérieur des invaginations épithéliales, ou kystes d'inclusions, que l'on retrouve dans le stroma. En effet, les kystes d'inclusion sont non seulement souvent des sites de métaplasies bénignes où les cellules peuvent présenter des caractéristiques de l'épithélium des canaux müllériens, mais également des sites de progression néoplasique précoce [61-63]. On a longtemps cru que ces invaginations étaient formées lors de la réparation de l'épithélium de surface suite à la rupture des follicules lors l'ovulation et que la formation des kystes d'inclusion était dépendante de la fréquence d'ovulation. Cependant, Scully *et al.* [63] ont démontré que les femmes multipares qui ovulent donc moins souvent que les femmes nullipares présentent un plus grand nombre de ces kystes

d'inclusion. De plus, un nombre particulièrement élevé de ces dernières a été retrouvé chez des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques, une maladie qui est caractérisée par une absence d'ovulation. Il est très probable que la formation de kystes d'inclusion est un processus dynamique entre l'épithélium de surface et le stroma sous-jacent. Cependant, les recherches de Scully l'ont également amené à une hypothèse où les kystes d'inclusion pourraient être le résultat d'une adhérence d'OSE aux sites d'invaginations combinée à une prolifération locale des cellules du stroma [63].

Une fois les kystes d'inclusion formés, les cellules du OSE se trouvent alors dans un microenvironnement nouveau, riche en hormones qui peuvent altérer la différenciation et la croissance de ces cellules ou encore induire une transformation néoplasique des cellules « vulnérables » comportant des dommages à l'ADN. Deux différents scénarios ont été proposés pour expliquer la susceptibilité de ces cellules à développer des tumeurs. Tout d'abord, l'épithélium de surface emprisonné dans un kyste d'inclusion n'est plus séparé du stroma par la membrane basale. Ainsi, ces cellules épithéliales ont un accès plus facile aux facteurs de croissance, cytokines et autres molécules bioactives qui peuvent promouvoir une progression néoplasique. En effet, certaines études des kystes d'inclusion proches de la surface ovarienne ont appuyé cette hypothèse en décrivant des changements métaplasiques ou dysplasiques plus prononcés du côté rapproché du stroma par rapport à celle à proximité de la membrane basale [62, 63]. Deuxièmement, il a été proposé que la progression néoplasique des cellules du OSE à l'intérieur des kystes serait stimulée par des mécanismes autocrines. Les cytokines et les hormones dérivées du OSE à la surface des ovaires sont normalement diffusées dans la cavité pelvienne. Cependant, confinées dans le kyste ces agents peuvent s'accumuler à des concentrations bioactives capables d'induire des changements néoplasiques. Cette hypothèse est supportée par des études qui ont démontré que l'OSE est capable de sécréter des cytokines telles que IL-1 et IL-6 [64] et que ces dernières améliorent la prolifération des carcinomes ovariens [65, 66].

Chapitre 2.3.3 Gonadotrophine

Dans les années 1990, de nouvelles études montraient que les femmes qui ont subi des traitements de fertilité présentaient un risque plus élevé de développer des tumeurs ovariennes autant bénignes que malignes [67-69]. Les drogues utilisées afin de stimuler ou induire l'ovulation chez ces femmes contenaient des hormones gonadotrophiques ou encore des stimulants de la sécrétion intrinsèque de la gonadotrophine. Ainsi, une hypothèse fût émise stipulant la possibilité de relation entre les gonadotrophines et la carcinogenèse ovarienne. Ainsi, des niveaux élevés de gonadotrophines telles que la FSH et la LH stimuleraient la production d'œstrogène et donc la prolifération de l'OSE et plus particulièrement du OSE à l'intérieur des kystes d'inclusion [70]. Cette hypothèse est supportée par le fait que les cancers ovariens se développent le plus souvent chez les femmes péri- ou post-ménopausées quand les niveaux de gonadotrophines sériques sont les plus élevés [53]. De plus, les risques de développer un cancer épithélial de l'ovaire sont plus élevés chez les patientes atteintes du syndrome polykystique des ovaires qui est caractérisé par une hypersécrétion de la LH [71]. L'hypothèse de la gonadotrophine comme un facteur important pour la tumorigenèse ovarienne est encore sujet à débat [72-76]. En effet, certaines études ont montré que l'allaitement est un facteur protecteur au développement de l'EOC et ce malgré une augmentation du niveau de la FSH [77, 78]. De plus, même si les gonadotrophines sont connues pour stimuler la tumorigenèse des gonades dans les animaux expérimentaux, les tumeurs développées ne sont pas des carcinomes mais plutôt des tumeurs semblables aux tumeurs de la granulosa [79].

Chapitre 2.3.4 L'endométriose

Une autre hypothèse de l'origine du cancer stipule que l'endométriose serait être à l'origine du cancer de l'ovaire. Les premières études effectuées par Samson *et al.* décrivant le lien possible entre ces deux maladies remontent jusqu'en 1925 [80]. Depuis, de nombreuses études ont démontré ce lien possible [81-83]. L'endométriose est une maladie gynécologique assez commune dont la prévalence chez les femmes préménopausées d'âge

adulte est d'environ 10% [84]. Cette maladie est caractérisée par la présence de tissu endométrioïde à l'extérieur de la cavité utérine et en particulier sur les trompes de Fallope et au niveau de ovaires [85]. L'endométriose est une maladie bénigne. Cependant elle présente également des caractéristiques normalement attribuables à une maladie maligne comme le développement d'implants locaux et distants, l'attachement, l'invasion et dommages aux tissus avoisinants, sans pour autant conduire jusqu'au décès de la patiente atteinte [86]. Certaines études démontrent que le risque de développer un cancer de l'ovaire (du type endométrioïde ou des cellules claires invasif) triple chez les femmes qui sont ou ont été atteintes d'endométriose [87]. Certains types d'endométrioses, comme celles présentes sur les ovaires, seraient donc une maladie de nature pré-maligne qui prédisposerait les femmes atteintes à développer un cancer de l'ovaire.

Chapitre 2.3.5 La trompe de Fallope

Depuis quelques années, de plus en plus d'attention est accordée au rôle que peut jouer la trompe de Fallope dans la genèse du cancer épithélial de l'ovaire surtout dans le cas des cancers de haut grade. En 2001, Piek *et al.* ont remarqué lors de l'examen de l'épithélium de la fimbriae provenant de patientes mutées en *BRCA1* ayant subi des ovariectomies prophylactiques une incidence de 50% de dysplasies épithéliales [88]. L'épithélium de surface de la fimbriae est composé de deux types de cellules, les cellules sécrétoires et les cellules ciliées. Dans leur étude, Piek *et al.* ont constaté dans les régions dysplasiques de la fimbriae une perte totale des cellules ciliées et une transition vers un profil sécrétoire avec une augmentation de prolifération. Des études subséquentes ont également décrit la présence de tumeurs dans les trompes de Fallope chez les femmes mutées en *BRCA*, qui ont un risque plus élevé de développer des cancers ovariens [89-91]. Des études plus précises avec des cohortes plus grandes de patientes à risque ont montré de plus que les carcinomes de trompes de Fallope se situent surtout dans la partie fimbriae et que beaucoup de ces tumeurs sont de type séreux [92, 93]. Ainsi, on croit que lorsque la partie distale (soit la fimbriae qui est exposée au même milieu inflammatoire et hormonal

que l'EOC) frotte sur l'ovaire, elle y dépose à la surface des cellules cancéreuses qui vont croître en tumeurs.

À la lumière de ces recherches, un modèle fût proposé qui intègre les différentes origines possibles du cancer épithélial de l'ovaire. Ainsi, on suggère qu'il y aurait deux différentes voies de formation de cancers de l'ovaire. Tout d'abord, dans les cas des cancers de haut grade de type séreux, l'hypothèse de l'origine de la trompe de Fallope serait favorisée. Donc, une combinaison de mutations du gène suppresseur de tumeurs p53 et du stress génotoxique mènerait à une expansion clonale de cellules sécrétoires de l'épithélium de la fimbriae et éventuellement le développement de carcinomes. Ensuite, ces cellules migreraient vers l'épithélium de surface de l'ovaire où il y aura alors une rapide croissance tumorale. La deuxième voie, implique la formation de tumeurs à partir des kystes d'inclusion ou encore de l'endométriose qui seraient à l'origine de tumeurs de bas grade qui se développent plus lentement (soit de type endometriöide, mucineux, cellules claires et séreux bas grade) suite à l'accumulation de différentes mutations [94, 95].

Chapitre 2.4 Les aspects cliniques de l'EOC

Chapitre 2.4.1 Séméiologie

Les symptômes provoqués par le développement d'un cancer ovarien sont souvent vagues, difficilement décelables et parfois trompeurs. Inconfort, douleur ou pression à l'abdomen, indigestion, flatulences, malaises gastriques, une miction plus fréquente, nausées font parties des symptômes de la maladie précoce où les chances de guérison sont encore très bonnes [23]. Cependant, ces symptômes déroutants font en sorte que la majorité des cancers sont diagnostiqués à un stade avancé et parfois ce diagnostique est fait par des médecin gastroentérologues ou des chirurgiens généralistes. Certaines études ont montré que le genre de symptômes peut avoir un impact direct sur la survie de la patiente. En effet, lorsque parmi les symptômes on retrouve un saignement vaginal, la survie de ces patientes à 5 ans monte à plus de 45% versus des patientes qui présentaient des symptômes comme la

constipation, un amaigrissement, des douleurs abdominales ou même un ascite [96]. De plus, le fait que les ovaires se trouvent profondément dans la cavité péritonéale fait en sorte que la tumeur peut atteindre une taille importante avant qu'elle ne soit décelable à l'examen clinique ou encore dérangement pour les mouvements de la patiente. Le cancer épithélial de l'ovaire est souvent appelé le « tueur silencieux » puisque lorsque les symptômes sont décelés et associés à cette maladie, la survie des patientes est fortement compromise.

Chapitre 2.4.2 Diagnostique

À ce jour, il n'existe pas encore de programme de dépistage efficace pour l'EOC et donc le diagnostic s'effectue malheureusement le plus souvent lors de l'examen gynécologique routinier ou encore suite à l'apparition des symptômes. Cette situation mène souvent à un délai au niveau du diagnostic et donc un plus grand risque de mortalité associé avec la détection tardive de l'EOC. Étant donné que la prévention ou encore la détection précoce de l'EOC sont les meilleurs moyens de lutter contre ce cancer, il est primordial que les femmes ainsi que les cliniciens soient bien éduqués à reconnaître et réagir le plus rapidement possible face aux symptômes connus. Ainsi, la première étape du dépistage est le plus souvent la palpation de l'abdomen afin de vérifier s'il y a présence de masses. Cependant, comme les ovaires sont de petites glandes bien enfouies dans l'abdomen et que la palpation reste un test de nature subjective, des petites masses aux stades précoces et mêmes de plus grandes masses aux stades plus avancés peuvent facilement passer inaperçues. Lorsque le médecin soupçonne la présence d'une tumeur ovarienne des tests d'imagerie (ultra-son, CT scan ou MRI) de l'abdomen et de la cavité pelvienne sont recommandés. Ces examens ne sont pas assez précis afin de donner un diagnostic de cancer de l'ovaire mais, ils peuvent fournir un peu plus d'information au sujet de la localisation et l'étendue du possible cancer. En plus des tests d'imagerie, on effectue une mesure de niveau de CA125 sanguin. Le CA125 est un antigène tumoral qui a été identifié pour la première fois en 1981 à l'aide d'un anticorps monoclonal murin spécifique pour le cancer épithélial de l'ovaire type séreux [97]. Le CA125 est une large

glycoprotéine transmembranaire encodée par le gène mucine 16 (*MUC16*) et composée de trois domaines, soit la queue cytoplasmique, le site de phosphorylation pour un clivage protéolytique et un domaine transmembranaire. C'est ce deuxième domaine qui contient l'épitope CA125 qui est reconnu par l'anticorps monoclonal [97]. Le CA125 était un marqueur très prometteur puisqu'il est détecté à des niveaux plus élevés (35U/mL) chez la majorité des patientes atteintes d'un EOC avancé. Cependant, seulement dans 50% des cas de cancers ovariens précoces sont caractérisés par des niveaux d'expression plus élevés de CA125 [98]. En plus de cette pauvre sensibilité pour des cancers ovariens aux étapes précoces, la spécificité de CA125 est limitée par le fait que différentes conditions bénignes tant gynécologiques que non-gynécologiques (ex. endométriose, salpingite, hépatite, péritonite) peuvent être la cause d'une surexpression de cet antigène. Les analyses de niveaux d'expression de cet antigène sont de plus compliquées par l'âge de la patiente. Ainsi, chez les femmes préménopausées, la principale cause de CA125 élevé, dont les niveaux peuvent atteindre plus de 1000U/mL, est l'endométriose [99]. Cependant, comme il est moins probable que ce type de maladie affecte les femmes postménopausées, les niveaux élevés de CA125 sont beaucoup plus inquiétants chez ces patientes. En effet, un niveau de plus de 65U/mL est indicateur de cancer ovarien chez 98% des ces femmes [100]. Même si ce marqueur n'est pas optimal pour le dépistage du cancer de l'ovaire, il est très utile pour surveiller et évaluer la réponse à la chimiothérapie, la rechute et la progression de la maladie chez les patientes atteintes d'EOC [101]. Malheureusement, chez les patientes qui semblent être en rémission complète, une augmentation de l'expression de CA125 précède souvent une rechute au bout de trois mois environ. Également, une expression persistante post-chirurgie indique dans 95% des cas la présence continue de la maladie [102]. Là encore, le CA125 n'est pas un marqueur infallible. Dans environ 20% des cas de cancers ovariens, il n'y a pas de surexpression de CA125. Finalement, dans la majorité des cas de cancers ovariens, la chirurgie et les traitements ne sont pas curatifs, alors la détection plus ou moins précoce de rechute n'a pas d'impact réel sur la survie des patientes [103]. Le CA125, à cause de son manque de sensibilité et de spécificité, n'est pas un bon outil diagnostique à lui seul et donc les chercheurs se tournent de plus en plus vers

une combinaison de marqueurs afin d'améliorer la détection précoce des cancers ovarien et, par effet même, la survie des patientes.

Lorsque la présence d'une tumeur est suspectée chez une patiente qui présente les symptômes du cancer et qui a été évaluée par l'examen physique, la mesure d'expression du CA125 et par imagerie, elle subit généralement une chirurgie cytoréductive. C'est à ce moment qu'on obtient le diagnostic le plus précis. En effet, lors de l'opération, des échantillons de la tumeur sont immédiatement envoyés à un pathologiste qui détermine alors le grade et le type de cancer présent. Selon le résultat, la chirurgie peut varier de simplement cytoréductive où on enlève le plus possible la tumeur visible en préservant les organes et tissus à proximité, ou encore plus invasive où l'exérèse de plusieurs organes (ovaire, trompe de Fallope et utérus) est effectuée.

Chapitre 2.4.2 Traitement

Les traitements prescrits à une patiente vont dépendre principalement de trois facteurs généraux. Tout d'abord, de la santé générale de la patiente, ensuite du type de cancer ovarien diagnostiqué et finalement du stade et du grade de la tumeur. Une chirurgie cytoréductive optimale effectuée par un/une chirurgien(ne) oncologue est souvent à l'origine des meilleurs résultats suivant les traitements prescrits ultérieurement à la patiente.

L'exérèse du ou des ovaires atteints par des tumeurs BOV peut être effectuée par laparoscopie dans les cas où la taille de ces tumeurs est inférieure à 10 cm. Ce type de chirurgie implique l'insertion par de petites incisions d'un laparoscope (instrument de visualisation), de pinces et de ciseaux. Cette procédure est moins invasive et inconfortable pour la patiente comparée à une laparotomie qui est une incision dans l'abdomen permettant l'accès aux organes abdominaux et pelviens. La tumeur BOV est ensachée afin d'éviter la dissémination de cellules et extirpée de la cavité abdominale.

Aux stades précoces de la maladie, soit les stades Ia et Ib où les cellules tumorales sont encore bien différenciées et bien encapsulées, la chirurgie seule est souvent suffisante pour être curative. Ainsi, selon l'âge de la patiente, la chirurgie implique la plupart du temps une hystérectomie abdominale complète, omentectomie et des biopsies pelviennes.

Cependant, chez des patientes plus jeunes qui désirent préserver leur fertilité et dont la tumeur est localisée à un seul ovaire avec une histologie encourageante, la chirurgie peut être plutôt conservatrice et il y a exérèse d'un seul des ovaires ainsi que de la trompe de Fallope. Il faut souligner que les risques de récurrences sont alors plus importants. Dans le cas où les lésions tumorales à ces stades précoces ne sont pas bien différenciées en plus d'être densément adhérentes et présentent une histologie à cellules claires, la chimiothérapie est recommandée en plus de la chirurgie [23, 46, 104].

Finalement les patientes qui ont un diagnostic de tumeurs invasives vont subir une laparotomie incluant une hystérectomie abdominale totale, une salping-ovariectomie bilatérale (exérèse des deux ovaires et des trompes de Fallope), omentectomie et la stadification totale. Dans le but d'effectuer une cytoréduction optimale de tous les sites tumoraux, le chirurgien effectue parfois la résection de plusieurs autres portions d'organes comme par exemple les intestins ou le péritoine. La chirurgie est normalement suivie d'une chimiothérapie qui est composée d'un traitement de carboplatin et paclitaxel pendant six cycles. Si la chirurgie cytoréductive primaire n'est pas optimale, alors une deuxième chirurgie peut être considérée (après trois cycles de chimiothérapie) lorsque la patiente répond bien aux traitements de chimiothérapie [46, 105].

Suite aux traitements, les patientes sont suivies à intervalles de trois mois pour les deux premières années, ensuite au quatre mois durant la troisième année et à tous les six mois pour la quatrième et cinquième année. Le suivi inclut un examen médical (incluant un examen pelvien) et la mesure du niveau de CA125. Lorsqu'une masse est détectée ou encore que le niveau de CA125 augmente, une analyse par imagerie (CT scan ou encore PET scan) est recommandée.

Selon la durée de l'intervalle libre de progression, différentes options de traitement secondaire peuvent être proposées. Ainsi, pour les patientes dont la récurrence a lieu plus d'un an après la chirurgie, une exérèse de la tumeur récurrente peut être proposée. Lorsque la tumeur est détectée de nouveau plus de six mois après la chimiothérapie initiale, une seconde ligne de traitement est utilisée par chimiothérapie de combinaison basée à base de sels de platine (carboplatine/paclitaxel ou carboplatine/gemcitabine). Malheureusement,

pour les patientes dont l'intervalle libre de progression est très court (moins de 6 mois), une chimiothérapie palliative doit être envisagée (doxorubicin, gemcitabine ou topotecan) [46, 104].

Malgré de nombreux progrès dans les connaissances reliées à l'étiologie du cancer de l'ovaire ainsi qu'une chirurgie cytoréductive agressive et de nouvelles combinaisons de chimiothérapie, le taux de mortalité relié au cancer de l'ovaire n'a pas changé depuis les 30 dernières années et approximativement 60% des femmes qui développent ce cancer vont mourir de la maladie. Il est important de souligner cependant, que malgré un taux inchangé au niveau de la mortalité, l'intervalle entre le moment du diagnostique et le décès est plus long. De nombreux facteurs font en sorte que le cancer de l'ovaire est une maladie très complexe. Les cellules tumorales, leurs anomalies, mutations, les tissus stromaux, la néovascularisation ou l'angiogenèse, les réponses inflammatoires et toutes les réponses de l'hôte à la tumeur font tous en sorte que très rapidement on comprend que l'étude de la tumorigenèse directement chez l'humain devient à la limite impossible en plus soulever des questions d'ordre éthique.

Chapitre 2.5 Les modèles d'étude du cancer de l'ovaire

La science expérimentale progresse en contrôlant une variable à la fois et en observant les effets générés par la modulation de cette variable. Les modèles expérimentaux sont donc d'une importance cruciale afin de comprendre les facteurs biologiques et génétiques qui jouent des rôles fondamentaux dans la maladie du cancer de l'ovaire. Le but ultime de la recherche fondamentale est la capacité d'extrapoler nos résultats vers les cancers chez l'humain dans le but de développer des meilleurs moyens de dépistages, des nouvelles stratégies thérapeutiques et ultimement améliorer le diagnostique des patientes afin de changer la finalité de la maladie du décès vers la guérison. L'utilisation de modèles expérimentaux est inévitable en recherche. Cependant, un mauvais choix du modèle pour l'étude d'un problème donné peut compromettre un programme de recherche des plus inspiré et méticuleux. L'inconvénient majeur des modèles

expérimentaux demeure le fait que de par leur nature, ce ne sont que des représentations imparfaites de la maladie et de sa dynamique *in vivo* chez l'hôte.

Différents types de modèles ont été développés au fil des ans afin de faciliter ou rendre plus accessibles les études sur le cancer. Tous ces modèles ont des avantages et des désavantages qui doivent être pris en considération lors de leur choix pour des études subséquentes.

Chapitre 2.5.1 Les tissus tumoraux

Les tissus tumoraux provenant de la patiente atteinte d'EOC sont sans doute le modèle le plus représentatif de la maladie humaine *in vivo* au moment où l'échantillon est prélevé. Cependant, la difficulté d'étudier ce modèle réside principalement dans le fait qu'il est difficilement accessible et peu reproductible d'une expérience à l'autre. De plus, les tissus tumoraux sont composés de populations de cellules très hétérogènes avec des sous-populations de cellules variables [106, 107]. Ce désavantage peut cependant être vu également comme un avantage. En effet, l'hétérogénéité présente dans les tissus reflète la complexité du microenvironnement tumoral qui peut moduler la croissance ainsi que les interactions cellulaires. Une autre difficulté qui peut être rencontrée lors de l'étude de ce modèle est le fait que les populations cellulaires d'intérêt peuvent être minoritaires dans certains types de cancer limitant ainsi l'accès aux cellules étudiées. La microdissection au laser est une technologie relativement récente qui nous permet d'isoler des populations homogènes de cellules à l'intérieur même de l'environnement tissulaire où elles se trouvent et ainsi surmonter le problème de l'hétérogénéité cellulaire [108]. Cette technologie rend également possible la séparation et l'analyse des différentes sous-populations de cellules à l'intérieur d'une néoplasie et d'identifier des propriétés ou caractéristiques qui leur sont propres. Ces études élégantes peuvent fournir des informations cruciales sur la biologie tumorale [106]. Le principal défaut de cette technologie, en plus des coûts élevés pour la mise en place et l'utilisation du système, est le fait que les échantillons obtenus sont souvent de très petite taille. Les études subséquentes demandent donc une amplification, ce

qui peut introduire un certain biais. L'interprétation des études des tissus tumoraux entiers peut également être compromise par la présence importante de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes.

Les tissus tumoraux sont par contre d'une importance cruciale pour la dérivation des lignées cellulaires, un modèle beaucoup plus accessible et maniable pour la recherche. Finalement, nous ne pouvons nier l'importance des tissus tumoraux (et normaux) dans les études d'immunohistochimie. En effet, la pertinence et la validité de plusieurs facteurs découverts *in vitro* par l'utilisation des modèles de cultures cellulaires peuvent être vérifiées au niveau des tissus avant de procéder aux études plus poussées. Ceci est surtout mis en valeur par l'utilisation des micro-étalages de tissus (TMA) qui nous permettent d'étudier des dizaines (voir des centaines) de patientes en une seule expérience.

Les TMA sont des blocs de paraffine qui peuvent contenir jusqu'à 1000 échantillons de tissus (Figure 11, page 41) [109, 110]. La méthode pour générer des TMA consiste à prélever une carotte de tissu provenant des blocs de paraffine contenant des tumeurs ou encore des biopsies à l'aide d'une aiguille creuse. Ces échantillons sont ensuite insérés dans un bloc de paraffine qu'on appelle receveur et ce, de façon ordonnée, afin de maximiser le nombre d'échantillons présents [109]. Cette méthode a l'avantage de nous permettre d'étudier plusieurs échantillons à la fois, ce qui représente une importante économie de temps et de réactifs. Cette méthode peut également être appliquée à des lignées cellulaires ou des échantillons de cellules qu'on retrouve en petite quantité.

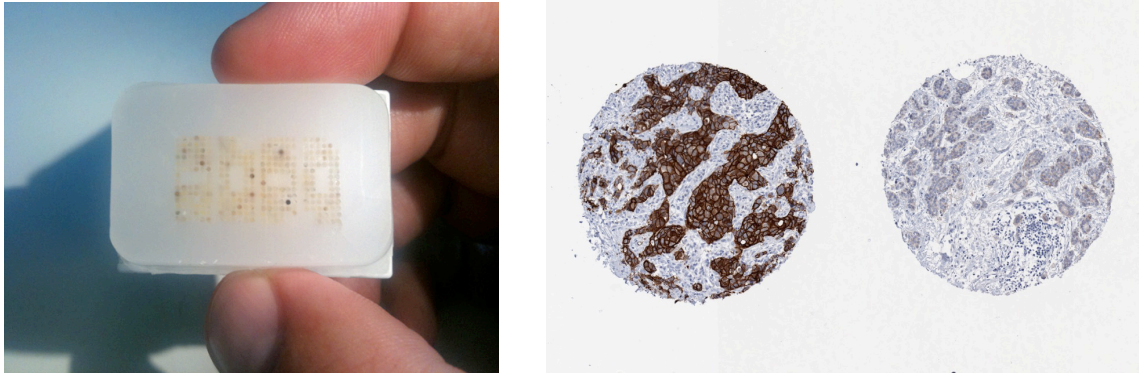


Figure 11. Un exemple de micro-étalage de tissus (TMA).

L'image de gauche représente un TMA entier. Il est composé de dizaines d'échantillons insérés dans un bloc de paraffine. L'image de droite montre un agrandissement des échantillons individuels inclus dans le TMA tels que vus au microscope.

Chapitre 2.5.2 Le modèle animal

Les difficultés au niveau de l'accessibilité des tumeurs et des échantillons de tumeurs ainsi que la diversité génétique font en sorte qu'il est très difficile d'étudier la tumorigenèse chez l'humain. Les systèmes expérimentaux *in vitro*, même si essentiels, ne peuvent remplacer ou reproduire exactement les conditions *in vivo* des tumeurs d'où l'importance des modèles expérimentaux animaux. L'importance de l'utilisation des animaux en recherche expérimentale, même si controversée, a été reconnue depuis très longtemps. L'objectif principal de l'utilisation des modèles animaux est de déterminer, projeter ou essayer de prévoir l'impact d'un traitement chez l'humain. L'un des modèles les plus utilisés en recherche sur le cancer est la souris.

'Of all the laboratory mammals, probably none has contributed more to the advancement of knowledge than the common mouse'

George D.Snell [111]

Toutes les puissantes techniques de manipulation génétique au niveau de la souris que l'on connaît aujourd'hui pourraient nous faire croire que cette phrase fut prononcée par Snell à peine hier. C'était déjà en 1941, seulement 34 ans après que Clarence Cook Little ne commence ses études sur l'héritage de la couleur de la fourrure que Snell reconnut l'importance de ce petit animal dans les études scientifiques. Clarence Cook Little fut d'ailleurs le premier à avoir développé une lignée de souris génétiquement homogènes (soit la DBA) et elle est encore utilisée aujourd'hui [112]. Depuis l'avènement de transgénèse et du ciblage génétique pour créer de nouvelles lignées de souris susceptibles de développer différents cancers, l'utilisation des souris au niveau de la recherche sur le cancer a augmenté significativement. C'est à l'aide de ces nouvelles lignées de souris que nous avons pu mieux comprendre les gènes impliqués dans la tumorigenèse humaine, la progression histopathologique des cancers ainsi que les voies de signalisation impliquées. De plus en plus, nous sommes conscients que le cancer n'est pas une maladie de quelques cellules génétiquement dérégulées mais plutôt une maladie de l'organisme. Des interactions complexes entre la tumeur et l'hôte font en sorte que certains aspects de la maladie du cancer ne peuvent être étudiés que dans le contexte d'un organisme entier où les néoplasies se développent dans un microenvironnement particulier. Ainsi, l'avancement de la recherche tant fondamentale que clinique s'appuie énormément sur l'utilisation des modèles animaux et en particulier des souris transgéniques.

Il existe quelques modèles animaux qui peuvent développer des cancers ovariens spontanément ou encore suite à une induction par différents facteurs. Les modèles animaux ainsi générés nous ont permis d'étudier différents gènes et voies moléculaires impliqués dans le développement et la croissance de ces cancers [113, 114]. Cependant, afin d'identifier des outils indispensables pour un diagnostic précoce qui est associé à une survie très élevée chez les patientes atteintes, nous avons besoin d'un modèle qui nous permettrait d'étudier les événements précoces et donc l'initiation des EOC.

Le modèle animal n'est pas sans défauts et même si nous avons plusieurs similitudes, les différences entre les espèces peuvent jouer un rôle important au niveau de

l'étude des maladies humaines. La souris diffère de l'homme au niveau du développement et si on regarde seulement au niveau de la taille, chez la souris il y a considérablement moins de tissus cibles pour les transformations oncogéniques. Il ne faut pas également oublier que la physiologie de la souris est différente de celle de l'humain. Au niveau de l'ovaire par exemple, on peut observer une membrane autour des ovaires (bourse ovarienne) qu'on ne retrouve pas chez la femme. De plus, chez l'humain une maladie comme le cancer peut être latente pendant des dizaines d'année. Chez la souris par contre, la longévité étant plus courte elle peut affecter l'apparition et la progression de la tumeur de façon différente [2]. Toutes ces différences entre espèces font en sorte que l'efficacité d'un traitement compétent chez la souris n'est pas toujours reproductible chez l'humain [115]. Le développement d'un modèle complexe comme la souris exige un important investissement de temps et de moyens ce qui engendre le débat autour de l'utilité de ce modèle dans le développement et la vérification de l'efficacité des traitements destinés aux humains.

Il est important de souligner que même si la souris est le modèle animal le plus souvent utilisé, d'autres animaux ont déjà été envisagés pour l'étude du cancer des ovaires. Ainsi, à cause de la haute fréquence de l'ovulation due à la pondaison, les poules démontrent le développement sporadique de tumeurs ovariennes [54]. Des rats de souche Wistar et Sprague-Dawley ont également la capacité de développer spontanément des tumeurs aux ovaires [116, 117]. Ces modèles restent cependant peu pratiques puisque l'apparition des tumeurs est très sporadique et le temps de développement est très long.

Chapitre 2.5.3 Les xénogreffes

Les xénogreffes représentent une façon alternative d'utiliser les modèles animaux sans pour autant effectuer des changements génétiques au niveau de leurs génomes. La xénogreffe par définition est une greffe de tissu ou de cellules entre différentes espèces. Dans le cas des modèles du cancer, on utilise le plus souvent des souris immunodéficientes (NU athymiques ou SCID avec immunodéficiência combinée sévère) dans lesquelles on

injecte des cellules tumorales provenant directement des tissus tumoraux (comme par exemple des biopsies) ou encore à partir des cultures cellulaires [118]. Rygaard et Povlsen furent les premiers à rapporter des résultats de croissance tumorale dans une souris NU immunodéficiente [119]. Depuis cette découverte, on a effectué des xénogreffes de tous les types majeurs de tumeurs humaines dans les souris NU ou SCID et ceci est principalement dû au fait que ce type de modèle est très souvent utilisé au niveau du développement préclinique de nouvelles drogues anticancéreuses [118]. Le principal avantage de ce modèle est le fait qu'on étudie la croissance tumorale dans le contexte d'un organisme entier. Cependant, plusieurs variables peuvent avoir un impact plus ou moins important sur les résultats finaux. Parmi les facteurs qui peuvent influencer la transposition efficace des traitements à l'étude de la souris vers l'humain on retrouve 1) le site de l'implantation, 2) les caractéristiques de croissance de la xénogreffe et sa taille lorsque le traitement est appliqué et 3) les modalités de l'administration de l'agent étudié [120]. Des études effectuées par Fidler *et al.* ont également démontré que la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion, la survie cellulaire ainsi que la réponse cellulaire à la chimiothérapie sont tous des facteurs qui peuvent être affectés par le microenvironnement d'un organe [121-123]. Il faut également souligner que certaines études ne peuvent être effectuées dans ce modèle comme les études sur les métastases ou encore des études sur l'angiogenèse. En effet, la vascularisation dans le modèle xénogreffe est différente de celle chez l'humain puisqu'elle est d'origine murine et les xénogreffes sous-cutanées métastasent rarement [118]. De plus, de nombreuses études ont démontré l'implication du système immunitaire dans différents aspects impliquant le développement et la croissance tumorale. Par exemple, il a été démontré que les tumeurs formées en absence d'un système immunitaire intact sont plus immunogéniques que celles formées à l'intérieur d'un hôte immunocompétent [124]. Nous savons que le système immunitaire peut autant jouer un rôle protecteur contre les cancers qu'il peut dans certains cas favoriser la croissance tumorale. Ainsi, ces faits doivent être pris en considération lors des études faisant appel à l'utilisation des souris immunodéficientes. De plus, même si le modèle xénogreffe peut être une source renouvelable et relativement facilement accessible de cellules tumorales humaines, il ne

faut pas oublier que le développement de ce modèle peut également demander un investissement important au niveau du temps et des ressources. Finalement, l'utilisation de n'importe quel type de modèle animal pose toujours des considérations d'ordre éthique importantes à évaluer.

Chapitre 2.5.4 Les modèles *in vitro*

En plus des modèles *in vivo*, différents modèles *in vitro* représentent une alternative plus accessible et moins complexe. Développés et caractérisés au cours du dernier siècle, les modèles *in vitro* restent peu nombreux. Parmi ces modèles on retrouve les cultures primaires, les lignées cellulaires et enfin les cultures tridimensionnelles.

Chapitre 2.5.4.1 Les cultures primaires

Les cultures primaires consistent à dériver des cellules capables de croître *in vitro*, dans un milieu propice à leur croissance, à partir des tumeurs prélevées suite à une chirurgie, à partir de biopsie ou encore à partir des cellules contenues dans un ascite. Le plus important des avantages des cultures primaires est le fait qu'elles représentent le matériel de départ, en l'occurrence le tissu ovarien normal, bénin ou encore malin, ce qui rend ce modèle *in vitro* physiologiquement pertinent [125]. De plus, par rapport aux modèles *in vivo*, les cultures primaires constituent un système beaucoup plus accessible. Les cultures primaires ne sont cependant pas un modèle sans défauts. En effet, ce type de cellules ne sont pas immortelles et suivant un certain nombre de passages les cellules vont mourir, limitant ainsi la quantité et le temps disponibles pour effectuer les expériences nécessaires. De plus, lors de la mise en culture il peut y avoir contamination des cellules tumorales par d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes. La méthode de mise en culture peut également mener vers une sélection de sous-population de cellules plus tolérantes aux nouvelles conditions de croissance ce qui risquerait de biaiser les résultats par une mauvaise ou différente représentation de la maladie d'origine.

Chapitre 2.5.4.2 Les lignées cellulaires

Les cellules des cultures primaires peuvent occasionnellement devenir spontanément immortalisées et générer ainsi des cellules qui peuvent croître indéfiniment qu'on appelle des lignées cellulaires. Les lignées cellulaires peuvent également être dérivées suite à une immortalisation induite. Cette croissance illimitée par le nombre de passages représente un énorme avantage quant à l'accessibilité au matériel pour différentes études. De plus, ce modèle est caractérisé par une relative facilité de manipulation, ce qui est un atout important. Une fois la lignée cellulaire établie, ce modèle est alors caractérisé pas une sélection vers une population de cellules homogène. Cette absence d'hétérogénéité peut représenter une barrière dans l'analyse moléculaire du tissu normal et tumoral [106]. En effet, certaines propriétés des cellules *in vivo* peuvent être perdues *in vitro* lorsque les cellules sont séparées des éléments de tissu qui contrôlent l'expression génique telles que les facteurs solubles, la matrice extracellulaire et les interactions cellule-cellule. Alors, un des désavantages de la culture cellulaire est le fait que certains événements moléculaires qui ont lieu dans le tissu d'origine peuvent ne pas être adéquatement représentés dans ce modèle. Cependant, nous ne pouvons nier l'importance et la contribution majeures de ce modèle dans les recherches sur le cancer. La facilité de manipulation et l'accessibilité de ce modèle font en sorte qu'il continuera d'occuper une place d'importance dans les études du cancer. En effet, depuis la découverte dans les années 1950 du fait que certaines cellules tumorales humaines peuvent se propager indéfiniment en culture en présence des nutriments et des facteurs de croissances appropriés, de nombreux groupes ont réussi à dériver et caractériser différentes lignées d'un grand nombre de cancers dont le cancer épithélial de l'ovaire.

Lignée cellulaire	Origine	Groupe
OC314	Ascite d'adénocarcinome séreux	Alama <i>et al.</i>
OC315	Ascite d'adénocarcinome séreux	Alama <i>et al.</i>
OC316	Ascite d'adénocarcinome séreux	Alama <i>et al.</i>
A2780	Séreux papillaire	Buller <i>et al.</i>
UWOV2	Cystadénocarcinome	Colombick <i>et al.</i>
HOC-7	Adénocarcinome	Grunt <i>et al.</i>
OVCAR-3	Ascite d'adénocarcinome	Hamilton <i>et al.</i>
OCC1	Ascite de carcinome à cellules claires	Wong <i>et al.</i>
OMC-3	Cystadénocarcinome mucineux	Yamada <i>et al.</i>
PEO1,4,6,16	Ascite d'adénocarcinome	Langton <i>et al.</i>
PEA1,2	Adénocarcinome séreux	Langton <i>et al.</i>
MAC-2	Cancer épithélial de l'ovaire	Hirte <i>et al.</i>
RIC-2	Cancer épithélial de l'ovaire	Hirte <i>et al.</i>
SCHM-1	Cancer épithélial de l'ovaire	Hirte <i>et al.</i>
SIB-1	Cancer épithélial de l'ovaire	Hirte <i>et al.</i>
TAC3	Cancer épithélial de l'ovaire	Nishikawa <i>et al.</i>
OV-MZ-6	Cystadénocarcinome	Mobus <i>et al.</i>

Table II. Tableau représentant quelques unes des lignées cellulaires dérivées du cancer épithélial de l'ovaire [126-136].

Comme les cellules sont différentes selon le type de cancer dont elles proviennent et que leur comportement *in vitro* est souvent parallèle à celui observé *in vivo* [137], il est d'une importance cruciale de connaître la provenance et les traitements qu'a pu subir la patiente dont provient le tissu à l'origine de la lignée. Cependant, ces informations ne sont pas toujours disponibles, ce qui peut compromettre ou influencer l'interprétation des résultats d'études de la tumorigenèse. Les traitements que subissent les patientes peuvent par exemple introduire des événements géniques qui peuvent influencer les cellules en culture et biaiser ou modifier les analyses des études de profils d'expression géniques. En effet, très peu de lignées cellulaires (surtout du type séreux) ont été dérivées de patientes n'ayant reçu aucun traitements préalables de chimiothérapie. Finalement, les tumeurs solides *in vivo* sont d'une énorme complexité qui peut être difficilement reproductible dans les modèles *in vitro* courants.

Chapitre 2.4.4.3 Les sphéroïdes

Une caractéristique des tumeurs est le fait qu'elles sont tridimensionnelles. Cette structure fait en sorte que la dynamique des interactions des cellules tumorales avec leur environnement est très différente de celle qu'on retrouve dans les cultures des lignées cellulaires en monocouche. Cette caractéristique est surtout importante lors de l'étude de différents traitements et le développement de nouvelles drogues ciblant les tumeurs. La culture tridimensionnelle des cellules tumorales *in vitro* permet de récapituler certains aspects histomorphologiques, fonctionnels et microenvironnementaux des tumeurs *in vivo*. Il y a déjà plus de 40 ans, dans les années 1970, Sutherland et ses associés ont appliqué ce concept afin d'étudier la réponse tumorale aux traitements [138]. Depuis ce temps, le savoir sur la biologie cellulaire des sphéroïdes ainsi que les mécanismes responsables de l'augmentation de leur résistance aux drogues a avancé considérablement [138-142].

La culture tridimensionnelle implique la formation d'agrégats sphériques de cellules. Les sphéroïdes sont des modèles de complexité intermédiaire entre les tumeurs *in vivo* et les cultures en monocouches *in vitro* [138, 140]. Les diverses caractéristiques tumorales comme par exemple la croissance, les métastases et la réponse aux différents biomodulateurs sont dictées par les propriétés collectives des populations de cellules tumorales plutôt que par les propriétés intrinsèques d'une cellule tumorale individuelle. Les interactions directes ou indirectes des cellules tumorales entre elles ou encore avec leur microenvironnement déterminent cet effet de « communauté multicellulaire ». Ainsi, ces interactions induisent des changements moléculaires au niveau de la cellule tumorale et peuvent affecter l'expression génique ainsi que le comportement biologique de cette cellule [143, 144].

Le modèle tridimensionnel de culture cellulaire permet également la récapitulation de différents gradients métaboliques et prolifératifs présents dans les tumeurs *in vivo*. En effet, le comportement et les caractéristiques des cellules en périphérie du sphéroïde diffèrent d'une façon plus ou moins importante des cellules à l'intérieur du sphéroïde selon la taille du sphéroïde. Le modèle sphéroïde peut être composé de populations hétérogènes concentriques de cellules en plus de reproduire des gradients pathophysiologiques et ainsi

reproduire un modèle comparable aux tumeurs avasculaires *in vivo*. De nombreuses études ont été effectuées sur les cultures tridimensionnelles soulignant leur pertinence en tant que modèle intermédiaire entre les cultures 2D et les tumeurs *in vivo* [139, 141, 142, 145-152]. Plusieurs méthodes ont été développées afin d'initier la culture des sphéroïdes à partir des lignées cellulaires dérivée de différentes tumeurs. Afin que les cellules puissent former des sphéroïdes *in vitro*, elle doivent se trouver dans des conditions où elle ne peuvent adhérer sur un substrat donné et donc les forces adhésives entre les cellules doivent être plus grandes que les forces adhésives entre ces cellules et le substrat sur lequel elles sont cultivées.

Une des façons les plus simples et le plus souvent utilisée jusqu'à tout récemment était la méthode de culture par recouvrement (« overlay culture »). Cette méthode consiste à faire pousser les cellules dans un milieu approprié sur un substrat non-adhérent comme par exemple l'agar, l'agarose ou les membranes Matrigel®. Les cellules restent en théorie en suspension et migrent l'une vers l'autre pour former spontanément des agrégats. Les divisions cellulaires subséquentes ont pour effet d'augmenter la taille de l'agrégat ou du sphéroïde [153]. Il faut cependant souligner que même si les cellules n'adhèrent pas directement au substrat, elle poussent néanmoins en contact avec celui-ci. Cette interaction indirecte peut quand même influencer le comportement cellulaire dans le modèle tridimensionnel.

Une autre approche à la culture tridimensionnelle est l'utilisation de systèmes giratoires. Cette méthode repose sur la théorie qui implique qu'un mouvement constant des cellules les empêcherait d'adhérer au substrat. Il y a différentes façons plus ou moins complexes qui ont été développées afin de garder les cellules en mouvement. Ainsi, les cellules peuvent être maintenues en suspension dans un erlenmeyer contenant un milieu approprié et placé dans un incubateur sur une plaque agitatrice. L'agitation constante permet aux cellules de s'agréger entre elles sans pour autant leur permettre d'entrer en contact avec un substrat. Le principal avantage de cette méthode est la possibilité de production d'un grand nombre de sphéroïdes à la fois [153].

Dans les années 1990, la NASA a développé un système alternatif beaucoup plus complexe (Rotary Cell Culture System) basé sur une rotation constante et contrôlée qui simulait la microgravité. Ce système fonctionne selon un principe où les cellules sont maintenues dans une suspension de fluide dynamique qui est agitée par des forces hydrodynamiques minimales. En fait, le tube dans lequel on place les cellules tourne en entier sur son axe horizontal et comme ce tube est rempli en entier de milieu, la turbulence du fluide ainsi que les forces qui pourraient déchirer les sphéroïdes sont réduites au minimum [154]. Un des avantages de ce système est le fait que les sphéroïdes obtenus dans ce type de culture sont de plus grande taille, permettant ainsi de reproduire plus fidèlement certains aspects des tumeurs avasculaires *in vivo*. Ces sphéroïdes semblent d'avantage différenciés morphologiquement et phénotypiquement que les sphéroïdes obtenus par la méthode précédente [153]. Évidemment, le coût d'un tel système devient une barrière importante lorsqu'on envisage la culture de sphéroïdes à grande échelle et très peu de laboratoires ont accès à ce type de technologie.

Des cultures tridimensionnelles *in vitro* peuvent également être développées à l'aide de systèmes de support ou d'échafaudages préfabriqués. Ce système repose sur l'utilisation des supports composés de molécules naturelles (telle que le collagène) ou de polymères synthétiques biodégradables ou non. Le principe de cette culture implique que les cellules s'attachent à ces structures et migrent le long des fibres qui les composent. S'ensuit la croissance cellulaire qui permet de remplir les espaces intersticiels afin de former des structures tridimensionnelles. Ces supports ont le potentiel de reproduire un environnement similaire au tissu vivant [155, 156]. En effet, la composition des supports aux cellules inclut des molécules qui font partie de la matrice extracellulaire. Ainsi, en plus de fournir un support qui simule un support naturel des cellules, ils peuvent également apporter des signaux importants au niveau des voies de signalisation impliquant la migration, la prolifération et la différenciation des cellules. Ce système est très exploité dans le domaine de l'ingénierie de différents tissus tels que les os, la peau ou encore des tissus cardiaques. Des problèmes liés aux coûts de ce système ainsi qu'à la difficulté d'appliquer ce système aux cultures à grande échelle, en plus des problèmes au niveau de la reproductibilité, font

en sorte que ce système est très peu utilisé en oncologie pour la culture des cellules tumorales.

La méthode la plus récemment développée en parallèle par notre laboratoire et le groupe de Lars K. Nielsen est la culture des cellules tumorales en gouttelettes suspendues [157]. Cette méthode, qui fait entre autre l'objet de ce travail, consiste à cultiver les cellules dans des gouttelettes inversées de milieux. Les cellules migrent par gravité vers l'apex de la goutte où sans aucun substrat elles peuvent former des sphéroïdes plus ou moins compacts. Cette méthode ainsi que la description des sphéroïdes et agrégats formés sera décrite plus en profondeur dans le chapitre quatre de cette thèse.

Au fur et à mesure que des nouvelles méthodes de cultures sont développées, le modèle sphéroïdes devient de plus en plus accessible, intéressant et surtout pertinent comme modèle *in vitro* de la maladie complexe *in vivo*. Ces nouvelles méthodes permettent d'intégrer le modèle sphéroïde dans les études à grande échelle et sont de plus en plus faciles à appliquer, peu coûteuses, reproductibles et surtout mènent à la génération de modèles de plus en plus représentatifs de la maladie *in vivo*.

Chapitre 3 Objectifs

Chapitre 3.1 Objectif primaire

L'objectif premier de mon étude était de développer un modèle tridimensionnel *in vitro* du cancer épithélial de l'ovaire en se basant sur l'hypothèse qu'un tel modèle se rapprochera des modèles *in vivo* comparativement à celui le plus communément utilisé des cellules tumorales en monocouche. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons dû développer une nouvelle méthode de culture des sphéroïdes *in vitro*. Ainsi, en utilisant trois lignées du cancer épithélial de l'ovaire alors disponibles au laboratoire (soit les OV90, TOV21G et TOV112D), nous avons établi des modèles tridimensionnels cultivés dans les gouttelettes suspendues.

Une fois ce modèle établi, nous avons comme objectif de le caractériser et de comparer les profils d'expression génique de ce nouveau modèle tridimensionnel *in vitro* au modèle monocouche ainsi qu'au de modèle xéno greffe *in vivo*. Cette étude a été conduite dans le but de déterminer si en effet, le nouveau modèle 3D se rapprochait du modèle *in vivo* d'avantage que le modèle de culture en monocouche. Dans cette optique, mon projet s'est divisé en deux sections, tout d'abord l'établissement du nouveau modèle tridimensionnel du cancer épithélial de l'ovaire et l'établissement du modèle xéno greffe *in vivo* du même type de cancer à partir des lignées cellulaires développées auparavant dans notre laboratoire. Ensuite, il s'agissait d'effectuer des études de comparaison des profils géniques entre ces différents modèles afin d'établir les similarités ou les différences entre eux tout en recherchant des gènes candidats spécifiques au nouveau modèle 3D qui pourraient éventuellement servir de cibles potentielles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour les analyses génomiques, nous nous sommes servi de la technologie des micropuces Affymetrix. Nous désirions ainsi trouver des gènes rapprochant le modèle 3D *in vitro* du modèle *in vivo* et que l'on ne pouvait pas identifier par l'étude du modèle monocouche. Parmi les meilleurs candidats, nous avons sélectionné *SI00A6* pour des études ultérieures.

Chapitre 3.2 Objectif secondaire

L'identification et la caractérisation du gène candidat *SI00A6* stratifiant les modèles de culture en monocouches versus les modèles tridimensionnels tant *in vitro* qu'*in vivo*, s'ajoutent à l'objectif précédent. La pertinence de ce gène au niveau du cancer épithélial de l'ovaire étant établie, nous avons voulu déterminer quel était l'impact possible de la modulation de l'expression de ce gène au niveau du modèle sphéroïde d'EOC. Notre objectif secondaire fût donc d'inhiber l'expression de *SI00A6* dans les modèles *in vitro* afin d'étudier l'implication possible de ce gène candidat dans la formation des sphéroïdes mais également d'extrapoler au niveau de la tumorigenèse ovarienne.

Chapitre 3.3 Objectif tertiaire

Toujours dans l'optique de développer un modèle le plus représentatif et pertinent à la maladie du cancer épithélial de l'ovaire, mon troisième objectif était de dériver et de caractériser de nouvelles lignées du cancer épithélial de l'ovaire. En effet, très peu de lignées cellulaires provenant du type séreux d'EOC ont été développées jusqu'à présent et la majorité des lignées d'EOC préalablement établies proviennent des ascites plutôt que des tumeurs solides. De plus, aucune de ces lignées ne proviennent de patientes n'ayant subi aucun traitement de chimiothérapie. Notre dernier objectif fut donc axé sur le développement de nouvelles lignées d'EOC représentant le type de cancer le plus communément diagnostiqué, soit le type séreux. Afin de rendre ces lignées utiles aux expériences ultérieures, nous voulions également procéder à une caractérisation approfondie de ces modèles.

Chapter 4. Molecular description of a 3-D *in vitro* model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC).

Magdalena Zietarska¹, Christine M. Maugard^{1,2,3}, Abdelali Filali-Mouhim¹, Mona Alam-Fahmy¹, Patricia N. Tonin^{4,5}, Diane M. Provencher^{3,6}, Anne-Marie Mes-Masson^{1,2}.

¹Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) / Institut du cancer de Montréal, Québec, Canada; ²Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ³Service de médecine génique, CHUM, ⁴Departments of Human Genetics and Medicine, McGill University; Montréal, Québec, Canada; ⁵Research Institute of McGill University Health Centre; Montréal, Québec, Canada; ⁶Division of Gynecologic Oncology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Keywords: ovarian cancer cell lines, spheroid cultures, expression microarray, tissue array

Article publié dans : Mol Carcinog. 2007 Oct;46(10):872-85.

Contribution des auteurs :

L'élaboration du projet, la majorité des travaux présentés dans cet article et la rédaction ont été réalisées par le premier auteur. Tous les auteurs ont contribué au manuscrit. Abdelali Filali-Mouhim a effectué certaines analyses des profils géniques. Alam-Fahmy M a participé à l'analyse des micro-étalages de tissus. Maugard CM a participé à l'élaboration du projet. Tonin PN, Provencher DM et Mes-Masson AM ont participé à l'écriture du manuscrit à son approbation finale.

Chapter 4.1 Abstract

Epithelial ovarian cancer (EOC) cell lines are useful tools for the molecular and biological characterization of ovarian cancer. The use of an *in vitro* multidimensional (3-D) culture model recapitulates some of the growth conditions encountered by tumor cells *in vivo*. Here we describe a molecular comparison of spheroid based 3-D EOC models versus monolayer cultures and xenografts using cell lines from malignant ovarian tumors (TOV-21G and TOV-112D) and ascites (OV-90) previously established and characterized in our laboratory. Gene expression analyses of the three models were performed using the Affymetrix HG-U133A high density DNA array. Cluster analysis identified a set of genes that stratified expression profiles from the EOC cell lines grown as spheroids and xenografts from that of monolayer cultures. The gene expression analysis results were validated by Q-PCR analyses on an independent set of RNAs. Differential expression observed for the S100A6 gene between the monolayer, spheroid cultures and xenografts was confirmed at the protein level by immunohistochemistry. The analysis was extended to various ovarian tumor tissues using an EOC tissue array. This result represents an example of a gene that, if studied *in vitro*, is more representative of the *in vivo* disease in a 3-D model rather than the monolayer culture. Identification of genes in spheroid models that mimic the *in vivo* tumor gene expression patterns may allow a better understanding of the community effect observed in human disease that is determined by direct or indirect interactions of cells with their environment or other surrounding cells.

Chapter 4. 2 Introduction

Ovarian cancer is the fifth cause of cancer related death in women and the most lethal of all gynecological cancers. The most common form of cancer of the ovary is the epithelial ovarian cancer (EOC) (reviewed in [1]). EOCs originate from either the normal ovarian surface epithelium (NOSE) itself or from the crypts or inclusion cysts arising from

this surface epithelium [2]. Moreover, in one third of late stage cases there is formation of ascites, a voluminous inflammatory liquid composed of a cellular (mostly neoplastic epithelial cells) and an acellular fraction [3,4].

The study of EOCs has been facilitated by the establishment of spontaneously immortalized cell lines that have the advantage of reproducibility and permit long-term experimentation. The validity of using cell lines as models is substantiated by evidence indicating that they maintain expression patterns related to the tissue of origin [5]. In our laboratory, we have derived long-term EOC cell lines from primary ovarian malignant tumors such as TOV-21G and TOV-112D and from an ovarian malignant ascites such as OV-90 [6]. Importantly, these cell lines were derived from chemotherapy naive patients. The cell lines have been extensively characterized by morphological, immunohistochemical, cytogenetic and molecular analyses [5-9] as well as for their response to chemotherapeutic agents [10]. Taken together these cell lines cover gene mutations implicated in ovarian cancer progression such as TP53, CDKN2A, KRAS and TGFBR2 [6,11]. Notably, these cell lines display growth characteristics *in vitro* that mimic their clinical behavior.

In vivo, tumor cells in the original tissue are influenced by different elements that control gene expression such as soluble factors, extracellular matrix and complex cell-cell interactions. Cultured cells can lose some of their inherent *in vivo* properties when separated from these elements [12]. Three-dimensional cultures consist of cells aggregated in spheroids that have an intermediate complexity between *in vivo* tumors and *in vitro* monolayers [13]. It has been demonstrated previously that spheroids represent a more adequate model to study some aspects of tumor biology than monolayer cultures. Previous spheroid studies have highlighted the importance of cell-cell interactions in tumor biology as several tumor characteristics such as growth, metastasis and resistance to anti-tumor agents are dictated by the collective properties of a cell population rather than those of a single cell [14,15]. Different molecular changes can be induced by these interactions at the cell level and can affect gene expression and biological behavior of the cells [16,17].

Spheroids, by recapitulating some of the morphological and functional features of the original tissue, have been used in studies involving drug penetration [18-20], therapeutic macromolecules [21], multicellular drug resistance [22-24], cell-cell interactions [25-27], angiogenesis [28-31] and many other aspects of tumor biology [32,33].

The aims of this study were to develop an *in vitro* spheroid model system for EOC, based on the cell lines we previously described [6], and to compare gene expression profiles of this model to monolayer and xenograft models in order to identify a gene expression profile common to 3-D models both *in vivo* (xenograft) and *in vitro* (spheroid). Until recently, the generation of spheroids involved complex processes frequently requiring overlay cultures, matrix scaffolds and/or spinner flasks [34]. We have adapted the hanging droplets culture method used for stem cells [35,36] to generate EOC spheroids from our EOC cell lines [6] and subsequently compared this novel three-dimensional EOC model with existing *in vitro* monolayers and *in vivo* xenografts models.

Chapter 4.3 Materials and methods

Chapter 4.3.1 Cell cultures

Cell lines (TOV-112D, TOV-21G and OV-90) were cultured in OSE medium (50:50 mix of 199 and 105 Sigma mediums) supplemented with 2.5 µg/ml of fungizone, 50 µg/ml of gentamycin and 10% of FBS (fetal bovine serum). Cells were maintained in an incubator humidified at 37°C with an atmosphere containing 5% of CO₂ essentially as described [6].

Chapter 4.3.2 Growth of spheroid

Spheroids were generated from each EOC cell line in hanging droplets as previously described [35] with minor modifications of stem cell conditions related to the plastic used and number of cells seeded. To establish spheroids, 4×10^3 cells were suspended in 15 µl of

OSE medium (supplemented with 2.5 µg/ml of fungizone, 50 µg/ml of gentamycin and 10% of FBS) were transferred onto the inner surface of a 150 mm petri dish cover. To ensure the integrity and prevent coalescence of droplets, between 100-120 droplets were placed per dish cover. The cover was then placed on a dish containing 15 ml of PBS to prevent dehydration of the droplets. Once formed (usually at day four of culture), the spheroids were harvested by washing the petri dish cover with PBS and collected by centrifugation (2500g for 5 min).

Chapter 4.3.3 Xenografts

Cells (3×10^6) from each of the EOC cell lines were suspended in a volume of 0.3 ml of PBS and injected intraperitoneally (n=6) or subcutaneously (n=6) into 7-8 weeks old female Nude mice Cd-1® BR homozygotes (from Charles River Wilmington, MA). Control mice were injected with PBS. Animals were observed twice weekly for tumor growth. Mice were sacrificed once tumor size reached one cm³ or when there was obvious ascites formation (for intraperitoneally injected mice). A portion of the xenograft was placed in a solution of RNAlater® (Ambion, Austin, TX) as soon as possible after surgical removal, in order to preserve the RNA for further experiments, and the remainder of that xenograft was used to establish derivative cell lines.

Chapter 4.3.4 Tumorigenicity assay

For the tumorigenicity assay, female SCID mice were injected with 3×10^6 cells suspended in 0.3 ml of PBS at subcutaneous or intraperitoneal sites from monolayers of OV-90 cells or from day four OV-90 spheroids (either with or without previous trypsinization). The number of spheroids to inject per animal was calculated based on the cell count derived from trypsinized spheroids that were prepared in parallel. Spheroids were trypsinized using the 0.05% Multicell Trypsin/EDTA (Wisent Inc., Quebec, Ca). Cells were incubated for approximately 10 minutes in trypsin and then pipetted to ensure maximal separation of the aggregates. A 21G size needle was used to ensure transfer of

intact spheroids during injections and this was monitored visually. For each model six mice were used. Mice were sacrificed when tumor size reached at least one cm³. Control mice were injected with PBS.

Chapter 4.3.5 RNA preparation

RNA was prepared using the TRIzol™ reagent (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) with cells grown at 80% of confluence for monolayer cultures and at day four of cell culture in hanging droplets for the spheroid models. Xenografts tissues were placed in RNAlater® (Ambion, Austin, TX). Purity and integrity of RNA was verified by Agilent Bioanalyzer RNA gel (Agilent 2100 Bioanalyzer from Agilent Technologies Canada Inc, Mississauga, Ontario).

Chapter 4.3.6 Gene expression microarray experiments

Twenty micrograms of RNA were used for labeling and hybridization for expression microarray experiments performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (genomequebec.mcgill.ca). Protocols are available on the Affymetrix website. Microarray experiments were performed using HG-U133A GeneChip® arrays, in triplicate for monolayer cultures and in duplicate for the spheroid and xenograft models. This microarray contains 22,000 probe sets representing about 18,400 transcripts, which includes at least 14,500 genes. Spearman's two-tailed analysis was performed to correlate gene expression values using the SPSS software version 11 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Gene expression profiles were also analyzed using Bioconductor, an open-source software library for the analyses of genomic data [37] which is based on R programming language (www.r-project.org). Background subtraction, normalization and expression value calculations were performed using the justGCrma function available as part of Bioconductor's gcrma package. justGCrma converts raw probe intensity levels, derived from Affymetrix CEL files, into normalized (by quantile normalization) expression values using the robust multi-array average (RMA) [38]

expression measure combined with probe sequence information. Bioconductor's *genefilter* package was used to filter out genes with insufficient variation in expression across all samples tested. Expression values retained after this filtering process presented intensities greater than 200 units in at least two sample and a log base 2 scale of at least 0.5 for the interquartile range (IQR) across all tested samples. Clustering analysis was performed using R's *Cluster* package taking Pearson correlation distance and the average linkage method. Differentially expressed genes were identified using the *limma* package, which estimates the fold change between predefined groups by fitting a linear model and using empirical Bayes method to moderate standard errors of the estimated log-fold changes for expression values from each probe set. This approach takes into consideration the small sample size of the comparative groups used in this study. The p value from the resulting comparison was adjusted for multiple testing according to the method of Benjamini and Hochberg [39] which controls for the false discovery rate (set to 0.05). The associated gene ontology (GO) of the differentially expressed genes (annotated by their probe set) was extracted using Bioconductor's *Gostats* package. The fold change in gene expression was also calculated using Bioconductor's *limma* package.

Chapter 4.3.7 Q-PCR

Three candidate genes, identified by their differential expression patterns through microarray analysis, coding for microseminoprotein beta (MSMB), S100 calcium binding protein A6 (S100A6) and thrombospondin 1 (THBS1), were selected for expression analysis by Q-PCR. RNA was extracted as described above for each model system (monolayer culture, spheroid and xenografts) from five independent samples. All Q-PCR experiments were performed twice in duplicate. cDNA synthesis was performed according to the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR protocols (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Two micrograms of total RNA were used to perform reverse transcription. The Q-PCR experiments were conducted with the QuantiTec SYBR Green

PCR kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen Inc. Mississauga, Ontario) using a Rotor-gene 3000 Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Research, Montreal Biotech Inc., Montreal, Qc). Samples were diluted 1/50 in water, and then 5 μ L of the diluted sample was used in a final volume of 20 μ L containing 10 pg of primers (primer sequences are provided in Supplementary Table 1). Melt curves and gel electrophoresis confirmed the specificity of each reaction. The relative quantity of gene expression was measured with the Pfaffl analysis method [40]. Based on microarray data, GAPDH was selected as the reference gene.

Chapter 4.3.8 Immunohistochemistry

The anti-PCNA rabbit polyclonal antibody (sc-7907) was used to test for cell proliferation. Briefly, spheroids and monolayer cultured cells were formalin fixed and suspended in histogel prior to paraffin embedding. Xenografts were formalin fixed and paraffin embedded. Sections were deparaffinized in toluene and re-hydrated in a gradient of ethanol. In order to eliminate endogenous peroxidase activity the samples were treated with 3% H₂O₂ followed by a 15 min submersion in boiling citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0) to unmask antigens. Protein blocking serum-free reagent (DakoCytomation Inc., Mississauga, ON) was used to block the sections which were then incubated with primary antibody for 60 min followed by a 20 min incubation with the secondary biotinylated antibody and a 20 min incubation with streptavidin-peroxydase complex (Dako Diagnostics Canada Inc.) at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing 0.3% H₂O₂ as a substrate for peroxidase. The nuclei were counterstained with Hematoxylin. Substitution of the primary antibody with phosphate buffered saline served as a negative control.

Monolayer cultures, xenografts and spheroids were tested for S100A6 expression using a goat polyclonal antibody (sc-16137; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). S100A6 expression was also analyzed in human ovarian tumor tissues (using serous and

multi-subtype tissue arrays) and in normal ovary (in both tissue arrays and slides). A serous tissue array was built using 196 serous samples of ovarian epithelial cancer ranging from grade 1 to grade 3. The multi-subtype tissue array contains 97 samples of different subtypes (clear cell, serous, endometrioid and mucinous carcinomas) of ovarian epithelial cancer and normal epithelium. Immunohistochemistry on the tissue arrays was performed at least twice and results were scored for both cytoplasmic and nuclear staining by a pathologist.

Chapter 4.4 Results:

Chapter 4.4.1 Establishment and characterization of spheroid EOC model

Spheroids were generated in all EOC cell line cultures of hanging droplets. However, while compact spheroids with clearly defined margins were generated for TOV-112D and OV-90, TOV-21G spheroids were visibly less compact (Figure 1). The spheroids reached maximum size (approximately 500 μm for all cell lines) by day four of culture and conserved their structure until day 10 (data not shown). Each droplet contained one spheroid and the morphology of all spheroids was similar within the same cell line. Cell proliferation was verified by immunohistochemistry staining with the PCNA antibody at day four of culture (Figure 2). Positive nuclear staining was observed indicating the presence of proliferating and viable cells throughout the spheroid.

To investigate cell viability within the spheroid and to determine the ability of spheroids to form tumors *in vivo*, we generated xenografts from OV-90 monolayer and spheroid cultures. Mice were injected intraperitoneally or subcutaneously with the same amount of cells from monolayers, intact spheroids as well as trypsinized spheroids. As shown in Table 1, no apparent changes in tumor growth or latency were observed when spheroids were injected subcutaneously or intraperitoneally. In all cases, tumors were highly vascularized and intraperitoneal tumors were accompanied with the formation of

hemorrhagic ascites (data not shown) consistent with previous results from monolayer xenografts [6].

Chapter 4.4.2 Molecular description of EOC models

To further characterize the spheroid model, expression values generated by Affymetrix GeneChip microarray analyses of the EOC cell lines grown in different models were compared. Comparisons were made between expression profiles of independently generated spheroids (S) and *in vivo* xenografts from either subcutaneous (TSC) or intraperitoneal (TIP) injections. In addition, this analysis included profiles from monolayer cultures (L) as well as from re-established monolayer cultures derived from either subcutaneous (LSC) or intraperitoneal (LIP) xenografts. All possible two-way comparisons of expression profiles from different models derived from the same cell line had a R^2 factor of 0.91 (± 0.04) indicating a degree of similarity associated with biological replicates (data not shown). Gene expression profiles from monolayers, spheroids and xenografts were then analyzed using hierarchical clustering analysis with the Pearson correlation distance. Each of the EOC cell lines clustered separately into three major branches as shown by the low correlation coefficients (less than 0.5) at the root of the clustering tree. Figure 3 shows also that, within each EOC cell line, two major branches were observed in the cluster analysis although the expression values were highly similar (see above). TOV-112D xenografts fell into two separate branches (Figure 3 Panel B) and in TOV-21G they clustered within the same principal branch (Figure 3 Panel C). However, in both cases the TOV-112D and TOV-21G gene expression profiles showed the greatest association between xenografts and early passage monolayer cultures derived from their respective xenografts (Figure 3 Panels B-C). Spheroids tended to cluster together, except in the case of TOV-21G in which case the spheroids were still in the same sub-branch. For OV-90 the two branches were defined by monolayer cultures versus a grouping that included both spheroids and xenografts (Figure 3 Panel A).

Although gene expression patterns were highly similar over the 22,000 probes sets as determined by global correlation analysis, we were interested in identifying possible expression profiles that could highlight differences between monolayer cultures and the more complex 3-D models exemplified by spheroids and xenografts. Based on the hierarchical cluster analysis, we focused our attention on OV-90. This cell line was specifically chosen as expression profiles from the monolayer cultures were clustered in a different branch than those of the 3-D models. Starting with 2,379 filtered probe sets based solely on OV-90 data, 610 probe sets were identified (supplementary Table 2) which significantly separate the two groups of model systems for this cell line (Figure 4A). The 610 probe sets were selected based on two criteria: 1) significant differential expression ($p \leq 0.05$) between either xenografts or spheroids and monolayer and 2) non-significant differential expression between xenografts and spheroids. These probe sets represent 566 known genes (where 82 genes were represented by more than one probe set), eight expressed sequence tags, 29 hypothetical proteins and seven un-annotated sequences. The differentially expressed genes were associated with various GO terms for known/putative molecular functions (supplementary Table 3). Noteworthy is that cytoskeletal protein binding was amongst the most significant terms ($p=0.0001$) (Figure 4B). Cytoskeletal proteins were also more highly represented as judged by their presence in the 610 list versus the total number of cytoskeletal genes on the array (25/241, ~10%) in comparison to the relative frequency of cytoskeletal genes amongst all genes/ESTs on the array (241/22,000, ~1%). Significant representation was also noted for GO terms RNA binding ($p=0.00001$), nucleotide binding ($p=0.0001$) and nucleoside-triphosphate activity ($p=0.001$).

Chapter 4.4.3 Semi-quantitative Q-PCR and immunohistochemistry

In order to validate the GeneChips® microarray results, three candidate genes (MSMB1, S100A6, and THBS1) were selected from the OV-90 profile that segregated

monolayer cultures from 3-D models and verified their relative expressions by Q-PCR (Figure 5). These genes were selected amongst the most differentially expressed genes from the 610 differentially expressed genes and represent both up-regulated (MSMB1 and S100A6) and down-regulated (THBS1) genes (Figure 5A). Five independent samples for each model system were tested. In accordance with microarray results, Q-PCR results demonstrated MSMB1 and S100A6 over-expression, and THBS1 under-expression, in the spheroid and xenograft models compared to the monolayer model.

We were further interested in determining how the observation made at the RNA level in the different EOC models related to protein expression. Significantly stronger S100A6 (the only candidate for which an appropriate immunohistochemistry antibody was available) expression was observed in both the spheroid cultures and xenografts as opposed to cells grown as monolayers for all three cell lines tested (Figure 6A and Supplementary Figure 1). To further address the expression of S100A6 in the context of EOC, and to compare its expression to the different patterns seen in the model systems, we assessed the expression of S100A6 using a multi-subtype human EOC tissue microarray or from slides in the case of the normal ovarian controls (Figure 6B). While no significant cytoplasmic or nuclear staining was observed in normal surface ovarian epithelia, most EOC tissues appeared to express cytoplasmic S100A6, and a majority also express nuclear S100A6 (Figure 6C).

Chapter 4.5 Discussion:

Chapter 4.5.1 The hanging droplets culture allows spheroid formation for EOC cell lines.

In order to develop the *in vitro* spheroid model, we have adapted the hanging droplet method, originally described for stem cells, for EOC cultures. This method is attractive since it can be adapted to most media conditions and does not require the use of other components, such as agarose and agitation, which render culturing more complicated. Spheroids obtained are highly reproducible showing similar morphology among individual drops and can be easily harvested to isolate high quality derivative products. We also demonstrated that EOC spheroids are robust and can be fixed and embedded in histogel allowing cross-sectioning and characterization of the cellular components of the spheroid. In addition to the EOC cell lines described here, there is mounting evidence indicating that a variety of tumor cell lines are able to form spheroids with the hanging droplet culture method [41,42]. However, clearly not all cell lines have the ability to do this since in our experience normal human endothelial cell cultures (HUVEC) never formed 3-D structures in droplets but did form spheroids in overlay cultures (data not shown).

Previous studies using different spheroid formation methods demonstrated the presence of hypoxic cores [24,43,44]. However, we did not observe hypoxic or necrotic cores rather the cores appeared to contain viable cells based on presence of PCNA. Moreover, immunohistochemistry analysis using anti-Hif-1 α antibody (which detects hypoxia induced factor in the nucleus of hypoxic cells) was negative in spheroids derived from all three EOC cell lines (data not shown). The relatively short culture period in our experiments (four days) and small size of spheroids could however explain the difference from independent reports. *In vivo*, tumors smaller than 0.5 mm in diameter are capable of nutrient absorption without induction of visible angiogenesis [45].

To further characterize the spheroid model, tumor growth *in vivo* was assessed in mice. Apparent differences in tumor latency would have suggested that the robustness of the cell population in spheroids was different from that of monolayer cultures. However, no such differences were observed apart from the fact that two mice from the trypsinized spheroid group failed to form tumors, which may be due to the aggressive trypsin treatment the spheroids received prior to injection. In particular we saw no apparent difference in the lag time to tumor formation, suggesting that cell viability and tumor take were unaffected by spheroids.

Chapter 4.5.2 OV-90 *in vitro* spheroids cluster with *in vivo* generated xenografts

Global gene expression correlation analysis underlies the fact that differences in model systems developed from the same cell line were subtle. Unsupervised hierarchical clustering, using the R's Cluster package indicated that all three cell lines clustered separately. This may not be surprising since these cell lines were derived from different patient samples that exhibited different histopathological subtypes of EOC [6] and microarray analyses of EOC tumors has shown that EOC tumors of different histopathological subtypes may cluster into distinct groups [46]. Moreover, the EOC cell lines are distinguishable by their molecular genetic profiles based on the presence of somatic mutations in genes such as TP53, CDKN2A, KRAS and TGFBR2, and evidence that genes underlying microsatellite instability may have been affected [6,11], and these genetic signatures could be reflected in overall molecular pathways affected as shown in global expression analyses. Thus it is perhaps not surprising that using all the samples independently of their cell line of origin coupled with the stringent analysis criteria used herein for OV-90, which included adjusted p values, we failed to identify a set of statistically significant differentially expressed genes in common among the three EOC cell lines which stratified the 3-D models from the monolayers (data not shown). The analysis

using the R's Cluster package identified two main branches for each cell line, with different parameters appearing to influence clustering depending on the cell line tested. Indeed, for the TOV-21G and the TOV-112D, cluster analysis appears to group xenografts and the corresponding xenograft monolayer cultures. In contrast, in OV-90 cells grown as monolayer formed one branch, while a second major branch was defined by the xenografts and spheroids. Clinically, the OV-90 cell line was derived from malignant ascites in the context of an ovarian carcinoma, where cells often form aggregates naturally [47]. OV-90 is also the only cell line able to form, albeit smaller, spheroids in the absence of serum. It is tempting to speculate that these unique properties of OV-90 are related to its clinical origin from ascites in contrast to the TOV-21G and TOV-112D cell lines that were both isolated from solid primary ovarian tumors.

Using Bioconductor's gene expression analysis tools, we were able to identify, for the OV-90 cell line, gene expression profiles which separate monolayer cultures from more complex 3-D models. We were able to identify statistically significant 610 probe sets ($p \leq 0.05$) that underline the difference between spheroid/xenograft models and monolayer cultures. Interestingly, molecular function analysis using the GO terms, identified among the most significant functions genes involved in cytoskeletal remodeling (reviewed in [48]). The cytoskeleton is involved in cell shape and motile events such as cell movement, intracellular transport, contractile-ring formation and chromosome movement. Hence, it plays a much greater role than simply that of a structural framework. Regulation of various cellular processes linked to transformation such as proliferation, contact inhibition, anchorage-independent cell growth and apoptosis are also affected by changes in cytoskeleton [49]. Further experiments will be needed to assess the impact of individual genes on the tumor growth behavior of EOC cell lines.

In OV-90, three genes were chosen for further study based on their signal intensity, their level of expression, the fold change observed (between monolayers and 3D models) and their potential implication in cancer biology. The THBS1 gene codes for an inhibitor of angiogenesis [50,51]. In the spheroid and xenograft models this gene is under-expressed

and could imply an ultimate modification in angiogenic signaling. Moreover, there is evidence that thrombospondin negatively regulates PECAM1 expression [52]. PECAM1 is a member of immunoglobulin superfamily expressed on the surface of endothelial cells and is also involved in angiogenesis. This molecule was also identified as being over-expressed in spheroids and xenografts as opposed to its negative regulator THBS1, which is under-expressed. This finding could provide a molecular basis and contribute to previous studies which showed that spheroids can induce vessel formation *in vivo* [29] and *in vitro* [53]. Modulation of angiogenesis controlling genes can be especially interesting in co-culture experiments in the presence of endothelial cells. Microseminoprotein was also found to be over-expressed in spheroids and xenografts at the RNA level in our datasets. The microseminoprotein beta is a protein normally secreted by the human prostate gland but transcripts were detected in other human tissues like the ovary [54]. This protein has an inhibin-like activity and inhibin levels have been found to be elevated in the serum of ovarian cancer patients [55,56].

Another of the genes chosen for analysis was also studied at the protein level. The S100 proteins are a family of calcium binding proteins associated with tumor progression and processes involving cell adhesion, proliferation, motility, differentiation, secretion, angiogenesis and endothelial cell invasion [57-59]. Members of the S100 calcium binding protein family were found to be over-expressed in different types of cancers including ovarian cancer [60-64]. Also, these proteins were identified as differentially expressed between ovarian carcinoma and normal ovaries [65]. In our study, over-expression of S100A6 RNA and the encoded protein in human ovarian cancers confirms and extends these findings. In particular, our study is the largest and most histologically diverse done to date, and addresses not only immunostaining intensity but also the cellular localization of S100A6 in EOC. Although high level of S100A6 expression is often associated with tumor progression, little is known about mechanisms regulating gene expression. Previous studies show that S100A6 is bound by the calcium binding protein CacyBP. Together, these two proteins may play a role in the degradation of β -catenin, which itself has been implicated in

cell-cell interactions via its binding to cadherins [66]. It is noteworthy that CacyBP was also differentially expressed when the 3-D models were compared to the monolayers. S100A6 is also regulated by the binding of an upstream stimulatory factor (USF) [67] that may be a stress responsive transcription factor and therefore the up-regulation of S100A6 in 3-D models may be related to the induction of stress signaling similar to those seen in xenografts and tissue samples. A recent study of the role of S100A6 in pancreatic cancer showed that inhibition of this gene decreased proliferation and invasiveness of pancreatic cancer cells [68]. Moreover, using RNAi technology, this group identified 15 up-regulated and 15 down-regulated genes associated with the modulation of S100A6 expression of which one third were found among our 610 differentially expressed genes.

Chapter 4.6 Conclusion

The availability of appropriate models systems that recapitulate *in vivo* tumorigenesis are essential for dissecting cancer biology. EOC monolayer cultures are a useful and important tool in the study of cancer but they fail to reproduce some aspects of tumorigenesis such as tridimensional growth, cell-cell interactions and cellular heterogeneity of tumors *in vivo*. The hanging droplets EOC spheroids described here provide an additional system for future studies on 3-D models of ovarian cancer. Identifying genetic differences based on growth conditions may allow a better understanding of factors that impact on tumor biology. Identification of genes in spheroid models that mimic the *in vivo* tumor gene expression patterns and are not expressed in a similar way in monolayers suggests that a spheroid model may represent an interesting alternative to complex and costly protocols required for *in vivo* modeling.

For future studies, it will be of interest to perform co-culture studies of EOC spheroids with other types of cells, such as endothelial cells or stroma cells, in order to introduce a form of heterogeneity usually observed in the *in vivo* environment. In addition,

spheroid models have micro-diffusion properties more closely aligned with tissue conditions, and may therefore be a more appropriate model for initial therapeutic screening. The molecular description of a simple and reproducible 3-D EOC model will no doubt serve to further studies on ovarian cancer.

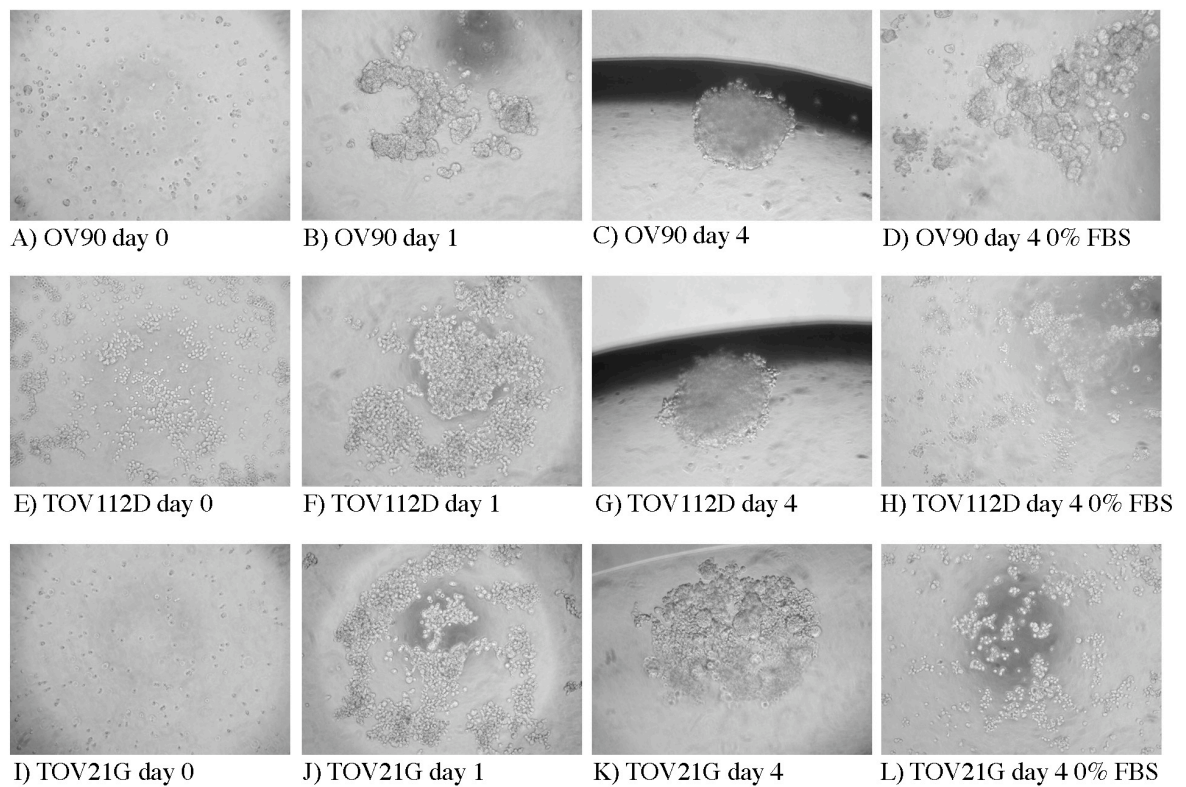


Figure 1. Morphological appearance of spheroid development in hanging droplets.

A), E), I) OV-90, TOV-112D and TOV-21G respectively at the moment of seeding of cells in the droplets (day 0) with 10% FBS. B), F), J) OV-90, TOV-112D and TOV-21G respectively, 24 hours after cell seeding in the droplets and C), G), K) represent respectively OV-90, TOV-112D and TOV-21G spheroids four days after seeding with 10% FBS. D), H), L) OV-90, TOV-112D and TOV-21G four days after seeding in serum free medium (0% FBS). 4000 cells of each cell line were initially seeded and the spheroids were compact and at maximal size after four days of culture in hanging droplets. All pictures were taken at 100x magnification.

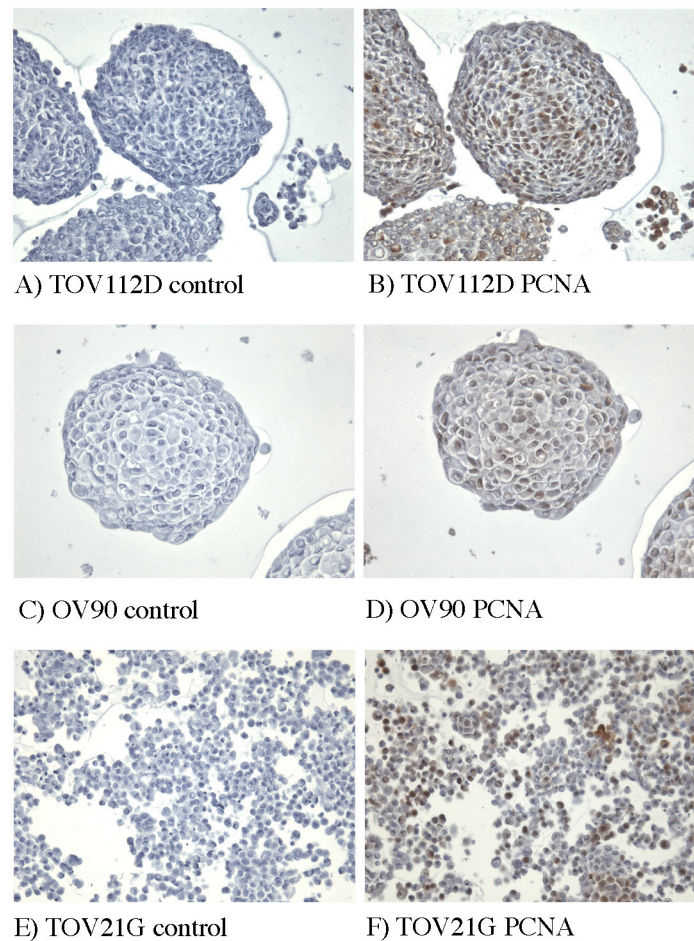


Figure 2. Evaluation of cellular proliferation in spheroids developed from the three EOC cell lines.

Nuclear *PCNA* expression was observed in all spheroids developed in hanging droplets from the three cell lines (B, D and F) at day four of culture. Spheroids were collected in PBS and formalin fixed before mounting in histogel and paraffin embedding. The *PCNA* antibody was diluted in a proportion of 1:100 in PBS. Substitution of the primary antibody with PBS served as a negative control (A, C and E).

Model injected	Intraperitoneal site of injection		Subcutaneous site of injection	
	SCID mouse tumor assay	Average time of appearance (weeks)	SCID mouse tumor assay	Average time of appearance (weeks)
Monolayer	6/6	8 +/- 2	6/6	3 +/- 2
Whole spheroid	6/6	7 +/- 1	6/6	4 +/- 2
Trypsinized spheroids	6/6	7 +/- 1	4/6	4 +/- 1

Table I. *In vivo* tumor growth of OV-90 monolayer and spheroid models.

Equal amounts of OV-90 cells (3×10^6) were injected intraperitoneally or subcutaneously. Tumorigenicity in mice was compared between cell lines from monolayer cultures (at 80% density), intact spheroids or trypsinized spheroids. Mice were sacrificed when tumor size reached at least one cm^3 .

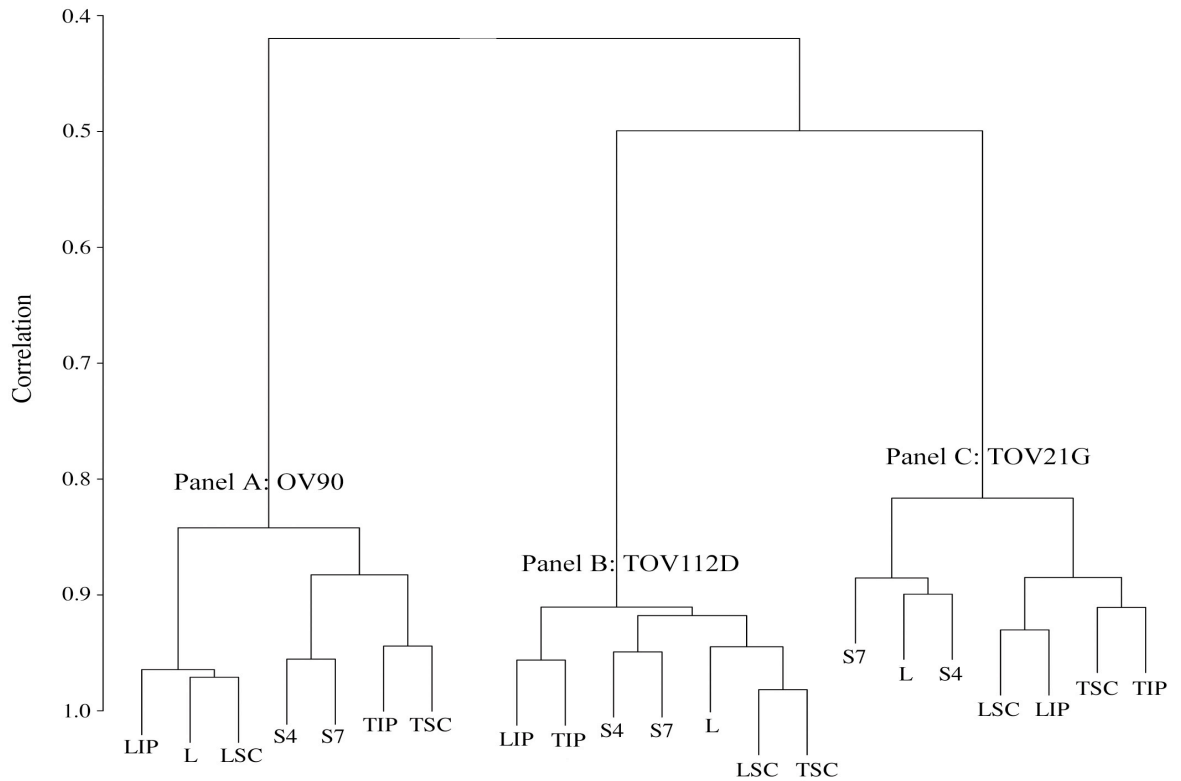


Figure 3. Global gene expression (based on 5,611 probe sets from filtered data) hierarchical cluster analysis for OV-90 panel A), TOV-112D Panel B) and TOV-21G Panel C) cell line derived models. The three cell lines cluster separately. High correlations are observed for all models within the same cell line as opposed to a weaker correlation between different cell lines. Spheroids (S4 and S7: spheroids collected at day 4 and 7 respectively of culture) and xenografts (TSC: subcutaneous xenograft and TIP: intraperitoneal xenograft) are clustered together for the OV-90 cell line models and monolayer cultures are found in a separate sub-branch (L: original cell line, LIP: cell line derived from an intraperitoneal xenograft, LSC: cell line derived from a subcutaneous xenograft).

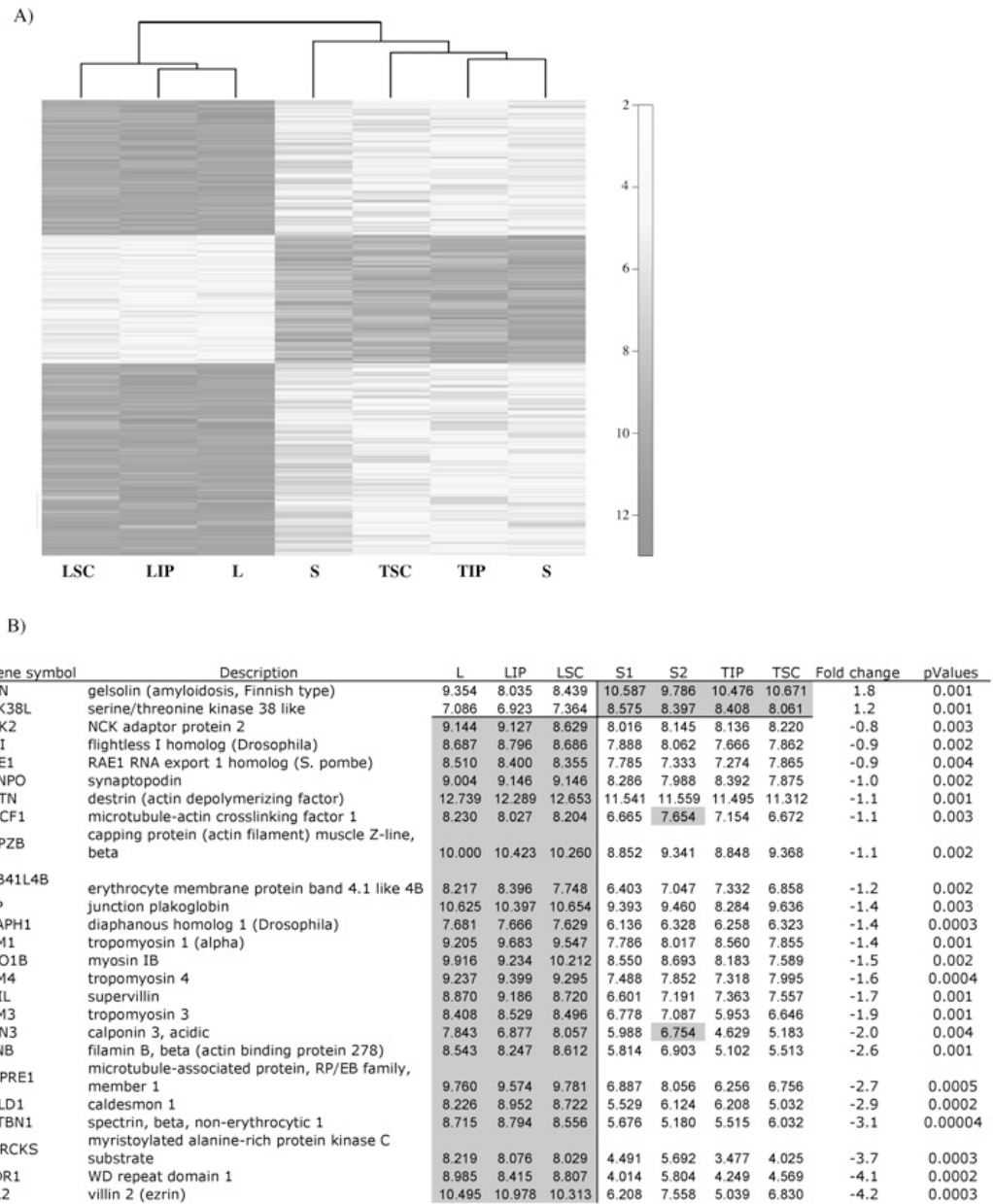


Figure 4

Figure 4. Description of OV-90 gene expression profile separating monolayer cultures from spheroid and xenograft models.

A) Heatmap for hierarchical clustering using the 610 probe sets identified as genes expressed in a similar way in spheroids and xenografts but not in monolayers. B) GO term based molecular function association. Differentially expressed genes associated with cytoskeletal protein binding along with expression signals in different model systems are listed. Log₂ values of expression signals are indicated. Shading represents genes over-expressed between the monolayers and 3-D models.

A)

Gene symbol	Description	L	LIP	LSC	S1	S2	TIP	TSC	Fold change	pValues
MSMB	microseminoprotein, beta-	6.559	8.242	3.841	11.467	10.439	12.836	12.939	5.7	0.001
MSMB	microseminoprotein, beta-	7.681	8.643	5.204	11.708	10.705	12.660	12.988	4.8	0.001
ITIH2	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	8.431	6.099	3.798	9.314	9.282	10.415	10.600	3.8	0.003
SPINK5	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	4.842	6.277	4.055	7.636	7.513	9.083	9.032	3.3	0.001
RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4	5.984	4.363	5.543	8.626	6.491	9.231	9.205	3.1	0.002
TFF2	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	4.998	4.747	4.722	6.180	8.179	8.201	9.022	3.1	0.001
S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcylin)	6.841	6.384	7.304	9.585	9.454	10.052	9.984	2.9	0.0001
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like ///									
	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	5.758	6.268	6.441	8.415	7.597	9.173	9.203	2.4	0.001
HABP2	hyaluronan binding protein 2	8.434	7.550	7.464	9.922	10.032	9.948	10.439	2.3	0.0003
ZNF226	zinc finger protein 226	6.369	6.327	6.775	8.821	8.275	9.015	8.924	2.3	0.0002
THBS1	thrombospondin 1	8.685	9.620	8.830	4.373	4.280	4.395	5.291	-4.5	0.00004
CDV3	CDV3 homolog (mouse)	7.985	7.713	7.841	2.790	3.828	3.806	2.988	-4.5	0.00003
THBS1	thrombospondin 1	9.494	9.754	9.862	4.554	5.791	4.571	5.766	-4.5	0.00006
IL8	interleukin 8	8.873	9.156	9.942	4.123	6.413	5.178	3.420	-4.5	0.0005
PRNP	prion protein (p27-30) (Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia)	8.754	9.150	9.226	4.278	5.597	4.824	2.774	-4.7	0.0003
SLC7A8	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	7.995	7.716	7.849	2.997	3.064	3.147	3.004	-4.8	0.000001
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	8.623	9.565	8.816	3.914	4.341	3.850	2.777	-5.3	0.00004
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	9.360	9.710	9.620	5.963	3.963	3.797	3.365	-5.3	0.0002
PEG10	paternally expressed 10	8.591	10.145	7.972	3.407	3.124	3.325	3.894	-5.5	0.00007
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	9.494	9.613	9.135	3.878	5.125	2.408	3.896	-5.6	0.0001
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	9.334	8.119	9.738	1.998	4.705	2.752	2.382	-6.1	0.0002
CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	12.133	11.866	12.496	5.462	6.782	5.625	4.078	-6.7	0.00006

B)

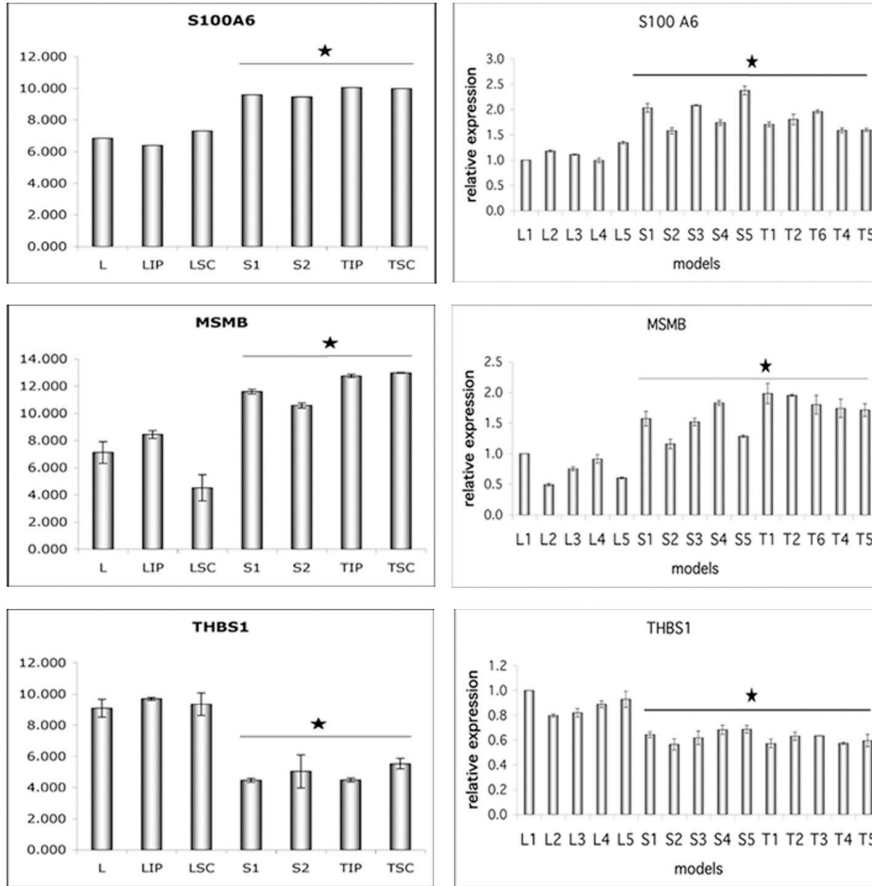
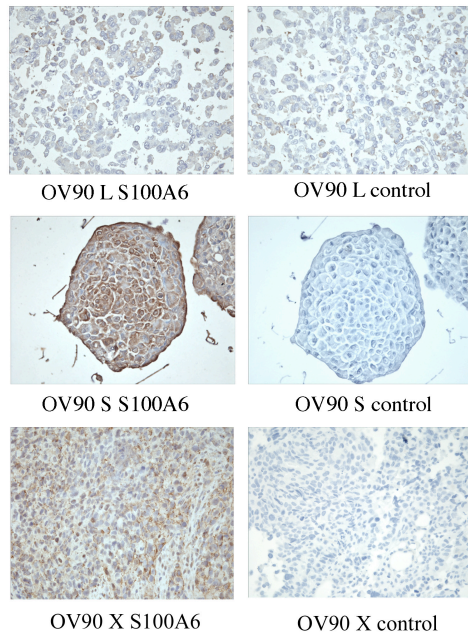


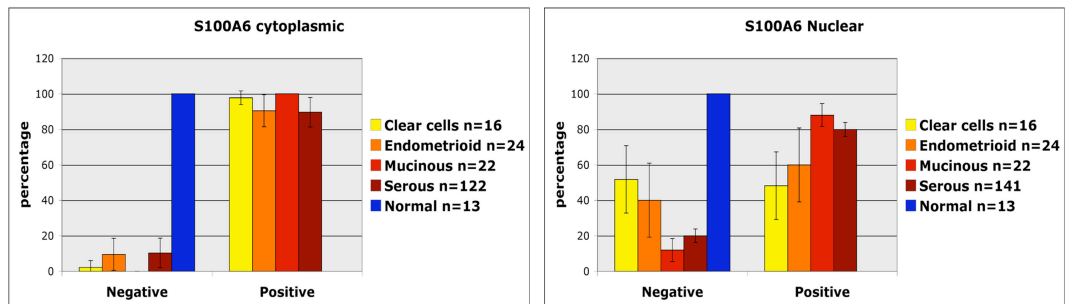
Figure 5. Validation of candidate genes by Q-PCR. A) The list of the most differentially expressed genes between monolayers and spheroid/xenograft models.

The three candidate genes chosen for validation are represented in bold. B) Left panels represent microarray gene expression signal values. Right panels represent Q-PCR results for which five different samples were used for each model system. Q-PCR tables represent an average of two independent experiments each done in duplicates. L1, L2, L3 represent the same cell lines as those used for the chip experiments (L1: cell line derived from intraperitoneal xenograft (LIP) at passage 4, L2: cell line derived from a subcutaneous xenograft (LSC) at passage 5). L3, L4, L5 original cell line at passages 54, 70, 156 respectively. S1 and S2 represent the same spheroids as those used for the chip experiments. S3, S4 and S5 represent day 4 spheroids developed from the original cell line (at passages 83, 64 and 144 respectively). T1 and T2 represent the same xenografts as those used for the chip experiments (T1: subcutaneous xenograft (TSC), T2: intraperitoneal xenograft (TIP)). T3, T4 and T5 represent two different intraperitoneal and one subcutaneous xenografts respectively. The difference between monolayer and 3-D models was significant (asterisks) for all three candidates as verified by t-test (*SI00A6* p= 1.32E-05, *MSMB1* p= 2.82E-05, *THBS1* p= 9.23E-04). Relative quantity of gene expression was measured with the Pfaffl analysis method using *GAPDH* as a reference gene.

A)



B)



C)

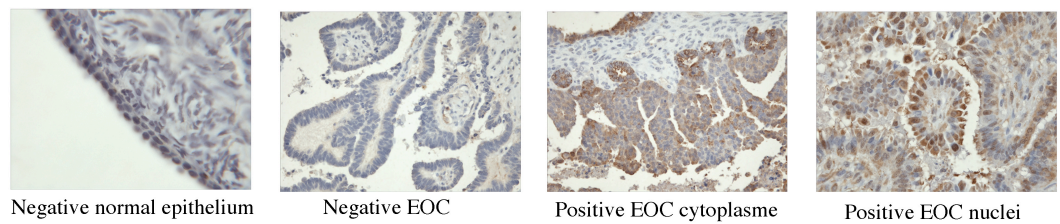


Figure 6

Figure 6. *S100A6* expression at the protein level in cell lines, spheroids, xenografts, different epithelial ovarian cancers and normal epithelia.

A) Immunohistochemistry on OV-90 paraffin embedded spheroids (S), xenografts (X) and monolayer cultures (L). OV-90 monolayers were collected by scraping at 80% confluence and spheroids were collected at day four of culture in hanging droplets. Samples were formalin fixed and embedded in histogel prior to paraffin mounting. Tumor xenografts of OV-90 were formalin fixed and paraffin embedded. A strong immuno-staining is observed in spheroids and xenografts but not in monolayer cultures. B) Negative versus positive staining in different subtypes of EOC and normal ovarian epithelium. Nuclear and cytoplasmic stainings were evaluated. The majority of EOCs present both nuclear and cytoplasmic staining as opposed to no expression in normal epithelia. Total numbers of samples for each EOC subtype are represented on the chart. Tissue array immunostainings were done in triplicates (for the multi-subtype array) and duplicates (for the serous array). C) Examples of different signal intensity observed on the tissue array. Negative staining for normal and tumor tissues is represented as well as positive nuclear and cytoplasmic expression for EOCs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Lise Portelance, Manon de Ladurantaye, Marie-Line Puiffe and Jason Madore for technical assistance. We would like to thank members of the Department of Gynecologic Oncology and the Department of pathology of the CHUM for tumor procurement. We are grateful to the laboratory members for thoughtful discussions and to Dr. C. Le Page, Dr. B. Péant, L. Lessard and V. Ouellet for careful reading of the manuscript. This work was supported by a strategic initiative grant from the Cancer Research Society and from awards from the Fondation René Malo to A.-M.M.-M., D.M.P., and C.M.M and Valorisation Recherche Québec to A.-M.M. P.N.T. and D.M.P. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), affiliated to the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). M.Z. was supported by the Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal.

Chapitre 4.7 Bibliography

1. Le Page C, Provencher D, Maugard CM, Ouellet V, Mes-Masson AM. Signature of a silent killer: expression profiling in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4(2):157-167.
2. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001;22(2):255-288.
3. Cvetkovic D. Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:68.
4. Auersperg N, Ota T, Mitchell GW. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12(6):691-703.
5. Tonin PN, Hudson TJ, Rodier F et al. Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene* 2001;20(45):6617-6626.

6. 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.
7. Manderson EN, Mes-Masson AM, Novak J et al. Expression profiles of 290 ESTs mapped to chromosome 3 in human epithelial ovarian cancer cell lines using DNA expression oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 2002;12(1):112-121.
8. Arcand SL, Mes-Masson AM, Provencher D, Hudson TJ, Tonin PN. Gene expression microarray analysis and genome databases facilitate the characterization of a chromosome 22 derived homogeneously staining region. *Mol Carcinog* 2004;41(1):17-38.
9. Presneau N, Mes-Masson AM, Ge B, Provencher D, Hudson TJ, Tonin PN. Patterns of expression of chromosome 17 genes in primary cultures of normal ovarian surface epithelia and epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncogene* 2003;22(10):1568-1579.
10. Samouelian V, Maugard CM, Jolicoeur M et al. Chemosensitivity and radiosensitivity profiles of four new human epithelial ovarian cancer cell lines exhibiting genetic alterations in BRCA2, TGFbeta-RII, KRAS2, TP53 and/or CDKN2A. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54(6):497-504.
11. Manderson EN, Mes-Masson AM, Provencher D, Tonin PN. Mutations in a 10-bp polyadenine repeat of transforming growth factor beta-receptor type II gene is an infrequent event in human epithelial ovarian cancer. *Clin Genet* 2000;57(2):151-153.
12. Simone NL, Paweletz CP, Charboneau L, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA. Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics. *Mol Diagn* 2000;5(4):301-307.
13. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988;240(4849):177-184.
14. Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor. *Cell Biol Int* 1999;23(3):157-161.
15. Mayer B, Klement G, Kaneko M et al. Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 2001;121(4):839-852.
16. Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol* 1998;177:1-56.
17. Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(1):31-42.
18. Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36(2-3):193-207.

19. Francia G, Man S, Teicher B, Grasso L, Kerbel RS. Gene expression analysis of tumor spheroids reveals a role for suppressed DNA mismatch repair in multicellular resistance to alkylating agents. *Mol Cell Biol* 2004;24(15):6837-6849.
20. Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1997;57(12):2388-2393.
21. Fracasso G, Colombatti M. Effect of therapeutic macromolecules in spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36(2-3):159-178.
22. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002;62(12):3387-3394.
23. Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC. Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res* 1998;18(6A):4147-4158.
24. Wartenberg M, Schallenberg M, Hescheler J, Sauer H. Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer* 2003;104(3):274-282.
25. Rainaldi G, Calcabrini A, Arancia G, Santini MT. Differential expression of adhesion molecules (CD44, ICAM-1 and LFA-3) in cancer cells grown in monolayer or as multicellular spheroids. *Anticancer Res* 1999;19(3A):1769-1778.
26. Tanaka R, Saito T, Ashihara K, Nishimura M, Mizumoto H, Kudo R. Three-dimensional coculture of endometrial cancer cells and fibroblasts in human placenta derived collagen sponges and expression matrix metalloproteinases in these cells. *Gynecol Oncol* 2003;90(2):297-304.
27. Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36(2-3):75-87.
28. Sonoda T, Kobayashi H, Kaku T, Hirakawa T, Nakano H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and *in vivo* transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 2003;196(2):229-237.
29. Gilead A, Meir G, Neeman M. The role of angiogenesis, vascular maturation, regression and stroma infiltration in dormancy and growth of implanted MLS ovarian carcinoma spheroids. *Int J Cancer* 2004;108(4):524-531.
30. Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *Faseb J* 2001;15(6):995-1005.

31. Oudar O. Spheroids: relation between tumour and endothelial cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36(2-3):99-106.
32. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 2004;9(4):273-285.
33. Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol* 1998;79(1):1-23.
34. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer-- a review. *Breast Cancer Res Treat* 2004;85(3):281-291.
35. Keller GM. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7(6):862-869.
36. Zietarska M MC, Provencher D, Mes-Masson A-M. Development of a new *in vitro* model of epithelial ovarian cancer (EOC). AACR 94th Annual Meeting. Proceedings 2003.
37. Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J. Open source software for the analysis of microarray data. *Biotechniques* 2003;Suppl:45-51.
38. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4(2):249-264.
39. Hochberg, Y. Benjamini, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerfull approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 1995;57:289-300.
40. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
41. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83(2):173-180.
42. Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro RF. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol* 2004;67(3):295-303.
43. Sutherland RM, Durand RE. Hypoxic cells in an *in vitro* tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1973;23(3):235-246.
44. Franko AJ, Parliament MB, Allalunis-Turner MJ, Wolokoff BG. Variable presence of hypoxia in M006 human glioma spheroids and in spheroids and xenografts of clonally derived sublines. *Br J Cancer* 1998;78(10):1261-1268.

45. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-364.
46. Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA et al. Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2002;62(16):4722-4729.
47. Burleson KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Jr., Skubitz AP. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol* 2004;93(1):170-181.
48. Cooper JA, Schafer DA. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(1):97-103.
49. Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11(1):41-47.
50. Sid B, Sartelet H, Bellon G et al. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49(3):245-258.
51. Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta - Reviews on Cancer* 2006;1765 (2):178-188.
52. Sheibani N, Newman PJ, Frazier WA. Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, regulates platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 expression and endothelial cell morphogenesis. *Mol Biol Cell* 1997;8(7):1329-1341.
53. Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* 2004;7(2):97-103.
54. Baijal-Gupta M, Clarke MW, Finkelman MA, McLachlin CM, Han VK. Prostatic secretory protein (PSP94) expression in human female reproductive tissues, breast and in endometrial cancer cell lines. *J Endocrinol* 2000;165(2):425-433.
55. Robertson DM, McNeilage J. Inhibins as biomarkers for reproductive cancers. *Semin Reprod Med* 2004;22(3):219-225.
56. Robertson DM, Pruyers E, Burger HG, Jobling T, McNeilage J, Healy D. Inhibins and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225(1-2):65-71.
57. Emberley ED, Murphy LC, Watson PH. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem Cell Biol* 2004;82(4):508-515.
58. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322(4):1111-1122.

59. Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M et al. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004;23(32):5487-5495.
60. Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 2005;46(3):256-269.
61. Hsieh HL, Schafer BW, Sasaki N, Heizmann CW. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307(2):375-381.
62. Ito Y, Yoshida H, Tomoda C et al. Expression of S100A2 and S100A6 in thyroid carcinomas. *Histopathology* 2005;46(5):569-575.
63. Komatsu K, Andoh A, Ishiguro S et al. Increased expression of S100A6 (Calcyclin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):172-177.
64. Vimalachandran D, Greenhalf W, Thompson C et al. High nuclear S100A6 (Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients. *Cancer Res* 2005;65(8):3218-3225.
65. Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE et al. Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol* 2004;165(2):397-414.
66. Filipek A. S100A6 and CacyBP/SIP - two proteins discovered in ehrlich ascites tumor cells that are potentially involved in the degradation of beta-catenin. *Chemotherapy* 2006;52(1):32-34.
67. Lesniak W, Jezierska A, Kuznicki J. Upstream stimulatory factor is involved in the regulation of the human calcyclin (S100A6) gene. *Biochim Biophys Acta* 2000;1517(1):73-81.
68. Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N et al. The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinical implication as a diagnostic marker and therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2005;11(21):7785-7793.

Chapitre 5. Inhibition of the S100A6 protein over-expressed in 3D spheroid models of epithelial ovarian cancer (EOC) impacts cellular migration

Magdalena Zietarska¹, Liliane Meunier¹, Julie Lafontaine¹, Patricia N. Tonin^{2,4}, Diane Provencher^{1,3}, Anne-Marie Mes-Masson^{1,5}.

¹Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) / Institut du cancer de Montréal, ²The Research Institute of the McGill University Health Centre, ³Département d'obstétrique-gynécologie, Université de Montréal, ⁴Departments of Human Genetics and Medicine, McGill University; ⁵Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

Key words: S100A6, ovarian cancer, spheroid, 3D cultures

Article en préparation

Contribution des auteurs :

L'élaboration du projet, la majorité des travaux présentés dans cet article et la rédaction ont été réalisées par le premier auteur. Tous les auteurs ont contribué au manuscrit. Liliane Meunier a contribué au niveau des expériences de caractérisation. Julie Lafontaine a effectué les infections virales. Patricia N. Tonin, Diane Provencher et Anne-Marie Mes-Masson ont participé à l'écriture du manuscrit à son approbation finale.

Chapitre 5.1 Abstract

Epithelial ovarian cancer cell lines derived from long-term passages of malignant ovarian cancers are useful tools for molecular and cellular research however it has been demonstrated that a spheroid model can more closely mimic some of the growth conditions encountered by tumor cells *in vivo*. We have previously established an *in vitro* 3D culture system of EOC and identified S100A6 as a candidate gene that is over-expressed in the 3D model (both *in vivo* and *in vitro*) versus monolayer culture. Here we describe the impact of S100A6 inhibition using short hairpin RNAs in both monolayer and spheroid models of EOC. To begin to address how S100A6 might affect EOC growth parameters, we have transfected OV-90 cells with shRNA constructs directed against S100A6. In parallel, S100A6 shRNAs were also transfected in cells which constitutively express this protein in monolayer cultures (TOV-21G). In this monolayer culture model, S100A6 inhibition resulted in lower growth, a greater cellular migration and a more compact spheroid when in 3D cultures. However, the lowered expression of S100A6 in the OV-90 cells, which represent the 3D culture model, results in an inhibition of cellular migration only in the spheroid model. Together these results will allow us to study the influence of cellular environment and the cellular community effect on S100A6 expression and how it can contribute to the neoplastic phenotype of EOC cells.

Chapitre 5.2 Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the leading cause of gynecological malignancy related deaths in women. Prevention and early diagnosis remain the best tools to avoid serious consequences of cancer and to raise chances of survival. Although much research is done to find effective screening techniques and early diagnosis markers, yet 70% of women are still diagnosed at advanced stages of EOC when the five year survival rate at this point

of the disease is less than 30% [1]. This is mainly due to the fact that EOC symptoms are often non-specific and vague, labeling this disease as the silent killer.

Despite thorough knowledge of EOC etiology, aggressive cytoreductive surgery and new chemotherapies, the mortality rate related to EOC has not changed in the past 30 years and approximately 60% of women that do develop EOC will die from this disease. Experimental models are of crucial importance in order to better understand the biological and genetic factors that play important roles in EOC, to develop new intervention strategies and to further our understanding of ovarian tumorigenesis. Spontaneously immortalized cell lines allow long-term experimentation and good reproducibility and they are the most common *in vitro* model system used to date. Although cultured cell lines represent good models that maintain expression patterns related to the tissue of origin [2], we have also shown that important gene expression differences can be observed between the *in vivo* disease and monolayer cultures [3]. Unlike classical monolayer-based models, spheroids represent a model system of intermediate complexity that mirrors some aspects of the 3D cellular context of *in vivo* tumors [4]. Using microarray technology, we have previously compared gene expression profiles of spheroid models to monolayer cultures and *in vivo* xenografts. This analysis resulted in the identification of numerous candidate genes that stratified the 3D *in vivo* and *in vitro* models from the monolayer cultures. S100A6 gene was among the top candidates that were only over-expressed in the xenograft and spheroid models. We have also demonstrated its relevance to ovarian disease by determining its overexpression in the majority of EOC patient samples and its absence in normal epithelia [3]. S100A6 is a member of the S100 protein family group of low molecular calcium binding proteins (reviewed in [5]). Although it is often over-expressed in different cancers (reviewed in [6]), the function of S100A6 remains unclear. S100A6 may play a role in cell proliferation, apoptosis, cytoskeletal dynamics, heat-shock response and tumorigenesis (reviewed in [6-8]). Recent studies, have suggested that it may also play a role in cell adhesion [9, 10] and cellular motility [11-13].

The aim of this research was to study the potential role of S100A6 in EOC tumorigenesis in spheroid models using OV-90 cells where S100A6 is expressed at low levels in a monolayer model versus the spheroid model where it is over-expressed and in TOV-21G cells which constitutively express this protein in monolayer culture as well. In this model, S100A6 inhibition results in lower growth, a greater cellular migration and a more compact spheroid when in 3D cultures. However, the loss of S100A6 in the OV-90 cells results in an inhibition of cellular migration only in the spheroid model and not in the monolayer cultures.

Chapitre 5.3 Material and Method

Chapitre 5.3.1 Cells and spheroid culture

Two spontaneously immortalized EOC cell lines were used in this study (OV-90 and TOV-21G). These cell lines developed in our laboratory were previously very well characterized [14]. Both are derived from chemotherapy-naïve patients. The OV-90 cell line originates from the ascities of a patient diagnosed with an adenocarcinoma and the TOV-21G cell line was derived from a clear cell carcinoma. Cell lines (TOV-21G and OV-90) were cultured in OSE medium (Wisent, Qc, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2,5 µg/ml amphotericin B and 50 µg/ml gentamicin. Cells were incubated in 5% CO₂ and 5% O₂. Cells were maintained in an incubator humidified at 37°C with an atmosphere containing 5% of CO₂ essentially as described [14].

Spheroids were generated from both EOC cell lines in hanging droplets as previously described [3]. To establish spheroids, 4×10^3 cells were suspended in 15 µl of OSE medium (supplemented with 2.5 µg/ml of fungizone, 50 µg/ml of gentamycin and 10% of FBS) and transferred onto the inner surface of a 150 mm petri dish cover. To ensure the integrity and prevent coalescence of droplets, between 100-120 droplets were placed per dish cover. The cover was then placed on a dish containing 15 ml of PBS to prevent

dehydration of the droplets. Once formed (usually at day five of culture), the spheroids were harvested one by one for further studies. Spheroid relative size was measured using the Image-Pro® Plus software (version 5.1, MediaCybernetics®, Bethesda, MD). The size was determined measuring eight radiuses for each spheroid.

Chapitre 5.3.2 Establishment of cell lines stably expressing shS100A6

Two different short hairpin RNAs specific for S100A6 were synthesized for the construction of the pENTRTM/H1/TO-shS100A6 vector (sh452 Forward: 5'CACCGAAGCTGCAGGATGCTGAAATCGAAATTCAGCATCCTGCAGCTTC, and sh434 Forward: 5'-CACCGGAGCTCACCATTGGCTCGAACGAATTCGAGCC-AATGGTGAGCTCC). For detailed description see manufacturer's instructions, (Invitrogen). The vector was then transformed into competent TBL-3 bacteria for selection and amplification. Plasmids were verified by sequencing. A shLacZ control small interfering oligonucleotide provided in the Block-iT kit (Invitrogen) was also used (5'-tcgctgattgtgtagtcg). Both pENTRTM/H1/TO-shS100A6 vectors and the shLacZ control vector were recombined into a destination vector pLenti X1 Puro DEST (694-6) generously provided by Dr. Éric Campeau. Lentiviruses were then used to deliver shS100A6 and LacZ control in the OV-90 and TOV-21G cell lines [15]. Briefly, lentiviruses were produced by co-transfecting the pLenti vectors of interest with ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen) in the 293FT packaging cell line. Supernatants were collected 72h later and viruses were concentrated by ultracentrifugation, resuspended in Hanks buffer and stored at -20°C for further use. Infections were performed overnight in OSE medium in the presence of polybrene. Puromycin selection was applied 48h later. For the creation of stable clones expressing shS100A6 and shLacZ control, approximately 2500 cells were diluted in 7 ml of medium and isolated colonies were selected and amplified.

Chapitre 5.3.3 Western blot analysis

Whole cell extracts from cell lines and spheroids at day 4-5 of hanging droplet culture were obtained after 1h in lysis buffer at 4°C (10 mM HEPES, 400mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT) with freshly added protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was measured using a Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. For Western Blot analysis, 50 µg of protein were resolved on a 15% polyacrylamide gels and the transferred over-night onto a nitrocellulose membrane (Trans-Blot[®] Transfer Medium from Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Membranes were then blocked for 1h with milk buffer (5% powdered milk in water) and incubated for another hour with the primary antibody directed against S100A6 (S5049 SIGMA, Saint-Louis, Missouri) diluted 1:500 in milk buffer. One hour incubation with the secondary mouse IgG1 HRP antibody followed (sc-2060, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:1000. The membranes were then washed and developed with enhanced chemiluminescence substrate (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). To ensure equal protein loading, membranes were incubated with an anti-β-actin antibody (Abcam, Cambridge, UK) diluted in milk buffer.

Chapitre 5.3.4 Growth assay

Growth rates were assessed as previously described [14]. Cells (1x10⁵) were seeded onto 6 well plates on day 0. Cells were trypsinized on days 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13, resuspended in medium and counted using the CASY[®] cell counter (InnovatisAG, Germany). Each experiment was performed in triplicate for each harvest and repeated once.

Chapitre 5.3.5. Cell line and spheroid *in vitro* invasion assay

Using the Boyden chambers, the cellular invasion was assayed by the ability of cells to invade a synthetic basement membrane (Matrigel, Becton-Dickenson, NJ, USA). Polycarbonate membranes (8 μm pore size) of the upper compartment of transwell culture chambers were coated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Matrigel. Ovarian cancer cells lines grown as monolayers were trypsinized and resuspended in OSE medium supplemented with 1% FBS and the spheroids were picked one by one directly from the droplets. The cell suspension (4000 cells) or a single spheroid (composed of approximately 4000 cells as well) were placed in the upper compartment of the Boyden chamber, and the lower compartment was filled with OSE medium supplemented with 5% FBS. Cells were incubated at 37°C for 24 or 48 hours. Following incubation, membranes were fixed in methanol and stained with Giemsa Stain (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA). Non-invading cells were removed with a cotton swab, while invading cells on the underside of the membrane were counted using an inverted microscope.

Chapitre 5.3.6 Spheroid *in vitro* migration assay

Using the Boyden chambers, the spheroids migration was assayed by the ability of cells to migrate through the polycarbonate membranes. The upper compartment of the Boyden chamber was filled with OSE medium supplemented with 1% FBS and the lower compartment was filled with 5% FBS OSE medium which is a chemotractant for the cells. Individual spheroids were then placed in each Boyden chamber and the cells were incubated at 37°C for 24 or 48 hours. Eight spheroids were used for each condition. Following incubation, membranes were methanol fixed and stained with Giemsa Stain (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA). Non-migrating cells were removed with a cotton swab, while motile cells on the underside of the membrane were counted using an inverted microscope.

Relative spheroid migration was also assessed by placing individual spheroids onto a 48 well plate, letting the spheroids adhere to the surface of the plate and then measuring the surface or the distance covered by the migrating cells from the edge of the spheroid. The relative migration of cells from the edge of the spheroids was measured using the Image-Pro[®] Plus software (version 5.1, MediaCybernetics[®], Bethesda, MD). The cellular migration was evaluated after 24 and 48 hours and eight spheroids were used for each condition.

Chapitre 5.3.7 Wound-healing assay

Migration potential was evaluated using the scratch assay method as previously described [16-18]. Briefly, 1×10^5 cells/well were plated onto a 6-well dish and once the cell confluence reached about 90%, four wounds were created in each well using a 200 μ l plastic tip. Wells were then carefully rinsed with PBS and fresh medium was added. In order to evaluate cell migration into the wound, cells were methanol-fixed and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) at 0, 8, 24 and 48 hours after creating the wound. An average of 10 pictures were taken for each condition and each picture was analyzed using the Image-Pro[®] Plus software (version 5.1, MediaCybernetics[®], Bethesda, MD). To measure the surface of each wound, a filter was first designed to recognize the cell-free surface as a background. A selection box was then created to analyze pictures at different time points and the background surface was subtracted from the total surface of the well.

Chapitre 5.4 Results

We have previously demonstrated that S100A6 is a candidate gene that stratifies 3D models from the monolayer cultures [3]. *In vitro*, the majority of our EOC cell lines express little or no S100A6 protein with the exception of the TOV-21G cell line (Supp. Fig. 1) and

two other cell lines (TOV-81D and TOV-2223G) which are non-aggressive and unable to form tumors *in vivo* [14, 19]. However, we have shown that this protein is over-expressed when the cell lines are cultured as spheroids in hanging droplets and this effect was most significant in the OV-90 cell line (Fig. 1). In order to study the impact of S100A6 inhibition on growth parameters, we designed small interfering oligonucleotides specific for this protein. We first inhibited S100A6 expression in the TOV-21G cell line which expresses high levels of S100A6 when cells are cultured as monolayers. Using two different interfering oligonucleotides (434 et 452) we were able to generate TOV-21G cell lines where S100A6 was partially inhibited in mixed populations of cells as well as individual clones where S100A6 is strongly inhibited (Figure 1B and C). In partially inhibited cell lines S100A6 expression was reduced by half compared to controls (Figure 1C).

Functional assays were then conducted in order to study the impact of S100A6 inhibition in the TOV-21G constitutively expressing cell lines. First, we examined cellular morphology of monolayer cultures where no visible changes could be observed in any cell line (Supp. Figure 2A). When cells were cultured in spheroids, no striking changes in spheroid appearance were observed after four days of culture in hanging droplets (Supp. Figure 2B). However, at day ten, more compact spheroids were observed in cell lines where S100A6 was inhibited when compared to those where its expression was not modulated or partially inhibited (Figure 2A). Cellular proliferation was also significantly lower in strongly inhibited shS100A6 clones when compared to partially inhibited mixed populations and the controls (Figure 2B). We then looked at cellular invasion using matrigel-coated Boyden chambers. S100A6 inhibition did not affect cellular invasion of the TOV-21G cells since there was no difference between S100A6 inhibited cell lines and controls (Figure 2C). However, when cellular motility was assessed in the absence of S100A6, cells migrated significantly faster (Figure 2D). In the constitutively expressing TOV-21G cell lines, total inhibition of S100A6 affects spheroid density, cellular proliferation and cellular migration.

To study the impact of S100A6 inhibition in our OV-90 model cultured as spheroids, shRNAs specific for S100A6 was used to generate OV-90 cell lines where S100A6 expression was also strongly or partially inhibited. As shown in figure 3A, the original OV-90 cell line expressed low levels of S100A6 in monolayer cultures, but over-expressed this protein in the spheroid model. The same was observed in the controls with the exception of LacZ clone 18, which presented a similar pattern and level of expression to that of the shS100A6 clone 19 cell line (Figure 3A) with little variation between the spheroid and monolayer model systems. Both controls and shS100A6 OV-90 cell lines did not present any significant changes in the spheroid formation. A slight tendency toward smaller more compact spheroids was observed in the OV-90 shS100A6 spheroids versus the controls (Figure 3B and C). As expected, when cultured in monolayers, cellular proliferation was not influenced by the presence or absence of S100A6 (Figure 3D). Inhibition of this protein did not affect cellular invasion when cells were cultured as monolayers (Supplementary Figure 3) or spheroids (Figure 3E). Cellular motility of OV-90 cells, cultured as monolayers or spheroids, was subsequently evaluated. As expected, no differences in migration was observed between controls and shS100A6 cell lines in monolayers (Figure 4A left panel). However, when cultured in spheroids, shS100A6 OV-90 cells were significantly less motile (Figure 4A right panel). The effect appeared to be dose dependent since among the controls, the clone LacZ 18 which had a slightly lower expression of S100A6 also showed reduced cellular motility and the shS100A6 clone 19, which exhibited partial S100A6 inhibition showed slightly higher numbers of migrating cells than the other clones that were strongly S100A6 inhibited (Figure 4A right panel). Cellular migration of cells from the spheroid was also assessed by placing spheroids onto an adherent surface. After 48 hours we could observe and measure the area occupied by cells migrating from the edges of the spheroid. Although two (clone 23 and 29) out of three strongly inhibited clones (clone 19 was partially inhibited) demonstrated diminished migration, we can not conclude that there were significant differences between shS100A6 clones and the controls when both the surface and the distance of migrating cells were

measured (Figure 4B). Although most of the cells migrating around the spheroid progressed as a more or less compact monolayer of cells, a few cells would detach from this migrating united front of cells and migrate further from the spheroids (Figure 4 C left panel). Loosely detached cells were not present at the time when spheroids were placed onto the plates and were still absent eight hours later. In the shS100A6 clones, the number of those far migrating cells, 24 hours after the spheroids were replaced onto the plates, was significantly lower than in the controls. Once again the dose dependent effect in the LacZ clone 18 and the shS100A6 clone 19 cells was observed (Figure 4C right panel). Although in our OV-90 cell line S100A6 also affects cellular motility, it seems that the effect in spheroids is opposite of that observed in the TOV-21G monolayer cultures.

Chapitre 5.5 Discussion

S100A6 was first identified when quiescent cells were induced to proliferate suggesting a linkage to the cell cycle [20]. Later on, its role was further extended to actin cytoskeleton and membrane dynamics based on S100A6 interaction with target proteins [21-23]. Recently new studies further extended potential functional roles for S100A6 in regulating β -catenin levels [24], heat shock proteins [5, 25-27] as well as interaction with p53 an important regulator of cell growth and apoptosis [28, 29]. In the past decade, the biological role of S100A6 has been evaluated by over-expressing or inhibiting its expression in different cell lines. Although the modulation of expression affects mostly cell proliferation, cell shape and morphology, cell adhesion and motility the results are conflicting [9-13, 30, 31]. We have previously shown that S100A6 is differentially expressed depending on the model system applied to the cells (2D versus 3D). In this study, we show that the inhibition of S100A6 in EOC cell lines impacts mostly cellular motility however, this could be dependant on the cell environment as the motility is increased in monolayer cultures but decreased when cells are cultured in hanging droplets to form spheroids.

In order to understand S100A6 involvement in the epithelial ovarian cancer, we inhibited its expression in an EOC cell line that over-expresses S100A6 when cultured as a monolayer. We show that in this context partial inhibition of S100A6 was not sufficient to induce clear change in the biological functions studied (Figure 2). However, a drastic reduction in the expression of S100A6 in the EOC TOV-21G cell line affected cellular proliferation and adhesive properties as well as cellular motility. These results corroborate earlier research showing that S100A6 over-expression diminishes cellular motility, anchorage independent growth and correlates with a smaller number of metastases [11]. Other groups have also shown similar results with regards to proliferation [12, 30, 31] and motility [9]. Slomnicki et al. [10] also demonstrated that S100A6 inhibition influenced cellular adhesion. In fact, cells showing inhibited S100A6 expression displayed stronger adhesion to different extracellular matrix proteins. In our study, we show that TOV-21G cells, which normally form only aggregates in hanging droplets, formed more compact aggregates when S100A6 was strongly inhibited (Figure 2). In contrast, other studies showed that inhibition of S100A6 in pancreatic cells resulted in a diminution of cellular motility and invasion [12, 13]. All previous studies were conducted using cells cultured as monolayers. However, we identified S100A6 as a candidate gene that is similarly over-expressed in spheroids and xenografts but not in monolayer cultures [32]. Moreover, even though S100A6 is highly expressed in fibroblasts, epithelial cells [33], and often over-expressed in numerous cancers, only few cell lines are available that over-express this protein (reviewed in [5]). We have previously shown that the majority of EOC over-express this protein, however most of our EOC cell lines cultured as monolayers express little or no S100A6 (Supplementary Fig.1). When the same cell lines were cultured as 3D spheroids in an anchorage independent manner or xenografted in SCID mice, S100A6 was over-expressed [32]. The OV-90 cell line, which demonstrated the greatest fold change in S100A6 expression between monolayer cultures and spheroids, was used to study the impact of S100A6 inhibition on biological functions. As this cell lines does not strongly express S100A6 when cultured as a monolayer, we did not anticipate great changes in

functional studies in monolayer cultures. In fact, no changes were observed between S100A6-inhibited cells and controls when cells were cultured as monolayers. In spheroids, a slight tendency toward smaller more compact spheroids was observed suggesting that the cells could have stronger adhesive properties as in the TOV-21G spheroids. However, the inhibition of S100A6 in spheroids had the greatest impact on cellular motility which was inhibited. This was opposite of that observed for the TOV-21G which was stimulated. Hence, when cells were cultured in a 3D environment, the absence of S100A6 inhibited cellular motility. Through protein interaction studies, many protein targets of S100A6 were identified. Among these are actin binding proteins such as annexins, tropomyosin, caldesmon and calponin [5, 6]. During spheroid formation, changes occur in the cytoskeleton due to cellular re-organization and change in cell shape that are similar to processes observed in tissue morphogenesis [34]. As a result, the impact of S100A6 inhibition may be more accurately evaluated in a 3D dimensional model. A positive correlation between S100A6 expression and tumor metastasis has been previously demonstrated in *in vivo* studies in mice [35]. Positive correlations were also observed for normal versus malignant specimens of colon cancer and benign versus malignant pancreatic cells [36, 37]. Our results using a monolayer model of S100A6 over-expression corroborate earlier *in vitro* studies which are in contrast to what has been observed *in vivo*. However, the impact of S100A6 inhibition in a spheroid model that is an intermediate between *in vivo* tumors and *in vitro* monolayer cultures more accurately reflects the role of this protein *in vivo*. With a positive correlation between metastasis and S100A6 expression one would speculate that S100A6 inhibition would negatively affect processes of cellular invasion and motility. Using monolayer models, the majority of previous studies including our own showed the opposite as cellular motility was stimulated by the inhibition of S100A6. We have previously shown that growing cells under non-adherent conditions stimulates S100A6 expression [5]. Here we show that S100A6 inhibition is more physiologically relevant in this model.

Developing a S100A6 knock-out mouse would greatly help to study and understand the biological function of this protein. Since S100A6 is implicated in more than just the regulation of actin cytoskeleton and has many different target proteins, it will be very interesting to observe the phenotype associated with its loss on a systemic level.

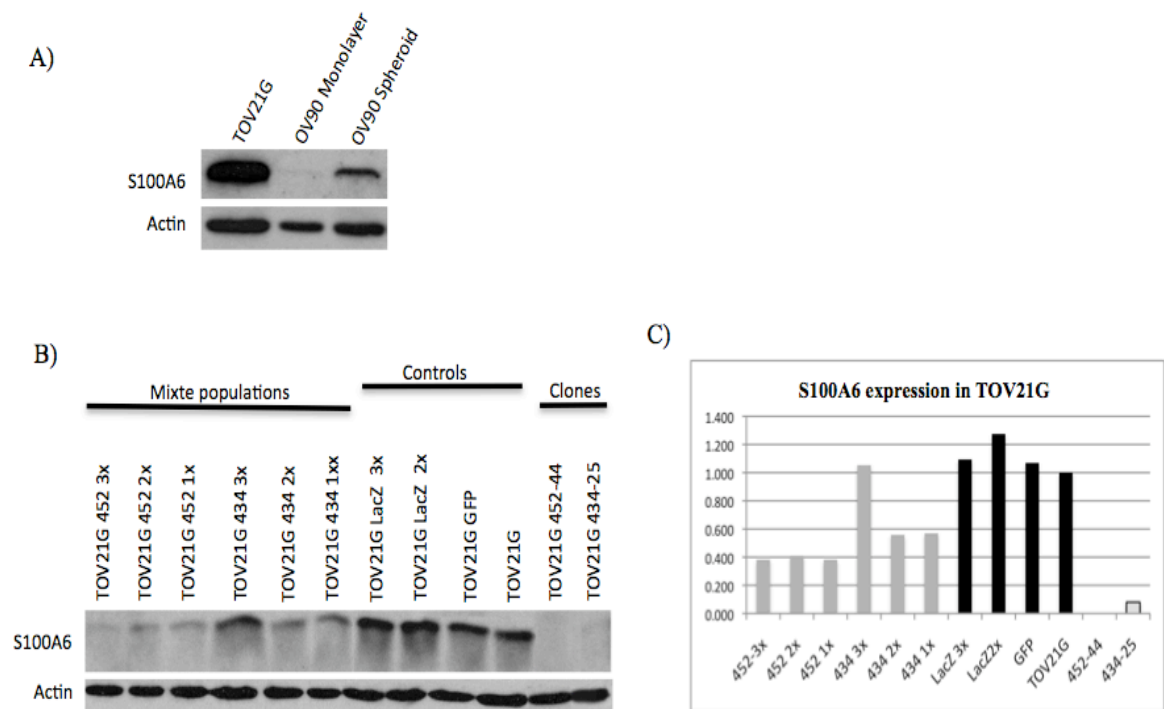


Figure 1. S100A6 expression in model systems of EOC.

A) Differential S100A6 expression verified using Western blotting in EOC model systems. TOV-21G cell line expressing high levels of S100A6 while OV-90 does not express S100A6 as a monolayer but over-expresses it when cultured in 3D. B) Knockdown of S100A6 using shRNA in the TOV-21G cell line. shLacZ and a GFP transfected lines (mixed populations) were used as controls. Partial inhibition of S100A6 expression was achieved in mixed populations and clones were derived to select for total inhibition. Densitometry analysis of the western blot is shown in the right panel. Actin was used as a loading control.

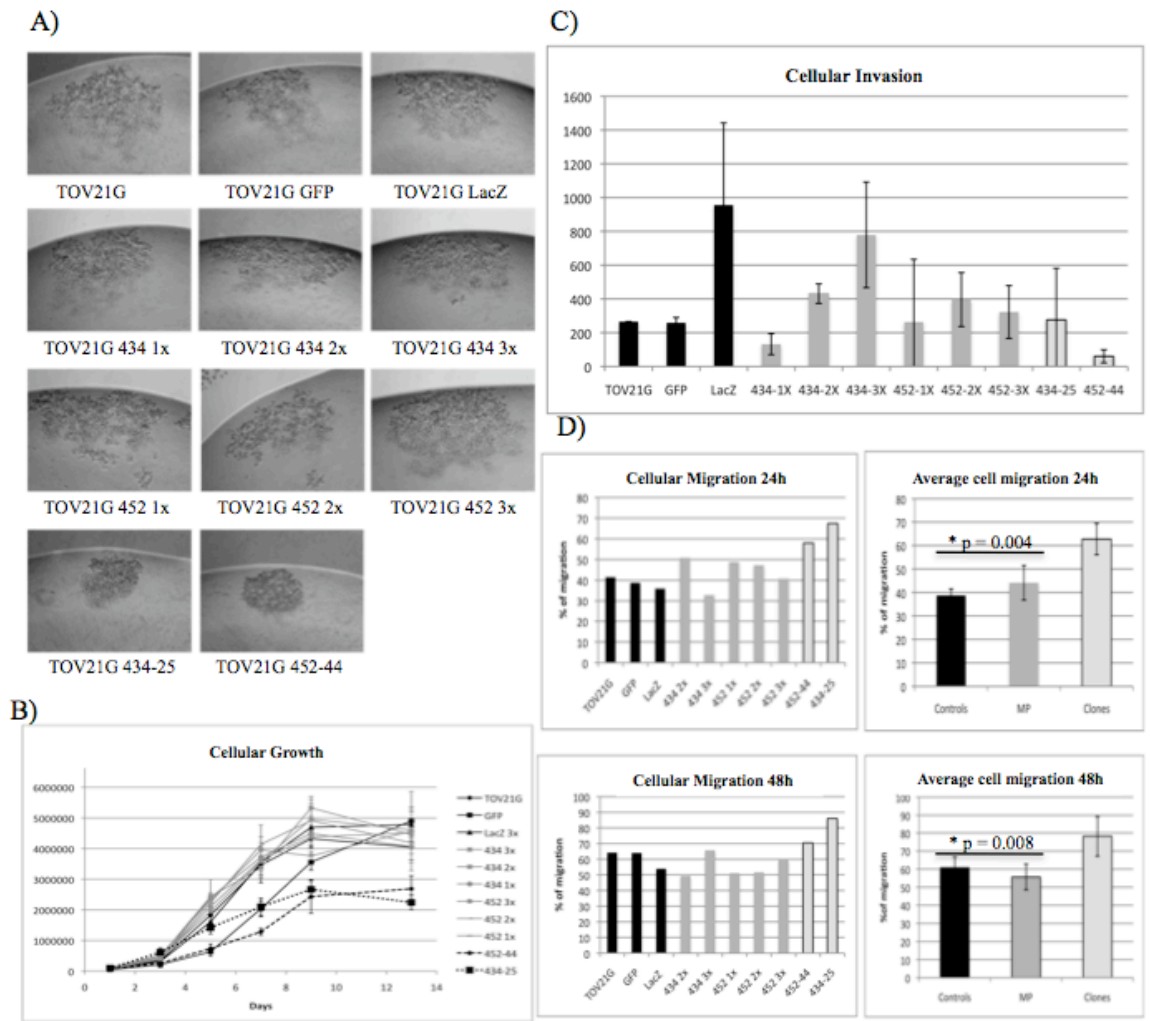


Figure 2.

Figure 2. Functional studies of the impact of S100A6 inhibition in the TOV-21G cell line.

A) Spheroid formation in hanging droplets 10 days after seeding. Spheroids cultivated from cell line clones inhibited for S100A6 form more compact spheroids. B) Growth curves of control and shS100A6 TOV-21G cell lines. 1×10^5 cells were plated into six-well plates. Cells were trypsinized and counted every 48h for 13 days. Two separate experiments were performed in triplicate. C) Invasion assay using modified Boyden chambers. The capability of the cells to invade through matrigel membranes was verified and the invasion potential did not vary significantly between the controls and shS100A6 cell lines. The experiments were performed in duplicate. D) Wound-healing assay was performed to verify cellular motility. Cells were plated into a six-well dish and at near confluence, wounds were generated. Cells were methanol-fixed and stained with Giemsa at different time points in order to evaluate cell migration (24h and 48h after the scratch was performed). The experiments were performed in triplicate. A significant difference was noted between controls and sh100A6 cell lines. Right panels represent average values of the three groups (controls, partially inhibited mixed population and totally inhibited clones). The p value for 24h = 0.0036 and the p value for 48h = 0.008.

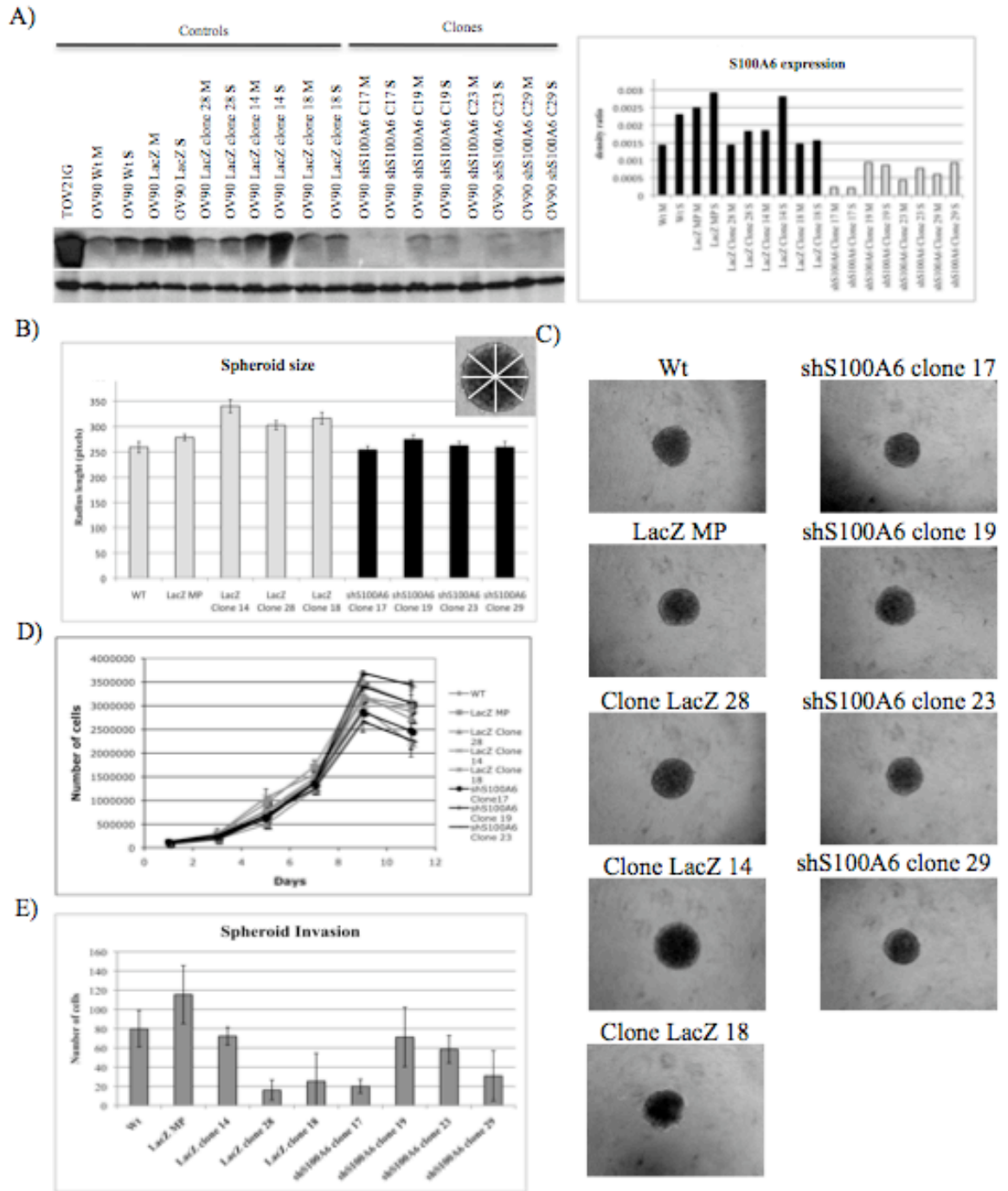


Figure 3.

Figure 3. S100A6 inhibition in the OV-90 cell line.

A) Western blot analysis of S100A6 expression in both controls (WT: wild type, shLacZ mixed populations and individual clones as well as shS100A6 clones). Expression was verified in both monolayer cultures (M) as well as spheroids (S). In controls, clear over-expression in spheroids compared to monolayer cultures was observed in all cell lines except LacZ clone 18 (slight over-expression). S100A6 was significantly inhibited using shRNA in all clones except clone 19 where only partial inhibition was observed. Actin was used as loading control. Right panel shows densitometry analysis of the western blot. B) Spheroid size was measured using Image-Pro[®] Plus software. Insert shows the star pattern that was used to measure spheroid diameter. For each cell line, eight spheroids were measured and the experiment performed twice. C) Spheroid formation in hanging droplet. All spheroids were of comparable size and density. D) Growth curves of control and shS100A6 OV-90 cell lines. 1×10^5 cells were plated onto six well plates. Cells were trypsinized and counted every 48h for 11 days. Two separate experiments were performed in triplicate. No significant change in growth rates was observed. D) Invasion assay using modified Boyden chambers. The capability of the cells cultured as spheroids to invade through matrigel membranes was verified and the invasion potential did not vary significantly between the controls and shS100A6 cell lines. The experiments were performed twice with eight spheroids each time.

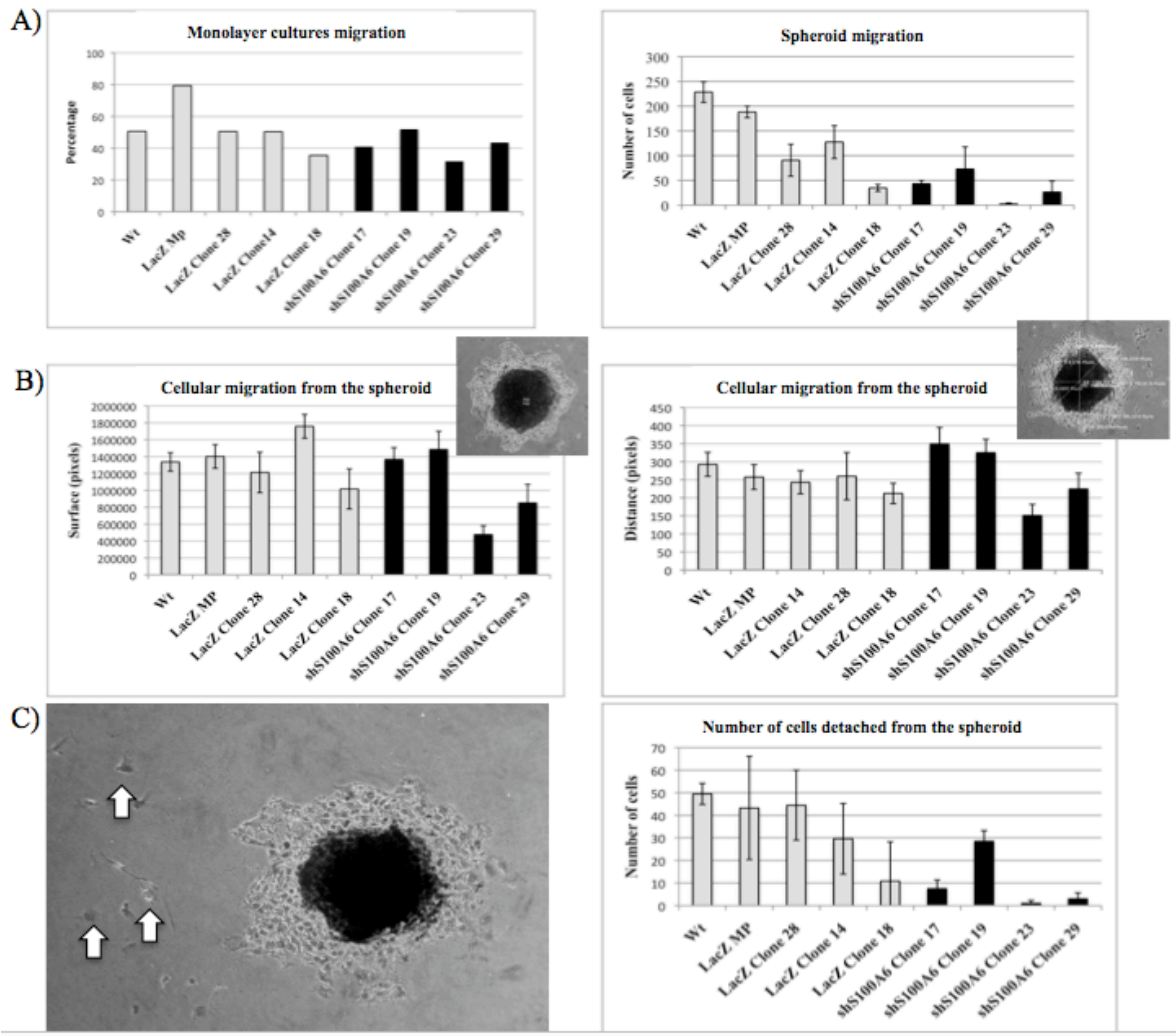


Figure 4.

Figure 4. Cellular motility assays for OV-90 cell lines.

A) Cellular motility was examined using the wound-healing assay for monolayer cultures (left panel) and the modified Boyden chambers for cells cultured as spheroids. No significant difference was observed for the monolayer cultures. Cellular motility was inhibited when shS100A6 OV-90 cell lines were cultured as spheroids in hanging droplets. Two separate experiments were performed in triplicate for wound-healing assays and twice using eight spheroids each time for the modified Boyden chamber assays. B) Cellular motility from the edge of the spheroids was assayed by replating spheroids in 48 well plates and measuring the distance of migrating cells around the spheroids. Left panel shows the surface occupied by the cells around the spheroid that was measured using Image-Pro® Plus software and the right panel shows the distance measured from the edge of the spheroids. C) When spheroids were placed into 48 well plates, individual cells detached from the spheroids to migrate separately of the migrating front of cells around the spheroid (left panel arrows). The number of these cells was lower for the shS100A6 OV-90 clones than the controls. Both Clone 19 and the shLacZ clone 18 control show partial S100A6 inhibition. The number of individual migrating cells is similar for these two clones.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Luke Masson and Dr. Cécile Le Page for critical reading of this manuscript. We would like to thank Dr. Éric Campeau for providing us with the recombination vector for our lentivirus infections. This work was supported by a strategic initiative grant from the Cancer Research Society, and a grant from the Canadian Institutes of Health Research to A.-M.M.-M, D.P and P.T. M.Z and J.L were supported by the Canderel fund of the Institut du Cancer de Montréal.

Chapitre 5.6 Bibliography

1. Colombo, N., et al., Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006. 60(2): p. 159-79.
2. Tonin, P.N., et al., Microarray analysis of gene expression mirrors the biology of an ovarian cancer model. *Oncogene*, 2001. 20(45): p. 6617-26.
3. Zietarska, M., et al., Molecular description of a 3D *in vitro* model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog*, 2007 Oct;46(10):872-85.
4. Sutherland, R.M., Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*, 1988. 240(4849): p. 177-84.
5. Filipek, A., W. Michowski, and J. Kuznicki, Involvement of S100A6 (calcyclin) and its binding partners in intracellular signaling pathways. *Adv Enzyme Regul*, 2008. 48: p. 225-39.
6. Lesniak, W., L.P. Slomnicki, and A. Filipek, S100A6 - new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 390(4): p. 1087-92.
7. Emberley, E.D., L.C. Murphy, and P.H. Watson, S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. *Biochem Cell Biol*, 2004. 82(4): p. 508-15.
8. Marenholz, I., C.W. Heizmann, and G. Fritz, S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 322(4): p. 1111-22.
9. Luo, X., et al., S100A6 expression and function in human osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. 466(9): p. 2060-70.
10. Slomnicki, L.P. and W. Lesniak, S100A6 (calcyclin) deficiency induces senescence-like changes in cell cycle, morphology and functional characteristics of mouse NIH 3T3 fibroblasts. *J Cell Biochem*. 109(3): p. 576-84.
11. Luu, H.H., et al., Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma. *Cancer Lett*, 2005. 229(1): p. 135-48.
12. Ohuchida, K., et al., The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinical implication as a diagnostic marker and therapeutic target. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(21): p. 7785-93.
13. Nedjadi, T., et al., S100A6 binds to annexin 2 in pancreatic cancer cells and promotes pancreatic cancer cell motility. *Br J Cancer*, 2009. 101(7): p. 1145-54.
14. Provencher, D.M., et al., Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000. 36(6): p. 357-61.

15. Campeau, E., et al., A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One*, 2009. 4(8): p. e6529.
16. Bossolasco, M., et al., Human TDE1, a TDE1/TMS family member, inhibits apoptosis *in vitro* and stimulates *in vivo* tumorigenesis. *Oncogene*, 2006. 25(33): p. 4549-58.
17. Shigeta, M., et al., CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol*, 2003. 163(1): p. 165-76.
18. Ronot, X., A. Doisy, and P. Tracqui, Quantitative study of dynamic behavior of cell monolayers during *in vitro* wound healing by optical flow analysis. *Cytometry*, 2000. 41(1): p. 19-30.
19. Ouellet, V., et al., Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 152.
20. Hirschhorn, R.R., et al., Cell-cycle-specific cDNAs from mammalian cells temperature sensitive for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(19): p. 6004-8.
21. Filipek, A., et al., Characterization of the cell-cycle-regulated protein calcyclin from Ehrlich ascites tumor cells. Identification of two binding proteins obtained by Ca²⁺(+)-dependent affinity chromatography. *Eur J Biochem*, 1991. 195(3): p. 795-800.
22. Tokumitsu, H., R. Kobayashi, and H. Hidaka, A calcium-binding protein from rabbit lung cytosol identified as the product of growth-regulated gene (2A9) and its binding proteins. *Arch Biochem Biophys*, 1991. 288(1): p. 202-7.
23. Filipek, A., et al., Characterization of chicken gizzard calcyclin and examination of its interaction with caldesmon. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1996. 113(4): p. 745-52.
24. Filipek, A. and J. Kuznicki, Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin. *J Neurochem*, 1998. 70(5): p. 1793-8.
25. Nowotny, M., et al., Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (calcyclin) and other S100 proteins. *J Biol Chem*, 2003. 278(29): p. 26923-8.
26. Sbroggio, M., et al., The mammalian CHORD-containing protein melusin is a stress response protein interacting with Hsp90 and Sgt1. *FEBS Lett*, 2008. 582(13): p. 1788-94.
27. Shimamoto, S., et al., Interactions of S100A2 and S100A6 with the tetratricopeptide repeat proteins, Hsp90/Hsp70-organizing protein and kinesin light chain. *J Biol Chem*, 2008. 283(42): p. 28246-58.

28. Fernandez-Fernandez, M.R., T.J. Rutherford, and A.R. Fersht, Members of the S100 family bind p53 in two distinct ways. *Protein Sci*, 2008. 17(10): p. 1663-70.
29. Slomnicki, L.P., B. Nawrot, and W. Lesniak, S100A6 binds p53 and affects its activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. 41(4): p. 784-90.
30. Breen, E.C. and K. Tang, Calcyclin (S100A6) regulates pulmonary fibroblast proliferation, morphology, and cytoskeletal organization *in vitro*. *J Cell Biochem*, 2003. 88(4): p. 848-54.
31. Hwang, R., et al., Calcyclin, a Ca²⁺ ion-binding protein, contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 21239-47.
32. Zietarska, M., et al., Molecular description of a 3D *in vitro* model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Mol Carcinog*, 2007. 46(10): p. 872-85.
33. Kuznicki, J., et al., Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. *Exp Cell Res*, 1992. 200(2): p. 425-30.
34. Tzanakakis, E.S., L.K. Hansen, and W.S. Hu, The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2001. 48(3): p. 175-89.
35. Weterman, M.A., et al., Expression of calcyclin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice. *Cancer Res*, 1992. 52(5): p. 1291-6.
36. Komatsu, K., et al., Increased expression of S100A6 (Calcyclin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(1): p. 172-7.
37. Vimalachandran, D., et al., High nuclear S100A6 (Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients. *Cancer Res*, 2005. 65(8): p. 3218-25.

Chapitre 6. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines.

Véronique Ouellet¹†, Magdalena Zietarska¹†, Lise Portelance¹, Julie Lafontaine¹, Jason Madore¹, Marie-Line Puiffe¹, Suzanna L. Arcand², Zhen Shen², Josée Hébert^{3,4}, Patricia N. Tonin^{2,5,6}, Diane M. Provencher^{1,4,7}, Anne-Marie Mes-Masson^{1,4,*}.

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)/ Institut du cancer de Montréal, Montreal, Canada; ²The Research Institute of McGill University Health Centre, Montreal, Canada; ³Leukemia Cell Bank of Quebec and Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada; ⁴Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. ⁵Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada; ⁶Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada; ⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Gynecologic Oncology, Université de Montréal, Montreal, Canada;

† **In alphabetical order authors that have contributed equally to this work.**

Article publié dans : BMC Cancer. 2008 May 28;8:152.

Contribution des auteurs :

L'élaboration du projet, la majorité des travaux présentés dans cet article et la rédaction ont été réalisées par les deux premiers auteurs. Tous les auteurs ont contribué au manuscrit. Portelance L, a dérivé les lignées à partir de tissus tumoraux. Lafontaine J, a effectué les analyses d'immunobuvardage. Madore J, a effectué les expériences d'immunohistochimie sur les échantillons tumoraux. Puiffe ML a participé aux expériences d'invasion. Arcand SL et Shen Z ont effectué les analyses de mutations. Hébert J a analysé les essaies SKY et G-banding. Tonin PN, Provencher DM et Mes-Masson AM ont participé à l'écriture du manuscrit à son approbation finale.

Chapitre 6.1 Abstract

Background : Cell lines constitute a powerful model to study cancer, and here we describe three new epithelial ovarian cancer (EOC) cell lines derived from poorly differentiated serous solid tumors (TOV-1946, and TOV-2223G), as well as the matched ascites for one case (OV-1946).

Methods : In addition to growth parameters, the cell lines were characterized for anchorage independent growth, migration and invasion potential, ability to form spheroids and xenografts in SCID mice.

Results : While all cell lines were capable of anchorage independent growth, only the TOV-1946 and OV-1946 cell lines were able to form spheroid and produce tumors. Profiling of keratins, p53 and Her2 protein expression was assessed by immunohistochemistry and western blot analyses. Somatic *TP53* mutations were found in all cell lines, with TOV-1946 and OV-1946 harboring the same mutation, and none harbored the commonly observed somatic mutations in *BRAF*, *KRAS* or germline *BRCA1/2* mutations found to recur in the French Canadian population. Conventional cytogenetics and spectral karyotype (SKY) analyses revealed complex karyotypes often observed in ovarian disease.

Conclusions : This is the first report of the establishment of matched EOC cell lines derived from both solid tumor and ascites of the same patient.

Keywords: epithelial ovarian cancer, serous tumors, cell line, immunohistochemistry, mutation analysis, tumorigenicity assays, SKY

Chapitre 6.2 Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) is often described as the silent killer or the disease that whispers mainly due to absence of symptoms. This combined with the lack of specific/sensitive markers and/or techniques of screening leads to the diagnosis at late stages of the disease in more than 70% of patients. Unfortunately, the five year survival rate at this point of the disease is less than 30% [1]. Although EOC is not the most prevalent of cancers, it accounts for the highest number of deaths from a gynecologic malignancy.

EOC is a complex disease stratified according to histopathological and morphological criteria. The majority of EOCs are thought to arise from the ovarian surface epithelium (OSE) that is derived from the coelomic epithelium. OSE is composed of multipotent cells that can differentiate and give rise to tumors of different histopathology types [1, 2]. The latter are defined by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) [3] and represent serous, endometrioid, mucinous, clear cell, de Brenner, mixed and undifferentiated subtypes. Serous type tumors are the most common subtype of EOC identified in more than 50% of cases. EOC tumors are graded according to the degree of differentiation of tumor cells which can vary from well (grade 1), moderately (grade 2) or poorly (grade 3) differentiated cells. Finally, EOC tumors are also classified according to the spread of the disease varying from stage I when tumors are confined to the ovaries to stage IV when distant metastases are observed.

Over the past years several laboratories, including ours [4], have established and characterized cell lines derived from EOC tumors. However, the majority of these EOC cell lines were established from patients ascites [4-29] and only few were derived from solid tumors [4, 12, 30-37]. Moreover, EOC cell lines have rarely been derived from chemotherapy-naive patients while others were established following viral transformation (SV40 Large T antigen) (such as NMSO cell line) [38, 39] or xenograft passage in immunocompromised mice (such as the HEY, HO-8910PM, and AMOC-2 cell lines) [10, 40, 41]. In addition, few cell lines derived from serous EOC tumors are available even

though this subtype represents the most frequently occurring histopathology subtype (such as the TOV-81D, FU-OV-1, and HOC1-7 cell lines) [4, 10, 11, 33, 35].

In this study, we describe three new serous EOC cell lines that were derived in our laboratory from either solid tumors or ascites of two chemotherapy-naïve patients. This is the first report characterizing cell lines derived from both solid tumor and ascites of the same patient. Moreover, the molecular and growth characteristics of the three cell lines present some unique features thereby providing the research community with new tools in the study of different aspects of serous EOC.

Chapitre 6.3 Material and Method

Chapitre 6.3.1 Sample and Patient data

Tumor samples were collected and banked following surgeries performed within the Division of Gynecologic Oncology at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). Appropriate consent from the patients was obtained prior to sample collection according to the CHUM institutional ethics committee recommendation. Stage was determined at the time of surgery. Histopathology and tumor grade were assigned by a pathologist according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria [3].

Chapitre 6.3.2 Establishment of the cell lines and culture conditions

All primary cultures and cell lines were cultured in OSE medium (Wisent, Qc, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2.5 µg/ml amphotericin B and 50 µg/ml gentamicin. Cells were incubated in 5% CO₂ and 5% O₂.

The TOV-1946 cell line was established using the previously described scrape method on tumor tissue from patient 1946 [42, 43]. Briefly, tumor tissue was gently scraped into a 100 mm petri dish containing supplemented OSE medium. TOV-1946 cells were maintained in the same petri dish for the first 40 days and medium was replaced weekly. After 40 days, 80% confluence was attained and TOV-1946 cells were divided into two petri dishes. They were then divided in a proportion of 2:3 once a week for the first 15 passages and 1:2 twice a week thereafter until passage 70. Subsequently, cells were maintained and divided in a proportion of 1:5 twice a week.

The OV-1946 cell line was established from a mass of cells from the ascites of patient 1946. The mass was macro-dissected into small pieces, which were kept in a 100mm petri dish for 27 days at which point adherent cells reached 80% confluence. Pieces of tissue were then discarded. Cells were divided in a proportion of 2:3 every week for the first 15 passages and then 1:2 twice a week until passage 70. Cells were then maintained and divided in a proportion of 1:5 twice a week.

The TOV-2223 cell line was established from patient 2223 tumor tissue using the collagenase method. Briefly, tumor tissue was macro-dissected onto a 100 mm petri dish containing serum free OSE medium supplemented with 1000U of collagenase (Sigma-Aldrich, ON, Canada). After 3-4 hours at 37°C, cells were resuspended into 8 ml of medium and the remaining tumor tissue pieces were discarded. The medium containing cells was then divided into four 60 mm petri dishes and 10% FBS was added. Cells were divided 1:2 once a week until passage 19 and then twice a week until passage 70. Subsequently, cells were maintained and divided in a proportion of 1:3 twice a week.

Chapitre 6.3.3 Antibodies

For immunohistochemistry and western blot analyses, the following antibodies were used: beta actin AC-15 (ab6276 from Abcam inc. MA, USA), p53 (D0-1) (sc-126 from

Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-c-ErbB2/c-Neu (OP15, Calbiochem, ON, Canada), Keratin 19 Ab-1 (Ms198-P0, Lab Vision Corp., CA, USA), Keratin 7 Ab-2 (MS-1352-P0) and Keratin 8 Ab-4 (MS-997-P0, both from NeoMarker, Medicorp, Qc, Canada).

Chapitre 6.3.4 Immunohistochemistry

Formalin fixed paraffin embedded tumors were sectioned at 4 μm and the slides were stained using the immunoperoxidase method. Briefly, tissue sections were heated at 60°C for 30 minutes, deparaffinized in toluene and rehydrated in an ethanol gradient. Slides were submerged in boiling citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0) and microwaved for 10 min to unmask antigens. A 3% H_2O_2 treatment was used to eliminate endogenous peroxidase activity. The sections were blocked with a protein blocking serum-free reagent (DakoCytomation Inc., ON, Canada) and incubated with different antibodies for 60 min at room temperature.

The optimal concentration for each primary antibody was determined by serial dilutions. Tissues were incubated with either a secondary biotinylated antibody (DakoCytomation Inc., ON, Canada) or a rabbit anti-goat biotin-conjugated antibody (1:300) (sc-2774, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 20 min followed by incubation with a streptavidin-peroxidase complex (DakoCytomation Inc., On, Canada) for 20 min at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing 0.3% H_2O_2 as a peroxidase substrate. Nuclei were counterstained with hematoxylin and all sections were observed by light microscopy at 400X magnification. Substitution of the primary antibody with phosphate buffered saline served as a negative control.

Chapitre 6.3.5 Growth rate

Growth rates were assessed as previously described [4]. On day 0, 1×10^5 cells were seeded onto 60mm petri dishes. On day 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 the cells were trypsinized, resuspended in medium and counted using a hemacytometer. Each experiment was performed in triplicate for each harvest and repeated once. Saturation density was defined as the mean maximum number of cells at confluence counted from two independent experiments performed with triplicates and the doubling time was calculated according to the slope of the linear portion of the growth curve.

Chapitre 6.3.5 Anchorage independent growth in soft agarose and three-dimensional culture

Cell lines were assayed for their ability to grow in anchorage independent conditions by culturing 1×10^4 cells in agarose (0.33g/100ml OSE complete medium for the upper layer and 0.66g/100ml OSE complete medium for the base layer) [43]. Cells were cultured in soft agar for three weeks, colonies were photographed and these were used for counting. Two independent experiments performed in duplicate.

Cell lines were tested for their ability to form three-dimensional aggregates or spheroids as previously described [44, 45]. Briefly, 4000 cells were suspended in 15 μ l of OSE complete medium. The droplets of medium containing cells are then placed on the cover of non-coated plastic tissue culture plate. The cover is placed on a dish containing 10 ml of PBS to prevent dehydration of the droplets. The ability to form spheroids was assessed after four days.

Chapitre 6.3.6 Low serum growth

Tumor cell growth in low serum conditions was assessed by plating cells in six well plates in OSE medium supplemented of 1% FBS, 2.5 µg/ml amphotericin B and 50 µg/ml gentamicin and cultured for 21 days. The medium was changed every seven days. The experiments were performed in duplicate.

Chapitre 6.3.7 Wound-healing assay

Migration potential was evaluated using the scratch assay method as previously described [46-48]. Briefly, cells were plated onto a 12-well dish and once the cell confluence reached about 90%, wounds were created using a 200 µl plastic tip. In order to evaluate cell migration into the wound, cells were methanol-fixed and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) at 0, 8, 24 and 48 hours after creating the wound. The experiments were performed twice in triplicate.

Chapitre 6.3.8 *In vitro* invasion assay

Cellular invasion was assayed by the ability of cells to invade a synthetic basement membrane (Matrigel, Becton-Dickenson, NJ, USA) using Boyden chambers. Polycarbonate membranes (8 µm pore size) of the upper compartment of transwell culture chambers were coated with 0.4 µg/ml Matrigel. Ovarian cancer cells were trypsinized and resuspended in OSE medium supplemented with 1% FBS. The cell suspension (2×10^4 cells/well) was placed in the upper compartment of the Boyden chamber, and the lower compartment was filled with OSE medium with 5% FBS. Cells were incubated at 37°C for 24 hours. Following incubation, membranes were methanol-fixed and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA). Non-invading cells were removed with a cotton swab, while

invading cells on the underside of the membrane were counted using an inverted microscope. The experiments were performed in duplicate.

Chapitre 6.3.9 *In vivo* growth in SCID mice

The tumorigenic potential of cell lines was assessed based on their ability to form tumors in 45 day-old female SCID mice at subcutaneous (s.c.) left gluteal or intraperitoneal (i.p.) injection sites. Each mouse was injected with 5×10^6 cells suspended in phosphate buffered saline (PBS). The animals were housed under sterile conditions in a laminar flow environment with ad-lib access to food and water. Tumor formation was assessed over 180 days. Animals 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.

Chapitre 6.3.10 Mutation analyses

TP53 mutations were detected by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of cell line DNA. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify exons 5-9 of TP53 as previously described [49]. Mutations were detected as band shift relative to the wild-type pattern, and confirmed by sequence analysis (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada). If negative by the SSCP assay, samples were sequenced for exons 2-11 (translated region), as previously described [50]. KRAS was investigated by sequencing genomic regions corresponding to codons 12 and 13 as previously described [51]. Microsatellite instability (MSI) was established as previously described [4].

BRAF exons 11 and 15 were analyzed by SSCP analysis. PCR was performed in a 12.5 μ l volume containing 200 ng of genomic DNA; 1.25 μ Ci of [35 S]dATP (Perkin-

Elmer, ON, Canada); 1X PCR buffer (Invitrogen, ON, Canada); 2.5 nmol each dCTP, dGTP and dTTP; 0.3 nmol dATP; 1.5 mM MgCl₂; 15 pmol of each primer [52]; and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, ON, Canada). The PCR conditions were 3 min at 95°C, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. The reaction products were diluted 2:3 with stop buffer (90% formamide, 10 mM EDTA, 10% bromophenol blue and 10% xylene cyanol) and heated at 95°C for 10 min before loading on a 0.5X MDE (Mandel Scientific, ON, Canada) non-denaturing gel. The products were electrophoresed at 25 W at 4°C for 6 h. Gels were dried at 80°C and autoradiographed at room temperature for 2-3 days on Kodak Biomax MR film (Perkin-Elmer, ON, Canada). Mutations were detected as band shift relative to the wild-type pattern, and confirmed by sequence analysis (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre).

The common French Canadian founder mutations 4446C>T and 2953delGTainsC in BRCA1 and 8765delAG, 6085G>T and 3398delAAAAG in BRCA2 were investigated in DNA from patient matched peripheral blood lymphocytes as described [53, 54].

Chapitre 6.3.11 Conventional cytogenetics and Spectral Karyotyping (SKY) of the cell lines

Metaphase preparation and cytogenetic analyses with a trypsin-Giemsa banding technique of the TOV-2223, TOV-1946 and OV-1946 ovarian cancer cell lines were performed according to standard cytogenetic procedures. Clonal chromosomal abnormalities and GTG-banded karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [55]. Metaphase cells from the same culture passage were used for standard and spectral karyotyping of each ovarian cancer cell line. Slide pretreatment, hybridization with the SkyPaint™ human probes and detection were performed with the protocol provided by Applied Spectral Imaging (ASI, <http://www.spectral-imaging.com/>) with minor modifications. Spectral images were acquired with a SpectraCube® system

(ASI) mounted on a Zeiss Axioplan II microscope and analyzed using the SkyView version 1.6.1 software (ASI).

Chapitre 6.4 Results

Chapitre 6.4.1 Primary culture, cell line and tumor tissue phenotype

Cell lines were derived from both solid tumors (TOV-1946 and TOV-2223G) and ascites (OV-1946) of two chemotherapy naive patients. Patients 1946 and 2223 from which the cell lines were derived both presented poorly differentiated (grade 3) serous papillary cystadenocarcinoma at stage IIIC. Based on residual tumor present following surgery, both patients were considered to be suboptimally debulked. Patient 2223 received a palliative treatment only and survived for 18 months while patient 1946 died from post-operative complications. Patient 1946 did not have any known familial history of cancer. However, two sisters of patient 2223 were diagnosed with ovarian cancer (70 and 80 years old) and numerous colon cancers were diagnosed within the family. Clinical data for both patients are summarized in Table 1.

At initial passage all three cell lines appeared more (TOV-1946 and TOV-2223) or less (OV-1946) heterogenous with populations of cells with obvious fibroblastic contaminants (Figure 1A, C, E). With subsequent passages, a selection toward a more homogenous population of cells occurred and cell lines presented a cobblestone morphology characteristic of epithelial cells (Figure 1B, D, F).

Hematoxylin-Eosin stained tumor tissue sections of patient 1946 and 2223 (Figure 1G and 1H, respectively) presented typical poorly differentiated tumor masses. While all cell lines exhibited similar cobblestone morphologies typical of epithelial cells, the TOV-2223 cells are larger than the TOV-1946 and OV-1946 cells (Figure B, D, F). This reflects morphological differences in the corresponding tumor tissues where cells in the TOV-2223 tumors were larger than those observed in the 1946 tumor (Figure 1G,H).

One of the hallmarks of cancer cells is their ability to grow in the absence of exogenous growth factors, which can be verified by culturing cancer cells in low serum conditions. All cell lines were able to grow in a medium containing only 1% of FBS. In general however, growth rates were slower in low serum conditions than those observed in a typical 10% FBS environments (data not shown).

Chapitre 6.4.2 Solid tumor and cell line expression of keratins, TP53 and HER2

In order to further establish the epithelial characteristics of our cell lines, keratin expression was assessed. Both TOV-1946 and OV-1946 cell lines expressed Krt7 and hence mirror keratin expression observed *in vivo* in the original tumor (Figure 2A and 2I). However, the TOV-1946 cell line expressed a much higher level of this keratin when compared to its ascites counterpart (Figure 2I). As reflected by immunohistochemistry and western blot analyses, although TOV-2223 tumor tissue expressed Krt7, the corresponding cell line seems to have lost the capacity to express this particular keratin (Figure 2E and 2I). The epithelial characteristics of the cell lines were also verified by the expression of Krt18 and Krt8, which are also markers of epithelial cells. The expression of these keratins was observed only in the TOV-2223 cell line (Figure 2I). The gastro-intestinal tract tumor marker Krt20 was absent in both tumor tissues and all cell lines (Figure 2B and 2F).

We assessed the expression of p53 and Her2 in both original tumor tissues and cell lines. Tumor tissues from both patients exhibited Her2 expression (Figure 2C and 2G), however the level of expression was stronger in the TOV-2223 tumor tissue (Figure 2G). This is concordant with Her2 expression in the cell lines by western blot analysis (Figure 2I). We also examined p53 expression by immunohistochemistry. Positive staining with the p53 antigen is often indicative of TP53 gene mutation. The tissue from patient 1946 exhibited positive nuclear staining for p53 (Figure 2D) in contrast to that observed with the

tumor from the patient 2223 (Figure 2H). p53 positive immunoreactivity was mirrored in the cell lines by western blot (Figure 2I).

Chapitre 6.4.3 Cell growth rate and tumorigenicity assays

The growth characteristics of the new cell lines were also assessed (Table 2 and Figure 3) and compared to TOV-112D, a cell line previously established and characterized in our laboratory [4]. The new EOC cell lines exhibited slower growth rates than the very aggressive TOV-112D reference cell line (Table 2 and Figure 3A). TOV-1946 has the shortest doubling time (1.3 days) when compared to the other two new cell lines (2.5 and 2.6 days for OV-1946 and TOV-2223 respectively). All cell lines exhibited similar saturation density although inferior (almost half) to that of TOV-112D. These results are consistent with the observation that TOV-112D exhibited small cells with a tendency to compact and form foci [4] as opposed to 1946 and 2223 cell lines which respectively show cells of medium and large size. The capacity of the new cell lines to form foci at high cell inocula and density was also verified and confirmed. The cell lines described here exhibit all the qualities of an established immortalized cell lines as they were all kept in culture for more than 150 passages.

To further characterize the new cell lines, the migration potential was assessed (Table 2 and Figure 3B). TOV-1946 cells migrated faster than the other three cell lines, as they were able to close the wound in 24 hours. The migration patterns of TOV-112D and OV-1946 were similar and filled the wound in 48 hours. However, TOV-2223 migrated more slowly and needed more than 48 hours to close the wound.

Using the modified Boyden chambers, we then measured the capability of the cells to invade through matrigel membranes (Table 2 and Figure 3C). We noted an increase in invasion potential from TOV-112D, OV-1946, TOV-2223 and TOV-1946, where TOV-112D was the least invasive and TOV-1946 the most invasive.

We next monitored the capacity of the cells to form three-dimensional structures in hanging droplets, a method routinely used in our laboratory. Only TOV-112D cells were able to form very compact spheroids, OV-1946 formed less compact spheroids, TOV-1946 cells formed loose aggregates of cells. The TOV-2223 cells were unable to form any aggregates and cells were individually spread across the droplet (Table 2 and Figure 3D).

We next measured the capability of the cell lines to grow in an anchorage independent environment by culturing the cells in soft agarose (Table 2). All cell lines were able to form colonies in soft agarose. The size of the colonies were similar for TOV-112D, TOV-1946 and OV-1946 but were larger than TOV-2223. The number of colonies increased from TOV-1946, TOV-2223, OV-1946 and TOV-112D with TOV-1946 having the lowest number of colonies and TOV112D the highest.

Finally, we monitored the potential of *in vivo* growth by injecting tumor cells at intraperitoneal or subcutaneous sites in SCID mice (Table 2). Subcutaneous tumors were observed only for the TOV-112D cell line. However, intraperitoneal (IP) tumors were also observed for the TOV1946 and OV1946 cell lines. The TOV-1946 cell line formed tumors in only 3 mice and only after an average of 125 days. The OV-1946 cell line formed tumors more rapidly (average 63 days) and a greater number of tumors (5 mice). The TOV2223 cell lines did not form tumors in mice (Table 2) however one mouse showed very small masses on liver lobes when all mice were sacrificed at approximately seven months post-injection (data not shown).

Chapitre 6.4.4. Mutation status of the new EOC cell lines

In order to further characterize the cell lines, we performed somatic mutation analysis of TP53, KRAS, and BRAF as well as assayed for evidence of microsatellite instability (Table 3). Germline mutation (BRCA1 and BRCA2) analysis was limited to the recurrent mutations found in women of French-Canadian descent as cell lines were derived

from patients of this ancestral origin [53]. Sequence variations in TP53 were identified in the DNA from all three EOC cell lines (Table 3). The same variant in exon 8, which is expected to confer an amino acid substitution of arginine to cysteine at codon 273, was identified in both TOV-1946 and OV-1946. The TP53 sequence variants are classified as deleterious mutations in the IARC TP53 mutation database (www-p53.iarc.fr) [56]. The TP53 mutation status of TOV-1946 and OV-1946 is consistent with IHC results in these cell lines (Figure 2D and 2I). Although TOV-2223 harbors a TP53 mutation, IHC staining was negative (Figure 2). This is not inconsistent with independent reports that only a smaller fraction of cancers (about 12%) harboring nonsense mutations exhibited IHC-positivity as compared to IHC-negative nonsense mutations (IARC TP53 mutation database) [56]. As TP53 mutation analysis revealed no evidence of heterozygosity, it is likely that no functional p53 is encoded in these cell lines. No mutations in the other genes studied were found in the cell lines.

Chapitre 6.4.5 Cytogenetics and Spectral Karyotyping

The cytogenetic alterations of the three cell lines were assessed by G-banded karyotyping and by spectral karyotyping (SKY). Twenty-five metaphases in G-banding and thirty-two metaphases in SKY (TOV-2223), twenty-two metaphases in G-banding and thirty-nine metaphases in SKY (TOV-1946) and nineteen metaphases in G-banding and fifteen metaphases in SKY (OV-1946) were analyzed. The G-banded analysis of the three cell lines revealed a modal number of 51 to 71 chromosomes with complex karyotypes that are described as a composite karyotype containing the clonal chromosomal abnormalities (table 4) [55].

For the definition of the chromosomal breakpoints and the characterization of the marker chromosomes, the inverted-DAPI banding and spectral images were compared with the SKY-painted chromosomes of the same cell and then studied with the G-banded karyotypes for each cell line. This method allows a better identification of the numerous

chromosomal rearrangements and several markers in each cell line. It is noteworthy that there were common but also unique chromosomal abnormalities when comparing the TOV-1946 and OV-1946 cell lines. Some representative metaphases are shown in figure 4 and additional Figures 1-3.

Chapitre 6.5 Discussion

In order to establish new cellular models of EOC, all samples of ovarian tissues collected for our tumor banks are processed to derive primary cell cultures. Occasionally, some of the primary cultures evolve to become immortal cell lines. So far, we have been successful in establishing seven EOC cell lines [4], three of which are described here. All cell lines were derived from patients who were never exposed to chemotherapy. This is of importance, since the majority of available cellular models originate from samples obtained following neoadjuvant therapy that could introduce genetic events not related to the biology of the disease.

Early in culture, cell lines presented heterogenous populations of cells that eventually progressed toward a more uniform population of cells with cobblestone-like morphology typical of epithelial cells. All cell lines grew as adherent monolayers without evidence of cellular piling. However, we noted that TOV-2223 cells were more adherent to the petri dish when compared to TOV- and OV-1946. Indeed, a longer trypsinization time is required to detach these cells from the petri dish. Also, when fixed in methanol, a large portion of both 1946 cell lines detached from the solid support while 2223 cells did not (data not shown). The homogeneity of cells observed at passage 0 of OV-1946 could reflect the fact that these cells came from a mass in the patient's ascites that is more homogenous than a tumor mass often composed of, among others, epithelial tumor cells, stromal cells and endothelial cells.

Cell lines were also evaluated on their capacity to survive and grow in low serum conditions. It is worth noticing that although in normal growth conditions both TOV and OV-1946 cell lines present similar growth rates, in low serum conditions the later is almost two times slower. This could be in line with the fact that the OV-1946 cell line comes from ascites which is rich in growth factors and in culture can replace FBS [57]. This cell line could hence be more dependent on growth signals provided by the environment as opposed to cells originating from solid tumors where cells may be predicted to be more self-sufficient.

In epithelial cells, intermediate filaments are composed of keratins that vary according to the differentiation of the cells. Both OSE and EOC tumors are characterized by the expression of different keratins such as KRT7, KRT8 and KRT18. In order to determine if our cell lines presented these EOC markers, we monitored protein expression of Krt7, Krt8 and Krt18 by western blot. When antibodies were appropriate for immunohistochemistry on paraffin embedded tissues, we also compared keratins expression in the original tumor tissues. It is also well described that monitoring expression of Krt7 and Krt20 could distinguish between ovarian and gastro-intestinal tract tumors (reviewed in [58]). Both the 1946 and the 2223 patients presented different epithelium specific Krt expression (Figure 2A and 2E) but did not express Krt20. It is worth noting that the Krt patterns were not all the same between different cell lines. Stronger expression of Krt7 is observed in TOV-1946 and TOV-2223G was the only cell line that expressed Krt18 and Krt8. This underlines the fact that these cell lines are biologically different even though they originate from tissues representing the same type of serous EOC disease. Moreover, Krt7 is also differentially expressed between the TOV-1946 and OV-1946 cell lines that not only originate from the same type of disease but also from the same patient and differences are related to solid tumor versus ascites.

In EOC, 25 to 30% of the tumors present an amplification of the HER2 gene leading to the overexpression of the protein Her2 (reviewed in [2, 59-61]). The overexpression of this growth factor receptor alone was shown to be sufficient to induce malignant

transformation and is implicated in ovarian cancer as well as many other types of cancer [62-65]. In EOCs of advanced stage, over 50% of the tumors were shown to be mutated in the TP53 gene (reviewed in [2, 59-61]). All three cell lines showed Her2 protein expression and contained TP53 gene mutations.

Differences in growth rates, migration, invasion and spheroid formation between the TOV-1946 and TOV-2223 underline the diversity of phenotypes that can be observed within the same type of serous EOC disease. The results from the comparison of the TOV-1946 and OV-1946 growth characteristics, demonstrate that these cell lines present with unique phenotypes. Indeed, TOV-1946 cells had a better capability to invade and migrate although their capacity to form spheroid is reduced compared to the OV-1946 cells. One might speculate that cells derived from solid tumor conserve their migration and invasion property but in ascites, these characteristics are less vital. It has been previously shown that cells present in ascites form spheres or aggregates that can adhere to different extracellular matrices as well as to normal human mesothelial cells [66] but are not always invasive. The role of spheroids in ascites of ovarian cancer patients remains undefined. This is the first report of cell lines derived both from solid tumor and ascites cells of the same patient and further studies on these cell lines may provide useful insights into the biological progression of EOCs.

As both the TOV-1946 and OV-1946 injected mice developed ascites we hypothesize that the ability for cell lines to induce ascites formation in mice is intrinsic to the given cell line and independent of their origin (solid tumor versus ascites). It has been previously shown that the *in vivo* tumorigenicity can usually be predicted by the ability of the cells to grow in soft agar [67]. The OV-1946 cell line, which was the most tumorigenic, also formed the largest and most numerous colonies when seeded in soft agar (Table 2). In previous studies we have also observed that the capacity of the cells to form compact spheroids is related to their ability to form tumors *in vivo* [68]. Consistent with this notion, here we show that the OV-1946 cell line formed the most compact spheroids among the new cell lines and formed the greatest number of tumors with the shortest latency in

xenograft experiments. However, the TOV-2223 cell line does not even form an aggregate in hanging droplets, only formed small colonies in soft agar and produced no tumors in SCID mice. The tumorigenicity results for TOV-2223 are also consistent with the relative indolent disease observed in patient 2223 who survived a relatively long period post diagnosis without treatment. Indeed, we have previously isolated the TOV-81D cell lines, also from an indolent disease, which failed to form tumors in immuno-compromised mice [4] suggesting inherent qualities of the tumor that are reflected in its clinical behavior can affect this biological parameter.

The unique features of the described cell lines provide complementary models for different aspects of the disease. For example, while TOV-2223 and the TOV-1946 cell lines are both derived from solid tumors of the same type of serous EOC disease, they vary in important aspects including their aggressiveness and karyotype. They may prove useful for comparative studies to uncover molecular events that distinguish very aggressive from more indolent serous disease in ovarian cancer. Although the TOV-1946 and OV-1946 lines were derived from the same patient, they were collected from the solid tumor and the corresponding ascites respectively. Although common genome modifications are shared between these two cell lines (see examples of modifications occurring on chromosome X, 1, 2, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15 and 16) (Table 4), others are unique either to the solid tumor or the ascites derived cell line (chromosome 2, 4, 5, 6, 7, 9, 16, 17, 18, 19, 20 and 22) (Table 4). These observations suggest that the two cell lines acquired common modifications during the earlier steps of tumorigenesis and during cancer progression different rearrangements were selected for, depending on the microenvironment.

The results obtained by SKY and G-banding assays reflect previously published karyotype studies on EOC where high genomic instability is observed [69]. Recently, it has been shown that recurrent rearrangements resulting in the formation of new fusion genes could be identified using genomic and bioinformatic tools [70-73]. So far such studies have been difficult to conduct on solid tumors and hence the importance of appropriate cellular models representing different types of tumors. The future fine cartography of recurrent

lesions in these cell lines may provide insights into the molecular events that contribute to EOC initiation and progression.

Chapitre 6.6 Conclusions

In conclusion, this paper describes the establishment and characterization of three new serous EOC cell lines derived from two chemotherapy naïve patients. These cell lines are new and important tools in the study ovarian cancer disease, as few cell lines are described to date that represent this frequently diagnosed histopathology type of EOC. The rich characterization of these cell lines, including epithelial marker expression, growth characteristics, mutation and SKY analysis, provide the foundation for future experiments using these new models of EOC.

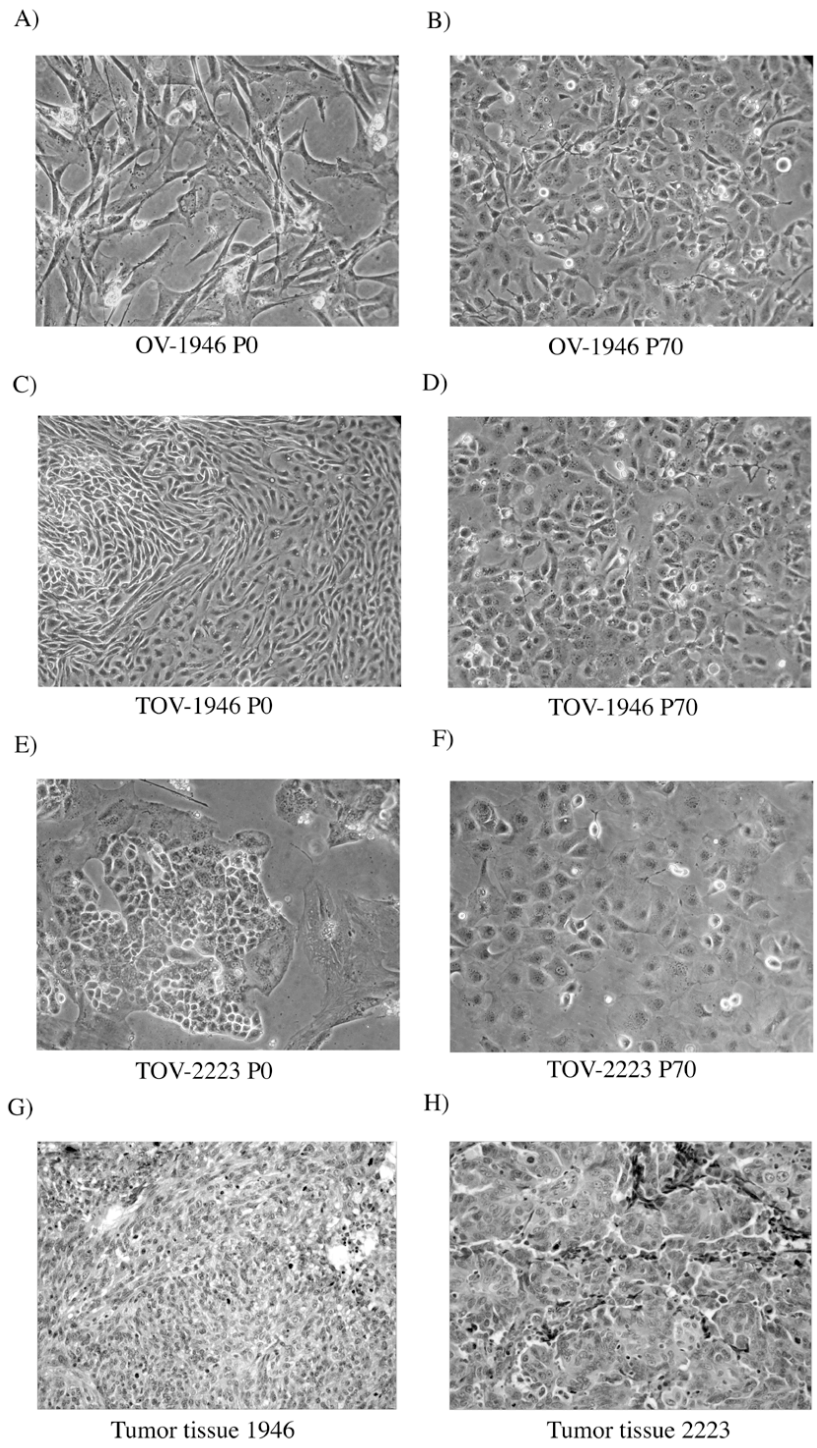


Figure 1.

Figure 1: Cellular morphology of serous ovarian epithelium cancer cell lines and their corresponding tumoral tissues.

A, C, E) Morphological appearance of the TOV-1946, OV-1946 and TOV-2223 cell lines respectively at passage 0. More (TOV-1946 and TOV-2223) or less (OV-1946) heterogenous populations of cells with obvious fibroblastic contaminants are visible for all three cell lines. B, D, F) Appearance of TOV-1946, OV-1946 and TOV-2223 cell lines respectively at passage 70. An evolution toward a more homogenous population of cobblestone-like cells typical of an epithelial cell type. G,H) Hematoxylin-Eosin stained tumor tissue sections of patient 1946 and 2223. Poorly differentiated tumor masses can be observed. All primary cultures and cell lines were cultured in OSE medium composed of 50:50 medium 199:105 (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2.5µg/mL amphotericin B and 50µg/mL gentamicin. All photographs were taken at 400x magnification.

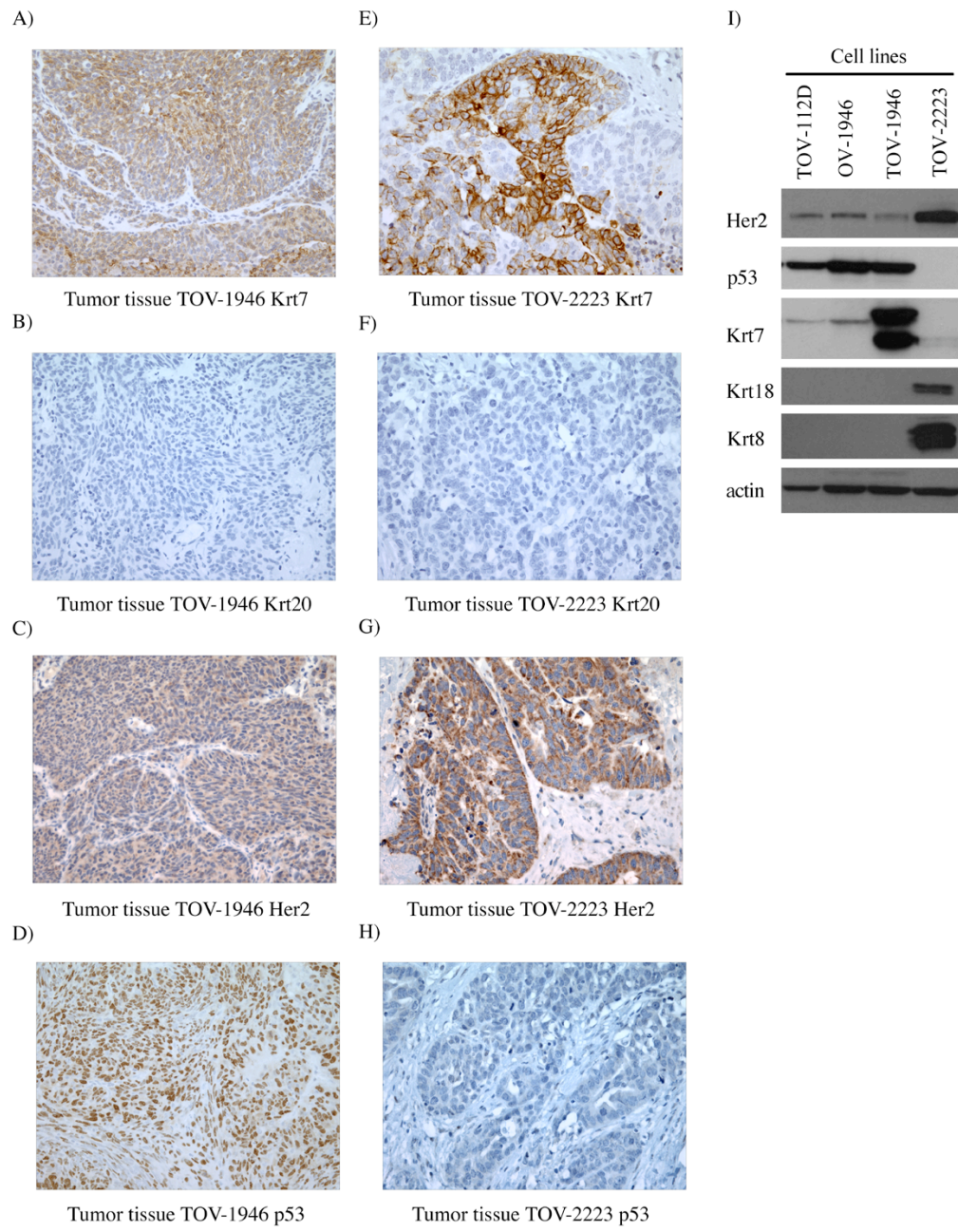


Figure 2.

Figure 2 : Solid tumor and cell line expression of keratins, TP53 and HER2.

A-D) Immunohistochemistry on paraffin embedded TOV-1946 tumor tissue verifying Krt7, Krt20, Her2 and p53 expression respectively. E-H) Expression of the same four proteins was verified in the TOV-2223 tumoral tissue. Krt7 and Krt20 were used to distinguish between ovarian and gastro-intestinal tract tumors. Nuclei were counterstained with hematoxylin and all sections were observed by light microscopy at 400X magnification. I) In parallel, Her2, p53, Krt7, Krt18 and Krt8 expression was verified by western blot in cell lines. Krt7, Krt18 were used in order to confirm the epithelial character of cell lines. Actin was used as a loading control.

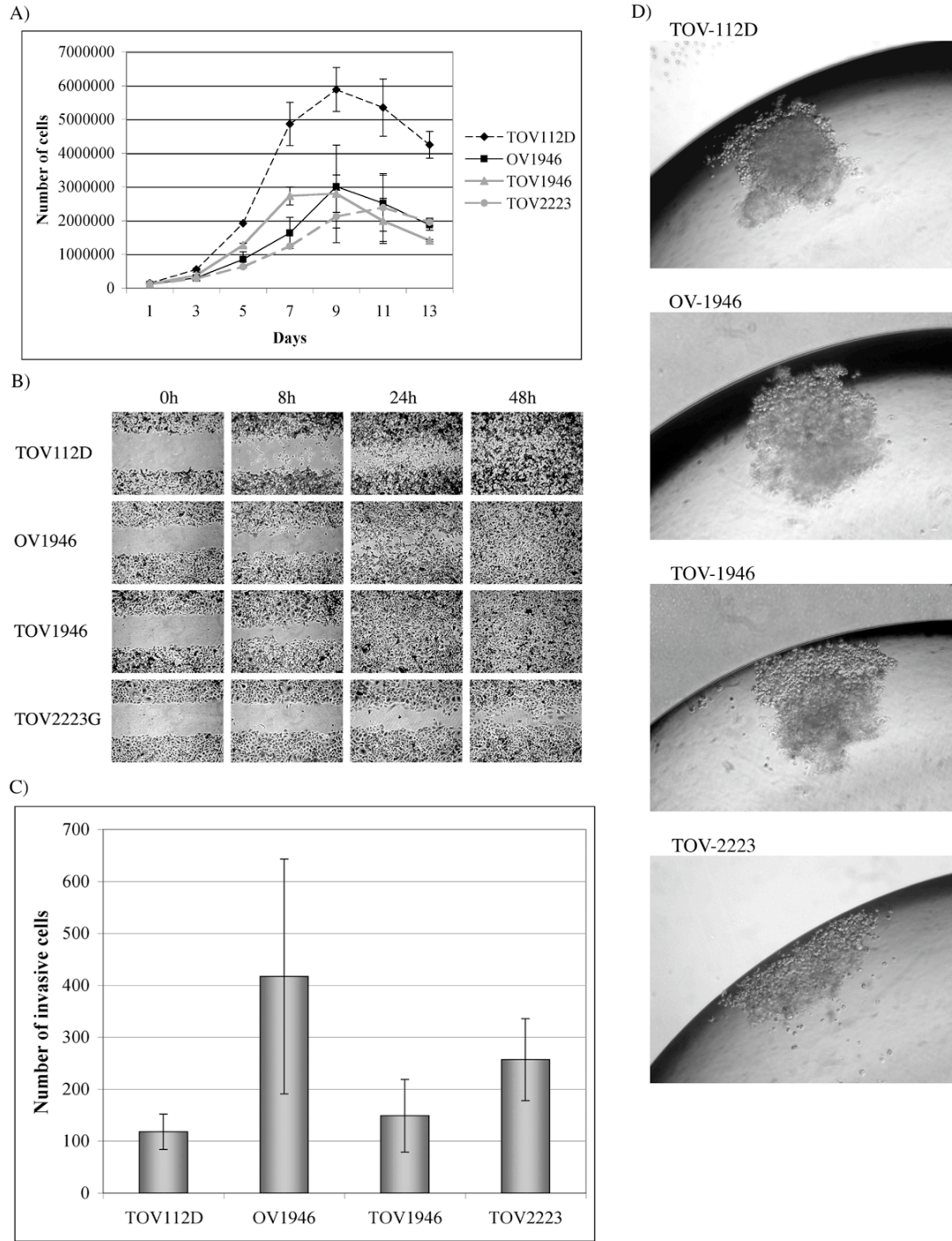


Figure 3.

Figure 3 : Cell growth rate and tumorigenicity assays.

A) Growth curves of the three new cell lines as well as a previously characterized EOC TOV-112D cell line. 100 000 cells were plated onto 60mm petri dishes. Cells were trypsinised and counted every 48h for two weeks. Experiments were performed two times in triplicate. B) Wound-healing assay of the same four cell lines. Cells were plated onto a 12 well dish and at near confluence wounds were generated. Cells were methanol fixed and treated with Giemsa Stain at different time points in order to evaluate cell migration (0h, 8h, 24h and 48h after the scratch was performed). The experiments were performed twice in triplicate. C) Invasion assay using modified Boyden chambers. The capability of the cells to invade through matrigel membranes was verified and the invasion potential increased from TOV-112D, OV-1946, TOV-2223 to TOV-1946. The experiments were performed in duplicate. D) The capacity of the cells to form three-dimensional structures in hanging droplets was monitored. TOV-112D cells were able to form very compact spheroids, OV-1946 formed less compact spheroids, TOV-1946 cells formed loose aggregates of cells and TOV-2223 cells were unable to form any 3-D structure. Spheroid formation capability was visualized after four days.

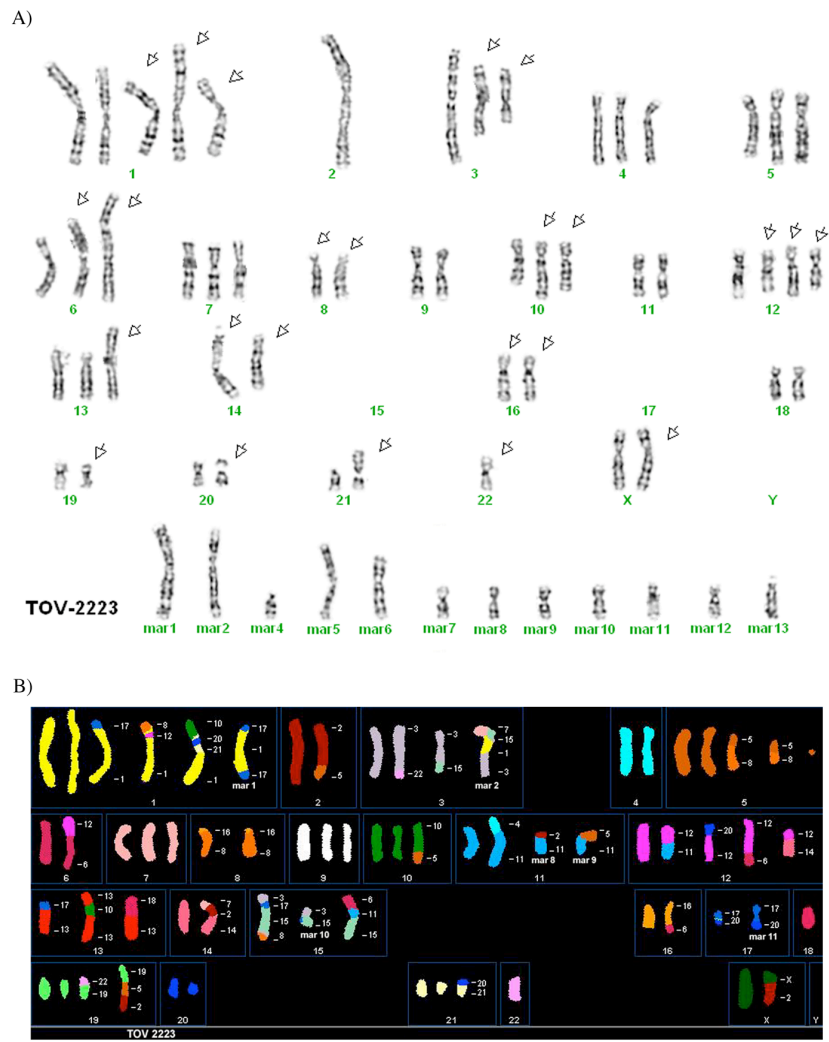


Figure 4.

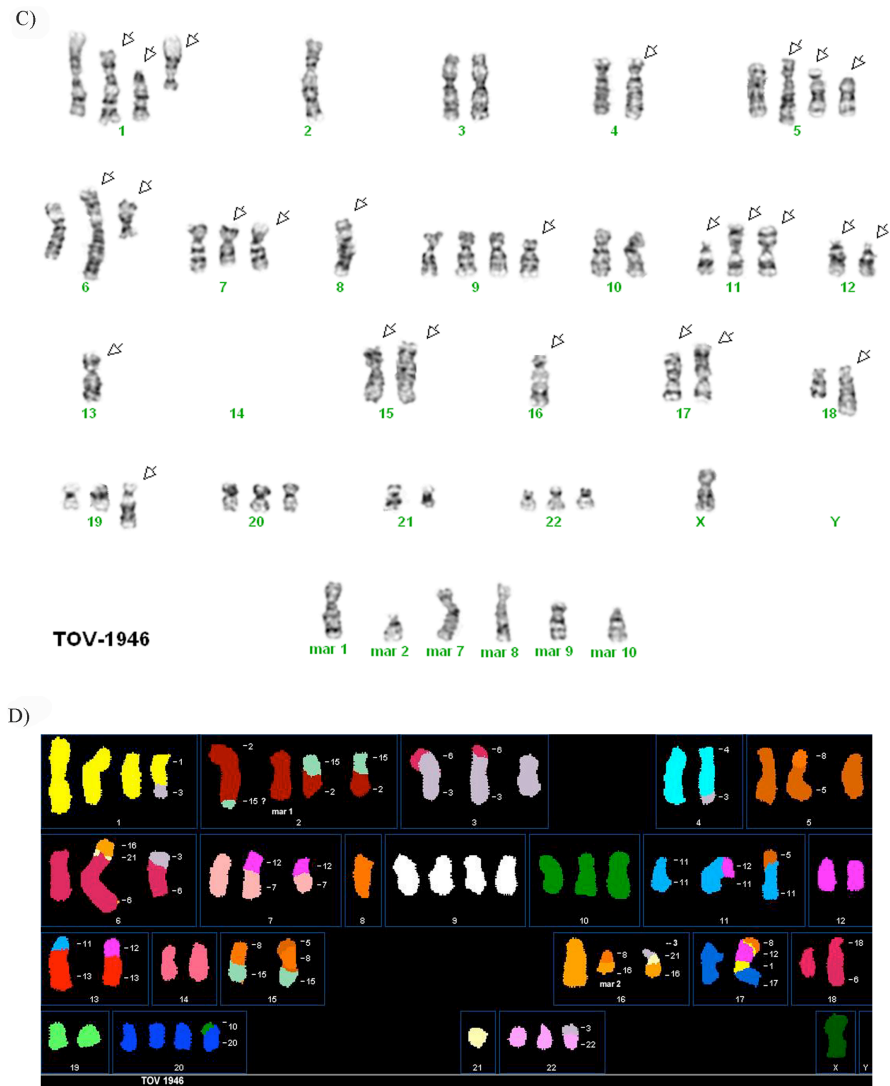


Figure 4.

Figure 4. Representative G-banded and SKY analysis.

A), C), E) Representative G-banded metaphases from the TOV-2223 (cell 10), TOV-1946 (cell 34) and OV-1946 (cell 1) cell lines respectively. Arrows indicate the abnormal chromosomes, mar: marker chromosome. B), D), F) Representative metaphases from TOV-2223 (cell 45), TOV-1946 (cell 44) and OV-1946 (cell 11) cell lines respectively analyzed by SKY. The origin of several marker chromosomes (mar) is defined by SKY analysis. Other examples of G-banded metaphases and the combined inverted-DAPI and SKY images of different cells are shown as additional Figures 1-3.

Clinical Parameter	Patient	
	1946	2223
Age at diagnosis	75	89
Tumor type	cystadenocarcinoma	cystadenocarcinoma
Histopathology sub-type	serous papillary	serous papillary
Tumor grade	G3	G3
Disease stage	IIC	IIC
Ascitis at surgery	yes	yes
Surgical debulking	Sub-optimal	Sub-optimal
Progression	N/A	yes
Death	yes*	yes
Cause of death	gastric hemorrhage	disease progression
Follow up (months)	0.5	18
Treatment	N/A	Megace (palliative care only)

N/A not applicable

*patient died from post-operative complication

Table I. Patient clinical data.

Table 2: Summary of cell line growth characteristics and tumorigenicity

	Cell line growth assays	TOV-1946	OV-1946	TOV-2223	TOV-112D
Growth characteristic	Doubling time (days) +/- S.D. ^a	1.3 +/- 0.4	2.5 +/- 0.9	2.6 +/- 0.7	1.0 +/- 0.2
	Saturation density (nb cells +/- S.D.) ^b	3 053 933 +/- 153 933	3 231 400 +/- 962 723	2 536 867 +/- 680 852	6 162 133 +/- 515 034
	Number of passages to date	>210	>210	>150	>200
Spheroid	Formation	aggregate	semi-compact	no	compact
Migration	time for wound filling (h)	24	48	>48	48
Invasion	Mean number of cells +/- S.D. ^c	417 +/- 226	149 +/- 70	257 +/- 79	118 +/- 34
Soft agarose	Colony number +/- S.D. ^d	11 +/- 3	24 +/- 8	16 +/- 4	27 +/- 10
	Colony size	large	large	small	large
Low serum	Capacity to grow in low serum (1%) conditions	yes	yes	yes	yes
Subcutaneous injection in SCID mice	Number of mice with tumors (n=6)	0	0	0	5
	Mean time of tumor appearance (days)	NA	NA	NA	7
Intraperitoneal injection in SCID mice	Number of mice with tumors (n=6)	3	5	0	6
	Mean time of tumor appearance (days)	125	63	NA	18
	Number of mice with ascitis	2	1	0	2

^acalculated according to the slope of the linear portion of the growth curve.

^brepresents the mean of maximum number of cells counted among the two independent experiments performed in triplicate

^cnumber of cells that migrate through the matrigel insert

^dmean of colony numbers per representative area (minimum 5) from two independent experiment performed in duplicate

Table II. Summary of cell line growth characteristics and tumorigenicity.**Table 3 : Mutation status of the new EOC cell lines**

	TOV112D	TOV-1946	OV-1946	TOV-2223G
Somatic				
<i>TP53</i>	EX5-36 G>A, R175H	EX8+35 C>T, R273C	EX8+35 C>T, R273C	EX4+62 G>A, W53X
<i>KRAS</i>	-	-	-	-
<i>BRAF</i>	-	-	-	-
Microsatellite Instability (MSI)	-	-	-	-
Germline				
<i>BRCA1</i>	-	-	-	-
<i>BRCA2</i>	-	-	-	-

- = no mutations were found

Table III. Mutation status of the new EOC cell lines.

Cell line	G-banding composite karyotypes
TOV-2223	53~71,X,der(X)t(X;2)(q13;q2?3),+der(1)t(1;17)(p3?4;q21),+add(1)(p?21),+add(1)(p12),?i(2)(q10),der(2)t(2;5)(q31;q31), +der(3)t(3;22)(q2?2;q11.2),del(3)(q23),+4,+4,-5,+5,der(6;12)(q10;q10),+add(6)(p11.2),+7,del(8)(p11.2)x2,+del(8)(p21),+9,der(10)t(5;10)(q?31;q26),+11,+add(12)(q11),+add(12)(p11.2),+add(12)(q24),+der(12;14)(p10;q10),add(13)(p11.2),+i(13)(q10), add(14)(p11.2),-15,-15,der(15)add(15)(p11.2)add(15)(q26),add(16)(q22),+add(16)(q22),-17,-17,-18,add(18)(p11.2),del(19)(p13),add(19)(q13),-20,add(21)(p11.2),-22,t(22)(q10),+20mar,inc[cp25]
TOV-1946	51~62,X,-X,der(X;12)(q10;q10),del(1)(q41q42),+add(1)(p13),+del(1)(q12),add(2)(q37),t(3;6)(p21;p21),t(3;6)(p21;p21)x2,del(3)(p?14),add(4)(q35),del(5)(p12),+der(5;8)(q10;p10),der(6)t(3;6)(p10;q10)del(6)(q?21),+der(6)add(6)(p25)add(6)(q27),del(7)(q11.2q21),+add(7)(p11.2),add(8)(p11.2),+der(8)?t(8;12)(p12;q13),+9,+del(9)(p21),+der(9)del(9)(p13)add(9)(q32),+10,add(11)(p15)x2,+del(11)(p11.2),del(12)(p11.2)x2,der(13)?t(11;13)(p11.2;p11.2)x2,add(15)(p11.2)x2,+der(15)?t(8;15)(q21;p11.2), -16,add(16)(p13),add(16)(q24),-17,add(17)(p11.2),add(17)(p1?3),add(18)(q23)+19,+add(19)(q13.4)+20+20-21-
OV-1946	57~65,X,-X,der(X;12)(q10;q10),del(1)(q41q42),add(1)(p13),+add(1)(p13),+del(1)(q12),-2,der(2)del(2)(p?14)add(2)(q?31),t(3;6)(p21;p21),del(3)(p?14),+5,+del(5)(q11.2),+7,+add(7)(q11.2),+8,+add(8)(p11.2),+der(8)?t(8;12)(p12;q13),del(9)(p21),add(9)(q32),+add(9)(q32),+der(9)del(9)(p13)add(9)(q32),+10,+add(10)(q26),add(11)(p15)x2,+del(11)(p11.2),del(12)(p11.2),der(13)?t(11;13)(p11.2;p11.2)x2,add(15)(p11.2)x2,+der(15)?t(8;15)(q21;p11.2),add(16)(p13),-17,-17, add(17)(p11.2),add(17)(p1?3),+del(17)(p11.2),-18,+18,+19,+19,+20,+20,-21,+22,+22,+26mar,inc[cp19]

Table IV. G-banding composite karyotypes of the three ovarian cancer cell lines.

Acknowledgement

We are grateful to Véronique Barrès, Louise Champoux, Manon de Ladurantaye and Marise Roy for technical assistance. We thank Sylvie Lavallée and Claude Rondeau (Leukemia Cell Bank of Quebec) for expert technical assistance in cytogenetics and spectral karyotyping. We would like to thank the Gynecologic Oncologist of CHUM for providing specimens. We are grateful to laboratory members for thoughtful discussion. This work was supported by a grant from the Cancer Research Society (CRS) to A.-M.M.-M., P.N.T. and D.M.P. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), affiliated to the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). V.O. was supported by studentships from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Canderel Fund of the Institut du Cancer de Montréal. M.Z. was supported by studentship from the Marc Bourgie Fund of the Institut du Cancer de Montréal, the Canderel Fund of the Institut du Cancer de Montréal and the Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

Chapitre 6.7 Bibliography

1. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C, Vergote I: Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, 60(2):159-179.
2. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC: Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001, 22(2):255-288.
3. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S: Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003, 83 Suppl 1:135-166.

4. Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tetrault M, Manderson EN, Wang JC, Eydoux P, Savoie R, Tonin PN, Mes-Masson AM: Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2000, 36(6):357-361.
5. DiSaia PJ, Morrow M, Kanabus J, Piechal W, Townsend DE: Two new tissue culture lines from ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1975, 3(3):215-219.
6. Fogh J, Trempe G: New human tumor cell lines. New York: Plenum Press; 1975.
7. Sinna GA, Beckman G, Lundgren E, Nordenson I, Roos G: Characterization of two human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 1979, 7(3):267-280.
8. Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981, 68(5):1331-1337.
9. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 1983, 43(11):5379-5389.
10. Buick RN, Pullano R, Trent JM: Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1985, 45(8):3668-3676.
11. Hill BT, Whelan RD, Gibby EM, Sheer D, Hosking LK, Shellard SA, Rupniak HT: Establishment and characterisation of three new human ovarian carcinoma cell lines and initial evaluation of their potential in experimental chemotherapy studies. *Int J Cancer* 1987, 39(2):219-225.
12. Langdon SP, Lawrie SS, Hay FG, Hawkes MM, McDonald A, Hayward IP, Schol DJ, Hilgers J, Leonard RC, Smyth JF: Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1988, 48(21):6166-6172.
13. Briers TW, Stroobants P, Vandeputte TM, Nouwen EJ, Conraads MV, Eestermans G, Van Bockstaele D, De Broe ME: Establishment and characterization of a human ovarian neoplastic cell line, DO-s. *Cancer Res* 1989, 49(18):5153-5161.
14. Golombick T, Dansey R, Bezwoda WR, Rosendorff J: Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cell lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth characteristics, biochemical, and cytogenetic studies. *In vitro Cell Dev Biol* 1990, 26(5):447-454.
15. Wong WS, Wong YF, Ng YT, Huang PD, Chew EC, Ho TH, Chang MZ: Establishment and characterization of a new human cell line derived from ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990, 38(1):37-45.

16. Golombick T, Bezwoda WR: *In vitro* maintenance of a new ovarian cancer cell line in protein-free media: a potential model for autonomous growth and tumor progression. *Eur J Cell Biol* 1991, 56(2):459-463.
17. Yamada T, Ueda M, Otsuki Y, Ueki M, Sugimoto O: Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 1991, 40(2):118-128.
18. Mobus V, Gerharz CD, Press U, Moll R, Beck T, Mellin W, Pollow K, Knapstein PG, Kreienberg R: Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1992, 52(1):76-84.
19. Grunt TW, Oeller H, Somay C, Dittrich C: Different propensity for spontaneous differentiation of cell clones isolated from the human ovarian surface epithelial cell line HOC-7. *Differentiation* 1993, 53(1):45-50.
20. Provencher DM, Finstad CL, Saigo PE, Rubin SC, Hoskins WJ, Federici MG, Stockert E, Lloyd KO, Lewis JL, Jr.: Comparison of antigen expression on fresh and cultured ascites cells and on solid tumors of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993, 50(1):78-83.
21. Hirte HW, Kaiser JS, Bacchetti S: Establishment and characterization of four human epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Cancer* 1994, 74(3):900-906.
22. Buller RE, Niemann T, Connor JP, Squatrito RC, Skilling JS, Anderson B: Isolation and preliminary characterization of an ovarian carcinoma cell line from a patient with familial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995, 56(1):39-44.
23. Alama A, Barbieri F, Favre A, Cagnoli M, Noviello E, Pedulla F, Viale M, Foglia G, Ragni N: Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 1996, 62(1):82-88.
24. Kim JW, Lee CG, Lyu MS, Kim HK, Rha JG, Kim DH, Kim SJ, Namkoong SE: A new cell line from human undifferentiated carcinoma of the ovary: establishment and characterization. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997, 123(2):82-90.
25. Mancini A, Borrelli A, Formisano S, Masucci MT, Maffeo A, Perla G, De Martino L, Bevilacqua N, Botti G, Maggino T: Establishment and growth regulation of a novel ovarian cancer cell line from a poorly-differentiated adenocarcinoma: proposal for a new treatment. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999, 20(1):45-52.
26. Bar JK, Harlozinska A: Morphological and phenotypic characterization of a new established ovarian carcinoma cell line (OvBH-1). *Anticancer Res* 2000, 20(5A):2975-2980.

27. Sato S, Kobayashi Y, Okuma Y, Kondo H, Kanishi Y, Saito K, Kiguchi K: Establishment and characterization of a cell-line originated from human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Hum Cell* 2002, 15(3):171-177.
28. Saga Y, Suzuki M, Machida S, Ohwada M, Sato I: Establishment of a new cell line (TAYA) of clear cell adenocarcinoma of the ovary and its radiosensitivity. *Oncology* 2002, 62(2):180-184.
29. Nishikawa Y, Yoshida Y, Kawahara K, Kurokawa T, Tajima K, Kotsuji F: Establishment of a novel human ovarian cancer cell line with high anchorage-independent growth ability. *Int J Oncol* 2003, 23(6):1679-1686.
30. Woods LK, Morgan RT, Quinn LA, Moore GE, Semple TU, Stedman KE: Comparison of four new cell lines from patients with adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Res* 1979, 39(11):4449-4459.
31. Crickard K, Niedbala MJ, Crickard U, Yoonessi M, Sandberg AA, Okuyama K, Bernacki RJ, Satchidanand SK: Characterization of human ovarian and endometrial carcinoma cell lines established on extracellular matrix. *Gynecol Oncol* 1989, 32(2):163-173.
32. Imai S, Kiyozuka Y, Maeda H, Noda T, Hosick HL: Establishment and characterization of a human ovarian serous cystadenocarcinoma cell line that produces the tumor markers CA-125 and tissue polypeptide antigen. *Oncology* 1990, 47(2):177-184.
33. van den Berg-Bakker CA, Hagemeyer A, Franken-Postma EM, Smit VT, Kuppen PJ, van Ravenswaay Claasen HH, Cornelisse CJ, Schrier PI: Establishment and characterization of 7 ovarian carcinoma cell lines and one granulosa tumor cell line: growth features and cytogenetics. *Int J Cancer* 1993, 53(4):613-620.
34. Yonamine K, Hayashi K, Iida T: Establishment and characterization of human ovarian clear cell adenocarcinoma cell line (SMOV-2), and its cytotoxicity by anticancer agents. *Hum Cell* 1999, 12(3):139-148.
35. Emoto M, Oshima K, Ishiguro M, Iwasaki H, Kawarabayashi T, Kikuchi M: Establishment and characterization of a serous papillary adenocarcinoma cell line of the human ovary in a serum-free culture. *Pathol Res Pract* 1999, 195(4):237-242.
36. Aoki D, Suzuki N, Susumu N, Noda T, Suzuki A, Tamada Y, Higashiguchi A, Oie S, Nozawa S: Establishment and characterization of the RMG-V cell line from human ovarian clear cell adenocarcinoma. *Hum Cell* 2005, 18(3):143-146.
37. Scoles DR, Pavelka J, Cass I, Tran H, Baldwin RL, Armstrong K, Karlan BY: Characterization of CSOC 882, a novel immortalized ovarian cancer cell line expressing EGFR, HER2, and activated AKT. *Gynecol Oncol* 2007, 104(1):120-128.

38. Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA: Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest* 1994, 71(4):510-518.
39. Nitta M, Katabuchi H, Ohtake H, Tashiro H, Yamaizumi M, Okamura H: Characterization and tumorigenicity of human ovarian surface epithelial cells immortalized by SV40 large T antigen. *Gynecol Oncol* 2001, 81(1):10-17.
40. Shenhua X, Lijuan Q, Hanzhou N, Xinghao N, Chihong Z, Gu Z, Weifang D, Yongliang G: Establishment of a highly metastatic human ovarian cancer cell line (HO-8910PM) and its characterization. *J Exp Clin Cancer Res* 1999, 18(2):233-239.
41. Yabushita H, Ueno N, Sawaguchi K, Higuchi K, Noguchi M, Ishihara M: Establishment and characterization of a new human cell-line (AMOC-2) derived from a serous adenocarcinoma of ovary. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1989, 41(7):888-894.
42. Kruk PA, Maines-Bandiera SL, Auersperg N: A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab Invest* 1990, 63(1):132-136.
43. Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot MJ, Mes-Masson AM: Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp Cell Res* 1994, 215(2):303-309.
44. Keller GM: *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995, 7(6):862-869.
45. Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin PN, Provencher D, Mes-Masson AM: Molecular description of a 3-D *in vitro* model for the study of epithelial ovarian cancer. *Mol Carcinog* 2007, In Press.
46. Bossolasco M, Veillette F, Bertrand R, Mes-Masson AM: Human TDE1, a TDE1/TMS family member, inhibits apoptosis *in vitro* and stimulates *in vivo* tumorigenesis. *Oncogene* 2006, 25(33):4549-4558.
47. Shigeta M, Sanzen N, Ozawa M, Gu J, Hasegawa H, Sekiguchi K: CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 2003, 163(1):165-176.
48. Ronot X, Doisy A, Tracqui P: Quantitative study of dynamic behavior of cell monolayers during *in vitro* wound healing by optical flow analysis. *Cytometry* 2000, 41(1):19-30.
49. Arcand SL, Provencher D, Mes-Masson AM, Tonin PN: OGG1 Cys326 variant, allelic imbalance of chromosome band 3p25.3 and TP53 mutations in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2005, 27(5):1315-1320.
50. Arcand SL, Maugard CM, Ghadirian P, Robidoux A, Perret C, Zhang P, Fafard E, Mes-Masson AM, Foulkes WD, Provencher D et al: Germline TP53 mutations in

BRCA1 and BRCA2 mutation-negative French Canadian breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2007.

51. Samouelian V, Maugard CM, Jolicoeur M, Bertrand R, Arcand SL, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM: Chemosensitivity and radiosensitivity profiles of four new human epithelial ovarian cancer cell lines exhibiting genetic alterations in BRCA2, TGFbeta-RII, KRAS2, TP53 and/or CDNK2A. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004, 54(6):497-504.

52. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W et al: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002, 417(6892):949-954.

53. Oros KK, Ghadirian P, Greenwood CM, Perret C, Shen Z, Paredes Y, Arcand SL, Mes-Masson AM, Narod SA, Foulkes WD et al: Significant proportion of breast and/or ovarian cancer families of French Canadian descent harbor 1 of 5 BRCA1 and BRCA2 mutations. *Int J Cancer* 2004, 112(3):411-419.

54. Tonin PN, Mes-Masson AM, Futreal PA, Morgan K, Mahon M, Foulkes WD, Cole DE, Provencher D, Ghadirian P, Narod SA: Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1998, 63(5):1341-1351.

55. Shaffer L, Tommerup N: ISCN, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger AG; 2005.

56. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M: Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007, 28(6):622-629.

57. Puiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, Chevrette M, Provencher DM, Mes-Masson AM: Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an *in vitro* model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 2007, 9(10):820-829.

58. Prat J: Ovarian carcinomas, including secondary tumors: diagnostically challenging areas. *Mod Pathol* 2005, 18 Suppl 2:S99-111.

59. Boente MP, Hurteau J, Rodriguez GC, Bast RC, Jr., Berchuck A: The biology of ovarian cancer. *Curr Opin Oncol* 1993, 5(5):900-907.

60. Berchuck A, Elbendary A, Havrilesky L, Rodriguez GC, Bast RC, Jr.: Pathogenesis of ovarian cancers. *J Soc Gynecol Investig* 1994, 1(3):181-190.

61. Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ: Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol* 2000, 16(3):567-576.

62. Meden H, Kuhn W: Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. [Review] [36 refs]. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 1997, 71(2):173-179.
63. Meden H, Marx D, Schauer A, Wuttke W, Kuhn W: Prognostic significance of p105 (c-erbB-2 HER2/neu) serum levels in patients with ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997, 17(1B):757-760.
64. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235(4785):177-182.
65. Calvo BF, Levine AM, Marcos M, Collins QF, Iacocca MV, Caskey LS, Gregory CW, Lin Y, Whang YE, Earp HS et al: Human epidermal receptor-2 expression in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9(3):1087-1097.
66. Burleson KM, Boente MP, Pambuccian SE, Skubitz AP: Disaggregation and invasion of ovarian carcinoma ascites spheroids. *J Transl Med* 2006, 4:6.
67. Freedman VH, Shin SI: Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 1974, 3(4):355-359.
68. Cody NA, Ouellet V, Manderson EN, Quinn MC, Filali-Mouhim A, Tellis P, Zietarska M, Provencher DM, Mes-Masson AM, Chevrette M et al: Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene* 2007, 26(4):618-632.
69. Taetle R, Aickin M, Yang JM, Panda L, Emerson J, Roe D, Adair L, Thompson F, Liu Y, Wisner L et al: Chromosome abnormalities in ovarian adenocarcinoma: I. Nonrandom chromosome abnormalities from 244 cases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999, 25(3):290-300.
70. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, Menon A, Jing X, Cao Q, Han B et al: Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007, 448(7153):595-599.
71. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R et al: Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005, 310(5748):644-648.
72. Martin ES, Tonon G, Sinha R, Xiao Y, Feng B, Kimmelman AC, Protopopov A, Ivanova E, Brennan C, Montgomery K et al: Common and distinct genomic events in sporadic colorectal cancer and diverse cancer types. *Cancer Res* 2007, 67(22):10736-10743.
73. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhir R, Lin WM, Province MA, Kraja A, Johnson LA et al: Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 2007.

Chapitre 7. Discussion

L'importance de l'utilisation des modèles *in vitro* pour la recherche sur le cancer est indéniable. Le cancer est une maladie complexe qui se développe souvent au fil de plusieurs années et l'ampleur de cette complexité peut être difficile à répliquer dans un contexte *ex vivo*. Les résultats des chapitres précédents démontrent une nouvelle approche pour le développement de modèles *in vitro* du cancer épithélial de l'ovaire qui nous a permis d'observer des différences subtiles inter-modèles. L'étude et la caractérisation du gène *SI00A6* nous ont permis de démontrer qu'une différence induite par la méthode de culture qui au départ fut subtile, peut avoir des impacts importants au niveau de la représentation de la maladie complexe *in vitro*. De plus, le développement de nouvelles lignées représentatives du cancer de l'ovaire le plus commun du type séreux nous permettra éventuellement de développer un modèle qui vise une représentation plus pertinente *in vitro* des conditions de croissance auxquelles sont soumises les cellules tumorales *in vivo*.

7.1 Le modèle sphéroïde

7.1.1 La méthode de culture

La méthode de culture de sphéroïdes en gouttelette suspendues représente une alternative intéressante aux méthodes de culture *in vitro* décrites jusqu'ici par le fait qu'elle est simple et très accessible. Au moment de la soumission de ce premier article, les méthodes auparavant décrites étaient techniquement difficiles à mettre au point ou encore trop dispendieuses. La méthode des gouttelettes suspendues nous a permis de générer des sphéroïdes de façon très reproductible et d'une taille assez grande pour ce type de modèle (environ 500 μm). De plus, nous avons pu également contourner l'utilisation de facteurs exogènes pouvant influencer l'analyse des profils d'expression tels que les substrats non-adhérents ou des matrices. Cette méthode n'est cependant pas sans défaut. En effet, dû à la petite quantité de milieu de culture dans la goutte, les études à long terme peuvent rapidement devenir fastidieuses. Lors de la croissance cellulaire à l'intérieur du sphéroïde,

les cellules vont assez rapidement utiliser les nutriments présents dans le milieu de culture pour ensuite mourir. De plus, à moins d'une automatisation, les études à grande échelle peuvent également demander beaucoup de temps. Depuis quelques années, différentes nouvelles méthodes de culture des sphéroïdes à grande échelle ont été développées [158-160]. Les études sur les cultures cellulaires en monocouche présentent certaines limites par rapport aux études *in vivo* et donc les cultures 3D deviennent de plus en plus un outil important dans les études d'efficacité thérapeutique de différents traitements antitumoraux et de nouvelles drogues [161-163]. Il est donc important de développer des systèmes de culture à grande échelle qui permettront de criblages des plusieurs drogues à la fois afin de détecter les plus actifs et efficaces. Jusqu'à présent les méthodes de culture 3D à grande échelle varient énormément de même que leur efficacité [160]. Depuis le premier modèle sphéroïde décrit par Sutherland *et al.* [138], la culture tridimensionnelle a énormément évolué sans pour autant avoir adopté un consensus dans la nomenclature. Ainsi, certains auteurs décrivent comme sphéroïdes de simples agrégats de cellules qui ne forment pas réellement de sphères compactes. En d'autres cas, les sphéroïdes décrits sont d'une taille tellement minuscule qu'ils ne peuvent reproduire les caractéristiques pathophysiologiques auparavant décrites dans les sphéroïdes multicellulaires de plus grande taille [145]. Finalement, une des limitations de tous les systèmes de culture 3D est le fait que la capacité à former des sphéroïdes compacts est dépendante de la lignée étudiée (Figure 1 page 154). Phénomène que nous avons observé parmi nos lignées où par exemple, la lignée TOV21G forme plutôt des agrégats et les lignées OV90 et TOV112D forment des sphéroïdes compacts. Nous avons cependant observé que la formation des associations de cellules (tant en agrégats qu'en sphéroïdes compacts) est un processus actif et non pas induit seulement par la proximité de cellules dans un environnement sans substrat. En effet, en absence de sérum la plupart des cellules que nous avons testées restent en suspension une à côté de l'autre sans former de liens cellulaires. De plus, certaines lignées, comme par exemple les HUVECS, sont totalement incapables de former des agrégats de cellules dans les conditions mises au point ici.

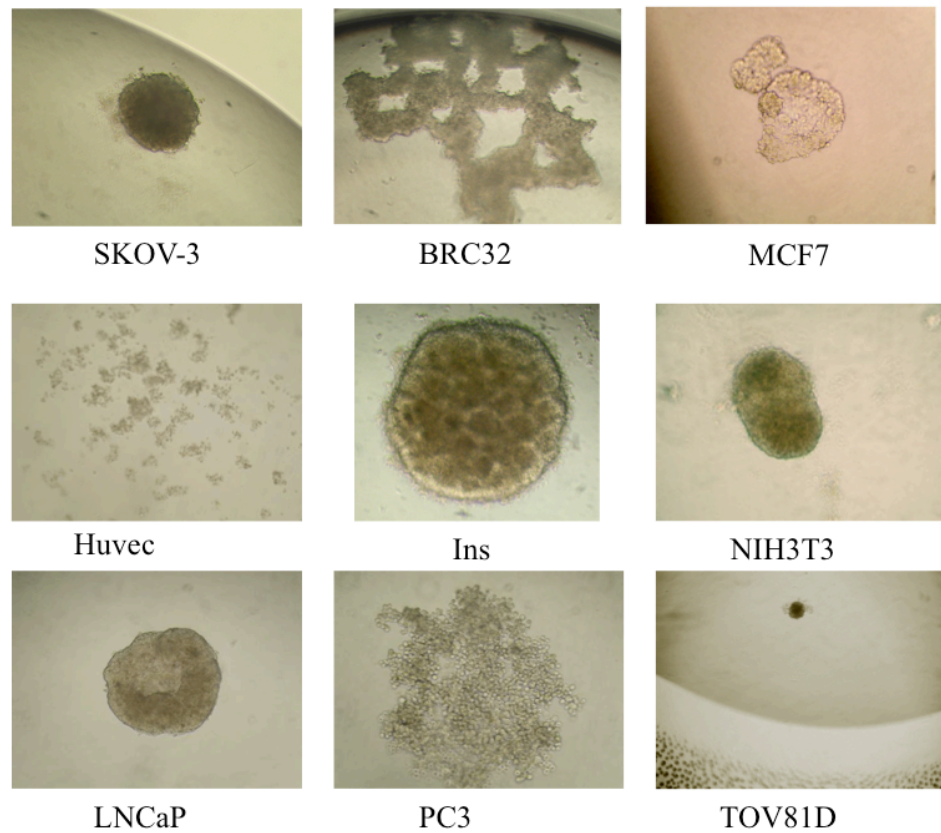


Figure 1. Exemples de différentes lignées en cultures dans les gouttelettes suspendues.

La formation des sphéroïdes est lignée dépendante. Les lignées SKOV-3 et TOV81D sont dérivées du cancer de l’ovaire. Les lignées BRC32 et MCF7 sont des lignées du cancer du sein. Les cellules HUVEC sont des cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale. Les lignées LNCaP et PC3 sont dérivées du cancer de la prostate. Les cellules NIH3T3 sont des fibroblastes dérivées de souris. La lignée INS est formée de cellules pancréatiques.

7.1.2 Le modèle sphéroïde

Dans notre étude de comparaison des profils d'expression géniques des différents modèles, nous avons pu démontrer que le modèle sphéroïde récapitule l'expression de certains gènes de façon similaire dans les modèles *in vivo* mais qu'on ne retrouve pas dans les cultures en monocouches. Nos résultats corroborent au niveau génétique de nombreuses études fonctionnelles et moléculaires précédentes qui soulignent l'aspect intermédiaire du modèle 3D entre la monocouche et les modèles *in vivo*. En plus de nous permettre l'étude de nombreux gènes candidats stratifiant les modèles, la validation de notre nouveau modèle peut nous servir de tremplin pour différentes études des phénomènes impliqués dans la tumorigénèse ovarienne.

Un des avantages du modèle sphéroïde est sa structure géométrique bien définie qui nous permet de faire un lien entre la fonction et la structure. Ainsi, dans une étude précédente portant sur le transfert de portions du chromosome 3 contenant possiblement des gènes suppresseurs de tumeurs [164], nous avons remarqué que la perte de la capacité à former des tumeurs était parallèle à la perte de la capacité de former des sphéroïdes. Cette observation a également été observée dans l'étude de la caractérisation de nouvelles lignées dans le chapitre 6 où les lignées qui formaient des sphéroïdes plus compacts présentaient un potentiel tumorigénique *in vivo* plus important. Différents groupes ont ultérieurement démontré l'importance de la stabilité structurale médiée par les liaisons cellulaires et les interactions avec la matrice extracellulaire dans le maintien d'un comportement normal d'une cellule. Ainsi, des changements dans la structure tissulaire peuvent promouvoir la progression tumorale [165-170]. Nos résultats préliminaires soulignent cette importance des liens cellule-cellule dans la tumorigénicité ovarienne et des études plus poussées quant aux molécules de liaison impliquées seraient très intéressantes.

Nous savons que le microenvironnement a un impact très important sur les cellules normales mais également sur les cellules cancéreuses et leur potentiel tumorigénique. Des interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire, le stroma et les cellules du système immunitaire peuvent influencer l'expression génique des cellules tumorales mais également le microenvironnement lui-même [171-174]. Toujours dans l'optique de développer un modèle le plus représentatif de la maladie *in vivo*, il serait donc très pertinent d'utiliser notre nouvelle méthode de culture 3D afin de développer des modèles de cultures hétérogènes composées de différentes cellules impliquées dans la tumorigenèse ovarienne. Différentes études ont démontré l'importance et l'implication des cellules stromales dans les processus tumoral. Ainsi, il a été démontré qu'un stroma normal peut avoir un effet protecteur contre la formation de tumeurs tandis qu'un stroma anormal peut au contraire promouvoir la formation de ces dernières. [175-178]. Certains modèles 3D sont capables de reproduire l'aspect hypoxique ou nécrotique aux centres des tumeurs d'une certaine taille. Ce modèle peut donc nous aider également à étudier les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales dans les conditions de manque d'oxygène et de nutriments. Dans un tel environnement, il y a sécrétion de facteurs pro-angiogéniques qui peuvent modifier et induire la vascularisation autour de la tumeur. Jusqu'à maintenant, une seule étude de co-culture en gouttelettes suspendues fut effectuée en utilisant des cellules tumorales et des cellules endothéliales [179]. Cette étude intéressante démontre la formation des embranchements de cellules endothéliales dans certaines parties des sphéroïdes. Les résultats de Timmins *et al.* sont prometteurs mais, la mise au point des systèmes de co-cultures demeure complexe. En effet, il faut prendre en considération par exemple le fait que différentes cellules poussent de façon optimale dans différents milieux (figure 2-A, page 159). Les proportions d'un type de cellule par rapport à l'autre peuvent influencer les résultats. De plus, certaines cellules sont incapables de croître sans substrat et peuvent mourir en gouttelettes avant même que l'on puisse observer un effet. Le moment où l'on ajoute un type de cellules à l'autre peut également influencer la formation du sphéroïde (figure 2-B, page 159). Les résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent dans les expériences de co-cultures que la mise au point des conditions optimales

peut être assez laborieuses (figure 2, page 159). Cependant, une fois ces conditions atteintes, le modèle sphéroïde pourrait devenir un outil de choix pour les études sur les interactions cellulaires et le microenvironnement tumoral.

Lors de l'analyse des profils d'expression génique, nous avons observé que plusieurs gènes candidats modulés étaient des gènes impliqués au niveau de la matrice extracellulaire, de l'angiogenèse ainsi qu'au niveau de la structure et de l'adhésion cellulaire. L'expression similaires de ces gènes entre le modèle sphéroïde et le modèle *in vivo* peut nous inciter à spéculer que les cellules tumorales du modèle 3D vont alors influencer les cellules environnantes de manière similaire à celle des tumeurs *in vivo*. Dans le but ultérieur d'étudier les interactions qu'il pourrait y avoir entre les cellules tumorales et les cellules de stroma ou encore des cellules épithéliales qui ont un potentiel de produire de vaisseaux sanguins, nous avons commencé à effectuer des tests de co-cultures avec des cellules endothéliales (figure 13-A et C, page 159). Le développement d'un modèle complexe de co-culture pour le cancer épithélial de l'ovaire représente une perspective intéressante.

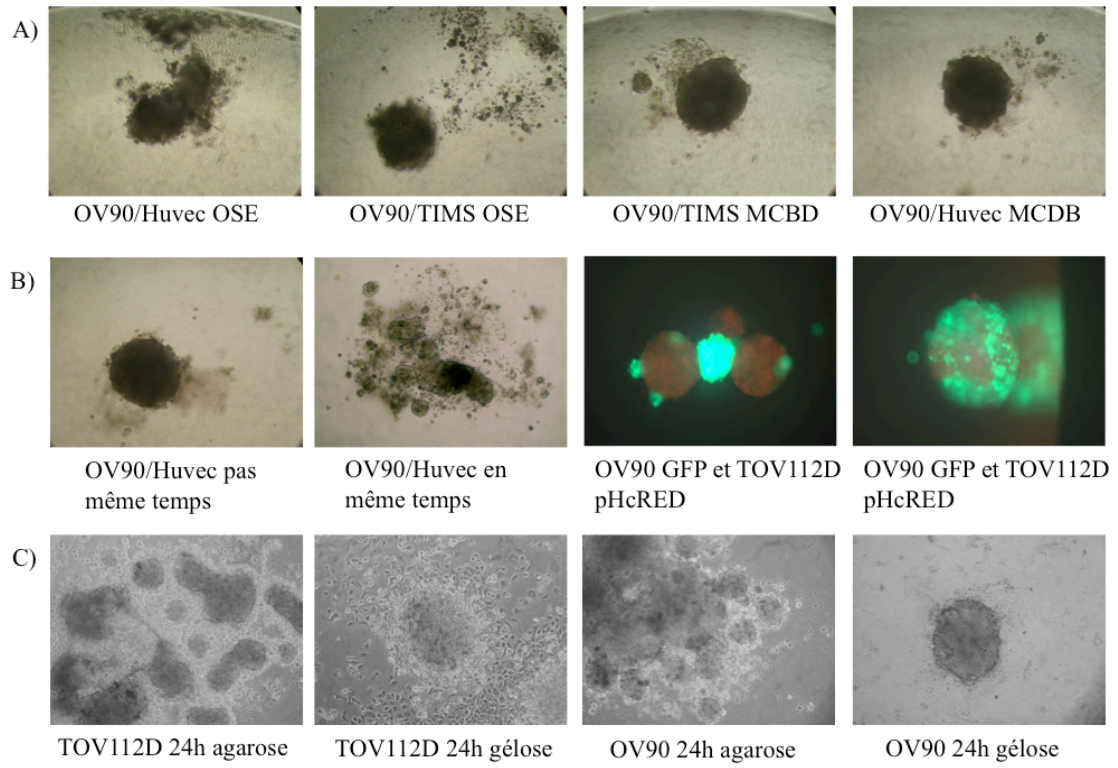


Figure 2.

Figure 2. Différentes conditions de co-cultures cellulaires des cellules d'EOC et des cellules endothéliales.

A et B) Les cellules endothéliales Huvec et TIME poussent de façon optimale dans le milieu MCDB additionné de différents facteurs. Cependant, pour les cellules d'EOC, le milieu optimal est l'OSE complet. Lorsqu'on effectue les co-cultures dans le milieu OSE, les cellules endothéliales semblent mourir (A). Dans le milieu MCDB les deux sortes de cellules se portent bien mais on ne sait pas comment le milieu MCDB influence les cellules tumorales (B). C et D) La formation des sphéroïdes peut être affectée par l'ordre dans lequel on ajoute les cellules. Lorsque deux types de cellules différentes sont mises en gouttelettes en même temps, ces cellules semblent ne pas vouloir se mélanger et il n'y a pas de formation d'un sphéroïde unique. Par exemple, dans le cas des cellules endothéliales et tumorales, l'ajout en même temps empêche la formation d'un sphéroïde compact (C, panneau gauche). Pour les cellules tumorales, lorsque ajoutées en même temps les sphéroïdes se forment un à côté de l'autre sans se mélanger (D, panneau gauche). Cependant, lorsque les cellules OV90 GFP sont rajoutées une fois le sphéroïde TOV112D formé, elles semblent envelopper ce dernier (D, panneau droit). E et F) Co-culture de sphéroïdes tumoraux par dessus une couche de cellules endothéliales cultivées sur l'agarose ou la gélose. Là on peut observer que le substrat sur lequel poussent les cellules endothéliales influence la croissance des cellules en provenance des sphéroïdes.

7.2 Les analyses de profils d'expression génique

L'avènement des nouvelles technologies au niveau de la génomique telles que les micropuces d'ADN nous a permis des études rapides et simultanées de plusieurs milliers de gènes à la fois. Le grand avantage de la technologie des micropuces à ADN est le fait qu'on puisse étudier un système dans son ensemble. Cet outil puissant a été très important pour la comparaison des différents modèles puisque l'on sait que les différences d'un modèle à l'autre ne sont pas le résultat de modulation d'un seul et unique gène mais plutôt de la variation et de l'interaction de plusieurs gènes à la fois. Paradoxalement, le plus grand avantage de la technologie des micropuces est en même temps son pire défaut. En effet, la comparaison des milliers de gènes d'un modèle à l'autre demande non seulement l'utilisation de puissants outils bioinformatiques (qui ne sont pas toujours parfaits) mais génère souvent un grand nombre de candidats. La caractérisation et l'étude de tous les candidats devient alors presque impossible. Par des associations des gènes candidats et par des recherches d'interaction, nous pouvons essayer d'identifier des voies moléculaires où plusieurs gènes sont impliqués à la fois afin de diriger nos recherches futures.

En plus des gènes décrits dans l'article au chapitre 4, nous avons trouvé de nombreux gènes d'intérêt dont, entre autres, ceux impliqués au niveau de la matrice extracellulaire (ECM). Il est connu que les modèles sphéroïdes contiennent une ECM qui diffère de celle des modèles de cultures en monocouches correspondants, tant au niveau de la quantité relative qu'au niveau de l'assemblage. Par exemple, les cellules de gliomes cultivées en sphéroïdes produisent plus de fibronectine et de laminines que les cellules en monocouches. De plus, l'organisation de la matrice extracellulaire dans ces sphéroïdes ressemble d'avantage à celle retrouvée dans les tumeurs *in vivo* (revue dans [152]). La principale composition de la ECM dans les cellules épithéliales est constituée de laminines et de collagènes. En plus de ces deux protéines principales, on peut y retrouver également des molécules telles que la BSP (bone sialoprotein), ostéopontine, osteocalcin, fibronectine,

vitronectine et thrombospondine [180]. Le rôle principal de la ECM est celui de support, mais il est bien connu qu'elle constitue également une barrière contre l'invasion des cellules tumorales en plus de jouer un rôle au niveau de la modulation du phénotype cellulaire au cours du développement, du remodelage tissulaire et de la réparation de tissus. La présence dans la matrice des facteurs de croissance, des cytokines et des protéases fait en sorte que la ECM peut influencer de façon importante la fonction cellulaire. Au niveau de la tumorigenèse cette influence est exercée en régulant la croissance et la fonction cellulaire [181]. Parmi les gènes les plus intéressants identifiés par les analyses des profils d'expression génique se rapportant à la ECM, nous pouvons citer la thrombospondine (*THBS1*), le *CSPG2* (versican), *ITIH2* (inter-alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 2) et *HABP2* (hyaluronic acid-binding protein2). Tous ces gènes ne sont pas modulés de la même façon, ainsi certains sont surexprimés dans les modèles 3D (*ITIH2* et *HABP2*) tandis que les autres sont sous-exprimés (*THBS1* et *CSPG2*) dans ces modèles par rapport aux cultures en monocouche. En plus d'un rôle au niveau de la stabilisation de la ECM, les gènes *ITIH2* et *HABP2* font partie des gènes qui codent pour des protéines de liaison à l'acide hyaluronique. Ce dernier a la capacité de promouvoir la motilité, l'adhésion et la prolifération cellulaire [182]. Un des rôles du gène candidat *THBS1* est la capacité d'inhiber l'angiogenèse, donc la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. L'inhibition de cette protéine serait donc favorable à l'initiation des signaux pro-angiogéniques. En plus de son rôle au niveau de l'angiogenèse, la thrombospondine est une protéine de la ECM qui promeut la diminution de l'adhésion cellulaire [183]. Encore une fois, l'inhibition de cette protéine au niveau du modèle sphéroïde pourrait aider à la formation des sphéroïdes compacts. Certaines études démontrent que le versican, qui est aussi inhibé dans les modèles 3D, aurait également des propriétés anti-adhésives [184-186]. Le versican, en plus de son rôle dans la régulation de l'adhésion cellulaire, est impliqué dans la survie, la prolifération, la migration cellulaire ainsi que dans l'assemblage de la ECM [187]. La nature pléiotrope de tous ces gènes candidats intéressants fait en sorte qu'ils peuvent être assez complexes à analyser. Il est important de souligner que dans le contexte présent, la matrice extracellulaire est originaire des cellules tumorales mêmes. Dans le contexte de la

maladie chez l'humain, certains éléments de la ECM sont également produits par les cellules normales (stroma par exemple). Ainsi, encore une fois, les études impliquant des co-cultures avec des cellules normales comme par exemple les cellules du stroma seront sûrement très informatrices. Certains éléments de la ECM peuvent avoir un impact énorme sur la progression tumorale et la croissance et différenciation cellulaire. Un exemple très impressionnant de cet impact est démontré par le biais d'études effectuées sur les cellules mammaires cultivées sous forme de sphéroïdes sur différents substrats. Ainsi, lorsque ces cellules sont implantées sur matrigel, ce qui simule la membrane basale, elles forment des structures polarisées appelées acinis. Ces modèles *in vitro* reproduisent certaines des caractéristiques des glandes *in vivo* telles l'architecture tissulaire et même la capacité de produire du lait [188, 189]. L'étude du modèle sphéroïde dans le contexte de ce modèle des cellules mammaires a même mené à la description d'une nouvelle forme de mort cellulaire appelée l'entose [190]. L'entose est une forme de mort cellulaire par cannibalisme entre deux cellules tumorales. Ainsi, une cellule tumorale « saine » va mourir par internalisation par une autre cellule tumorale avoisinante.

Une autre fonction souvent identifiée comme affectée par la variation des gènes candidats inter-modèles est celle de la structure et de l'adhésion cellulaire. Contrairement à la THBS et au versican dont l'inhibition pourrait promouvoir l'adhésion cellulaire et donc la formation de sphéroïdes compacts, plusieurs gènes important pour l'adhésion cellulaire sont inhibés dans les modèles 3D. Parmi ces gènes on retrouve la fibronectine 1, la cadhérine 6, la villine et les *MARCKS*. L'hypothèse qu'on peut émettre quand à la perte ou l'inhibition des protéines d'adhésion cellulaire est la possible implication de cette dernière dans la progression des cellules vers un phénotype plus agressif et une plus grande capacité d'invasion par exemple dans un contexte de métastases. En effet, il est bien connu que la perte des fonctions adhésives trouvées par exemple au niveau des cellules normales peut engendrer un comportement cellulaire plus agressif [191].

En plus d'identifier des gènes candidats impliqués au niveau de la ECM ou encore de la structure cellulaire, nous avons pu mettre en évidence des gènes candidats faisant

partie de certaines familles de gènes telles des chémokines. Les chémokines font partie de la famille de cytokines pro-inflammatoires qui lient les récepteurs couplés aux protéines G. Les chémokines servent de chémoattractants et leur fonction est d'attirer et activer certains leucocytes dans les réponses inflammatoires [192, 193]. De plus, les chémokines sont également impliquées dans le développement tumoral, la transformation cellulaire et l'angiogenèse [194]. Les chémokines identifiées comme candidates au niveau de notre étude font partie de la famille des chémokines CXC qui sont le plus souvent retrouvées modulées au niveau de différents cancers dont celui de l'ovaire [195].

Finalement, nous avons identifié quelques gènes (dont le *S100A6*, *MSMB* et *ENO1*) qui dans la littérature sont souvent considérés comme des marqueurs de la progression tumorale [196-198]. En effet, la surexpression de ces gènes fut associée avec des maladies plus avancées et agressives. Ces gènes ont été particulièrement intéressants puisqu'ils étaient tous surexprimés dans les modèles 3D et pas dans les cultures en monocouche. Ainsi, ils constituaient des exemples de gènes qu'il serait pertinent d'étudier dans un contexte de modèle 3D plutôt qu'en monocouche.

L'énorme quantité d'information générée par les analyses des profils d'expression génique peut être difficilement gérée dans le cadre d'une seule thèse de doctorat. Cependant, les exemples de gènes candidats mentionnés ci-haut peuvent nous donner plusieurs indications quand à la validité du modèle, les fonctions les plus affectées par les différences de culture, mais également sur l'effet que peut avoir le microenvironnement des cellules. Ce qui est fascinant, c'est que le simple fait de faire croître les cellules sous la forme d'une sphère peut avoir un impact important sur la transcription et par effet même le protéome des cellules composant le modèle.

7.2.1 S100A6

Parmi tous les gènes candidats identifiés par l'analyse des profils d'expression stratifiant les modèles 3D des modèles monocouche, nous avons choisi d'approfondir la

caractérisation du gène *S100A6*. Afin d'affiner notre choix, nous nous sommes concentrés sur les gènes ayant la variation la plus élevée et la plus significative au niveau du signal entre les deux types de modèles. Nous avons ensuite procédé à une revue de la littérature. Ainsi, très peu d'information était disponible quant à la fonction de ce gène cependant, plusieurs publications rapportaient une surexpression de *S100A6* au niveau de différents cancers suggérant un rôle de marqueur de la progression tumorale. Nous avons également vérifié la pertinence de *S100A6* au niveau du cancer épithélial de l'ovaire en vérifiant son expression dans les échantillons tant tumoraux que d'ovaires normaux. En utilisant des micro-étalages de tissus, nous avons pu démontrer que la majorité des tumeurs ovariennes surexpriment *S100A6* et aucun des échantillons normaux n'était positif. Finalement, notre choix fut également influencé par les aspects pratiques soit la disponibilité des outils comme les anticorps.

Ainsi, une fois le résultat des micropuces confirmé, nous avons procédé aux études fonctionnelles reliées à l'expression ou la diminution d'expression de *S100A6* dans nos modèles. Les résultats de cette étude ont été présentés et discutés dans le chapitre 5.

Même si la fonction de *S100A6* n'est encore complètement élucidée, on croit que les protéines de la famille *S100* exercent leurs rôles par la régulation et l'interaction avec des protéines cibles. Différentes protéines cibles ont été identifiées pour *S100A6* soit les annexines II [199], VI [200] et XI [201], le caldesmon [202] et la CacyBp (calcyclin binding protein) [203]. Toutes ces protéines sont encodées par des gènes identifiés dans les analyses de profil d'expression qui sont exprimés de façon différentielles entre les modèles 3D et les monocouches (tableau I page 165).

Title	OV90 L	OV90 LIP	OV90 LSC	OV90 Sa	OV90 Sb	OV90 TIP	OV90 TSC	Fold change
annexin A10	1329.12	707.828	969.921	1493.063	1994.944	1199.739	1434.7	0.65
annexin A6	226.444	199.944	263.766	318.596	667.813	105.315	117.213	0.76
annexin A2	1994.809	2036.368	1926.087	2172.307	2556.755	2685.403	2746.916	0.78
annexin A4	845.414	841.351	855.805	813.495	911.93	1336.135	1263.94	0.78
annexin A2	2043.834	2283.092	2215.07	2467.26	2786.218	2811.03	2946.347	0.79
annexin A2	2172.276	2399.266	2289.45	2467.098	2895.26	2751.969	3134.71	0.81
annexin A11	50	50	50.244	50	57.054	79.455	55.971	0.83
annexin A2	625.839	529.384	615.92	655.708	559.473	786.964	746.706	0.86
annexin A7	262.672	201.493	223.456	258.515	231.724	291.798	240.329	0.90
annexin A8	50	50	50	50	50	50	58.607	0.96
annexin A1	305.015	297.531	268.223	245.236	388.7	203.94	307.579	1.01
annexin A11	373.142	266.799	299.108	275.304	281.061	408.207	224.834	1.05
annexin A2	85.111	50	50	50	72.721	50	50	1.11
annexin A4	859.247	904.736	858.798	574.359	674.75	915.855	965.532	1.12
annexin A5	1159.04	925.43	1035.894	812.415	1206.241	839.826	801.834	1.14
annexin A7	320.118	235.447	315.283	198.219	258.848	194.722	230.842	1.32
annexin A3	515.369	550.636	505.243	186.937	146.143	249.623	372.931	2.19
caldesmon 1	98.425	134.143	123.477	50	53.703	50	50	2.3
caldesmon 1	106.377	157.378	133.475	50	50	50	50	2.6
Siah-interacting	708.127	655.472	735.64	575.546	452.068	534.894	481.501	0.7

Table I. Gènes candidats stratifiant les modèles 3D des modèles monocouches dont les produits de transcription constituent les protéines cibles de S100A6.

Les annexines sont une famille de protéines capables de lier le calcium ainsi que la membrane cellulaire. Parmi les fonctions reconnues de ces protéines on peut citer le trafic des vésicules, la division cellulaire, l'apoptose, la signalisation reliée au calcium et la régulation de la croissance cellulaire [204, 205]. De plus, les variations au niveau de la localisation ou de l'expression des annexines semblent être impliquées dans la progression et le développement tumoral. Les annexines peuvent affecter entre autres les fonctions tumorales telles que l'invasion, l'angiogenèse, l'apoptose et la résistance aux drogues [206]. La caldesmon quant à elle joue un rôle au niveau de la régulation de la dynamique des réseaux de filaments d'actine et des fibres de stress essentielle à la motilité cellulaire et les réarrangements du cytosquelette [207, 208]. Finalement, la CacyBp agirait en amont de S100A6 mais la fonction de cette interaction reste inconnue. Il est connu cependant que cette protéine joue un rôle au niveau du réarrangement du cytosquelette (par son interaction avec la tubuline), la différenciation cellulaire (ERK1/2), la tumorigenèse et la prolifération cellulaire (β -caténine) [209, 210]. Toutes ces protéines n'ont jamais été étudiées dans le contexte d'un modèle 3D. Le modèle sphéroïde que nous avons mis au point pourrait être

un outil de choix afin de démontrer les implications des ces protéines dans le microenvironnement tumoral.

Une étude précédente d'Ohuchida *et al.* a analysé l'implication de S100A6 dans le cancer du pancréas [211]. Dans cette étude, les chercheurs ont effectué la comparaison de profils d'expression entre une lignée du cancer du pancréas exprimant S100A6 et la lignée correspondante où on a inhibée l'expression de S100A6. Les auteurs ont décrits 15 gènes surexprimés et 15 gènes sous-exprimés suite à la modulation de S100A6. En comparant leur liste de gènes candidats à la notre, nous avons trouvé sept gènes en commun qui peuvent donc être potentiellement contrôlé ou du moins interagir avec *S100A6* (Tableau II, page 167).

Symbol	Fonction	OV90 L1	OV90 LIP	OV90 LSC	OV90 Sa	OV90 Sb	OV90 TIP	OV90 TSC	Fold change
PRNP	antiapoptotic effect	224.09	348.90	287.07	50.00	59.55	50.00	52.81	5.4
IL8		227.95	249.70	369.60	50.00	59.78	50.00	50.00	5.4
CXCL2	chemattractant	372.15	365.38	500.72	110.55	126.42	77.42	94.76	4.0
TPM4	actin binding proteins involved in the contractile system of the cytoskeleton of cells	188.43	183.77	182.76	96.41	78.96	89.33	76.00	2.2
ADAMTS1	antiangiogenic activity/inhibitor of endothelial cell proliferation	72.13	120.57	131.88	50.00	50.00	50.00	50.00	2.2
TMPO	proliferation	340.54	336.38	257.53	117.25	154.02	125.79	143.67	2.3
TYMS	metabolism (related to drug sensitivity)	1215.40	1147.18	1087.29	600.43	789.64	811.03	716.77	1.6

Tableau II. Gènes communs entre les analyses d'expression de profils génique des modèles d'EOC ainsi que des analyses des lignées du cancer du pancréas exprimant ou non la protéine S100A6.

Finalement, la diversité des rôles et des actions potentielles des protéines S100 vient également de leur capacité de former des homo- et des hétérodimères [212]. Suite à l'identification de S100A6 comme gène candidat stratifiant les différents modèles, nous avons vérifié les niveaux d'expression des autres protéines de la famille des S100. Ainsi, nous avons identifié deux autres membres de la famille des S100 (S100A13 et S100A4) qui sont différentiellement exprimés entre les modèles 3D et les cultures en monocouches (Figure 3, page 168).

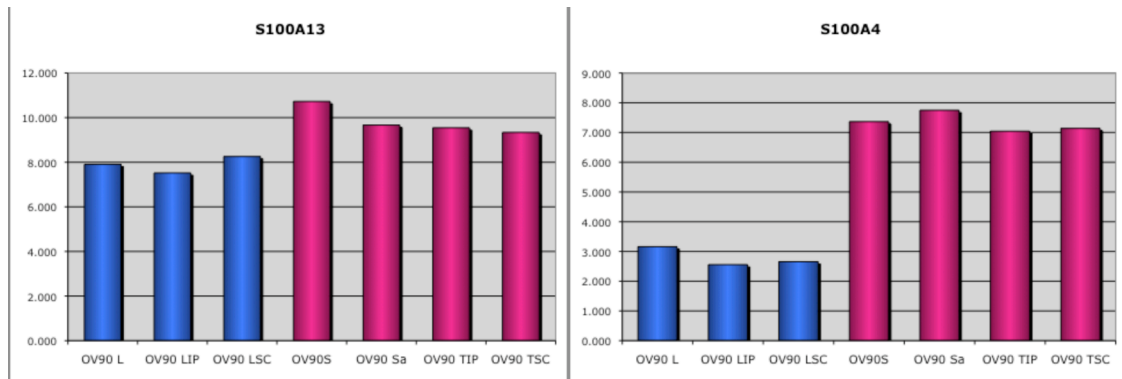


Figure 3. Deux membres de la famille de protéines S100 stratifiant les modèles 3D des modèles monocouche.

Panneau de droite S100A4; la différence entre l'intensité du signal semble très significative, cependant il faut souligner que la qualité du signal au niveau des lignées cultivées en monocouches est faible. Panneau de gauche S100A13; la différence du niveau d'expression entre les deux types de modèles est subtile puisque le « fold change » est autour de 1,2.

Tous ces résultats soulignent le fait que S100A6 peut jouer un rôle important au niveau du microenvironnement tumoral non seulement au niveau de la migration cellulaire comme on l'a vu dans le chapitre 5 mais, par des interactions possibles avec d'autres protéines cibles ou des membres de la famille des protéines S100. Il serait très intéressant dans les études ultérieures d'étudier la modulation de l'expression de ces différents partenaires potentiels de S100A6.

Chapitre 7.3 Les nouvelles lignées d'EOC

Jusqu'à présent très peu de lignées cellulaires du type séreux ont été développées. Pourtant, c'est le type de cancer les plus souvent diagnostiqué. Comme nous visons à développer un modèle *in vitro* le plus représentatif de la maladie EOC *in vivo*, le développement de ces nouvelles lignées représente un avantage important. De plus, nos lignées du type séreux sont les seules développées à partir d'échantillons provenant de patientes qui n'ont subi aucun traitement au moment du prélèvement. Mais ce qui est encore plus intéressant est le fait que nous avons pu développer en parallèle des lignées provenant à la fois de la tumeur solide et de l'ascite d'une même patiente. En utilisant ces échantillons, nous avons effectué une étude préliminaire de comparaison de profils d'expression génique afin d'étudier les différences entre les cellules de tumeurs solides et celles retrouvées dans les ascites. Les ascites sont des liquides inflammatoires souvent volumineux qu'on retrouve chez les patientes atteintes d'EOC et dans lequel on retrouve des cellules tumorales sous forme de cellules séparées mais, également sous forme de sphéroïdes [213]. La dissémination d'EOC est caractérisée par une invasion locale des organes pelvien et abdominaux. De plus, contrairement à la plupart des cancer épithéliaux, la dissémination d'EOC n'utilise que très rarement la vascularisation tumorale pour fins d'invasion [214]. Selon un nouveau modèle de dissémination du EOC, le développement des métastases dans la cavité intrapéritonéale serait dépendante de la capacité des cellules en suspension originaires de la tumeur solide à survivre dans ce nouvel environnement et à s'attacher et infiltrer les tissus de cette cavité [214]. La formation des sphéroïdes ou agrégats cellulaires donnerait un avantage de survie par rapport aux cellules seules en suspension. L'étude comparative des différentes propriétés des lignées de la même patiente prévenant à la fois de la tumeur solide et des cellules contenues dans l'ascite nous permettra d'élucider les transformations que peuvent subir la cellule afin d'acquérir la capacité de se détacher de la tumeur solide, survivre dans l'ascite et ensuite former une métastase.

Suite à une étude préliminaire des gènes candidats exprimés différenciellement entre la lignée dérivée de la tumeur solide et de l'ascite, nous avons identifié entre autre le gène

Sprouty2 (*SPRY2*). Ce gène était sous-exprimé dans les lignées en provenance de l'ascite. De plus, le même gène a été identifié dans les analyses de comparaison de profils d'expression génique entre les cultures primaires des lignées OV (de l'ascite) et TOV (de la tumeur solide). Spry2 semble dans tous les cas être sous-exprimé dans les lignées originaires de l'ascite. Une étude précédente a démontré que la surexpression de *SPRY2* inhiberait la prolifération cellulaire, la croissance en suspension ainsi que la migration cellulaire. En effet, le mouvement des cellules serait restreint dû au fait que *SPRY2* faciliterait l'attachement des cellules en stimulant les adhésions focales et les fibres de stress [215]. Une diminution de l'expression de ce gène serait donc une étape logique qui avantagerait les cellules tumorales en suspension dans l'ascite.

Une autre étude récente a démontré qu'une diminution de l'expression de *SPRY2* par le MicroRNA-21 dans les cellules cardiocytes inhiberait la formation de protrusions cellulaires [216]. Nous avons auparavant remarqué que lorsque les sphéroïdes se retrouvent en présence d'autres cellules, ils ont tendance de former des petites protrusions (Figure 4, page 171). Ce phénomène est surtout flagrant lorsque deux ou plus sphéroïdes sont placés à proximité. Non seulement ils forment ces protrusions assez élégantes mais, ils ont également tendance à s'attirer et fusionner ensemble. Il est donc tentant de spéculer que cette capacité des sphéroïdes à former des protrusion dans un contexte donné pourrait nous permettre l'étude de la fonction de *SPRY2* dans le contexte d'un modèle sphéroïde *in vitro*.

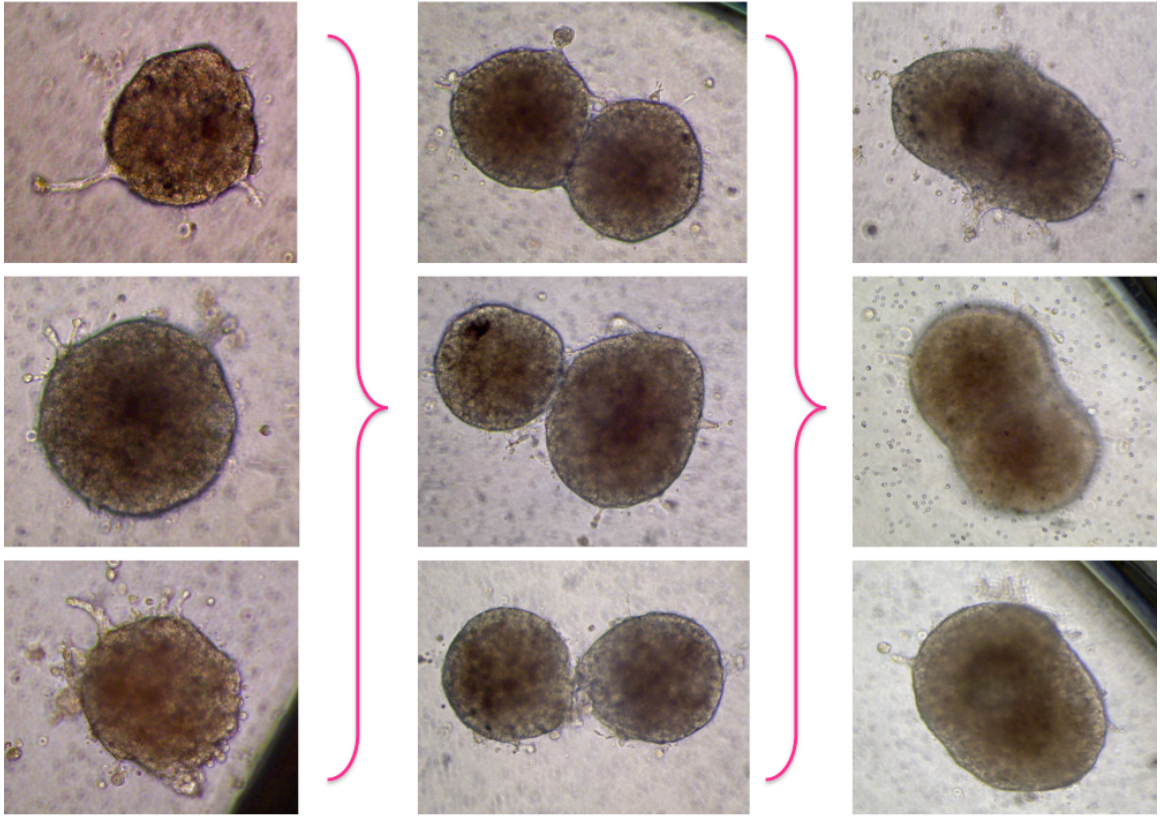


Figure 4. Les sphéroïdes de la lignée OV90 en présence d'autres sphéroïdes de la même lignée forment des protrusions, s'attirent et éventuellement fusionnent ensemble.

Chapitre 8. Conclusion

Afin de mieux comprendre la tumorigenèse ovarienne, la disponibilité de modèles adéquats et adaptés au type de recherche effectuée est indispensable. Le développement de nouveaux modèles de plus en plus représentatifs de la maladie *in vivo* est donc d'une grande importance. Les lignées cellulaires constituent un outil pratique et important pour la recherche sur le cancer, cependant certains aspects fondamentaux de la tumorigenèse *in vivo* ne peuvent être adéquatement représentés par une culture en monocouche. La croissance tridimensionnelle est fondamentale pour la tumorigenèse et de nombreux processus tels que les interactions cellule-cellule, la disponibilité de biofacteurs, nutriments et oxygène et la résistance aux drogues découlent de cette architecture. Nous espérons que le modèle sphéroïde que nous avons développé et les caractérisations et observations que nous avons effectuées serviront de tremplin pour des études de plus en plus poussées, des découvertes intéressantes et que cette méthode de culture facile incitera d'autres groupes à introduire ce type de culture au niveau de leurs recherches. Les interactions cellules-cellules, la structure tridimensionnelle, la présence potentielle des phénomènes d'hypoxie et la modulation des gènes de façon similaire à celle retrouvée *in vivo* sont tous des facteurs que l'on retrouve au niveau du modèle sphéroïde et qui sont différents du modèle en monocouche. Nous croyons donc que le modèle sphéroïde représente un modèle *in vitro* qui a un grand potentiel pour les études de co-cultures mais, surtout dans les études de développement et de prédiction du comportement tumoral en réponse à des nouvelles stratégies thérapeutiques.

Bibliographie

1. Canadian Cancer Society, S.C., Provincial/Territorial Cancer registries, Public Health Agency of Canada, *Canadian Cancer Statistics 2009*. 2009.
2. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Rules for making human tumor cells*. N Engl J Med, 2002. **347**(20): p. 1593-603.
3. Society, A.C. *Cancer facts and figures*. 2003; Available from: www.cancer.org.
4. Jussila, T., *Modelling Cancer: Recapitulation of tumor growth in experimental systems in vivo and in vitro.*, in *Department of Pathology*. 2000, University of Oulu: Oulu.
5. Oller, A.R., et al., *A statistical model to estimate variance in long term-low dose mutation assays: testing of the model in a human lymphoblastoid mutation assay*. Mutat Res, 1989. **216**(3): p. 149-61.
6. Jackson, A.L. and L.A. Loeb, *The mutation rate and cancer*. Genetics, 1998. **148**(4): p. 1483-90.
7. DePinho, R.A., *The age of cancer*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 248-54.
8. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, *Control of the cell cycle and apoptosis*. Eur J Cancer, 1999. **35**(14): p. 1886-94.
9. Motoyama, N. and K. Naka, *DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 11-6.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
11. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
12. Dalmay, T. and D.R. Edwards, *MicroRNAs and the hallmarks of cancer*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6170-5.
13. Mantovani, A., *Cancer: Inflaming metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 36-7.
14. Esteller, M., *Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes*. Eur J Cancer, 2000. **36**(18): p. 2294-300.
15. Artandi, S.E., et al., *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 641-5.
16. Shannon, M., *An empathetic look at overweight*. CCL Family Found, 1993. **20**(3): p. 3, 5.
17. Lutgendorf, S.K., et al., *Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(12): p. 4514-21.
18. Barrett, J.C., P.W. Lamb, and R.W. Wiseman, *Multiple mechanisms for the carcinogenic effects of asbestos and other mineral fibers*. Environ Health Perspect, 1989. **81**: p. 81-9.
19. Shields, P.G., *Tobacco smoking, harm reduction, and biomarkers*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(19): p. 1435-44.
20. Chow, V.T., *Cancer and viruses*. Ann Acad Med Singapore, 1993. **22**(2): p. 163-9.
21. cancer, S.c.d.; Available from: www.cancer.ca.

22. Cvetkovic, D., *Early events in ovarian oncogenesis*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**(1): p. 68.
23. Guastalla, J.D.e.J.-P., *Cancer de l'ovaire*. 1996: Arnette Blackwell SA.
24. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. Éditions du nouveau pédagogique ed. 1992.
25. Wilhelm, D., S. Palmer, and P. Koopman, *Sex determination and gonadal development in mammals*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 1-28.
26. Sekido, R., *SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination*. *Int J Biochem Cell Biol*. **42**(3): p. 417-20.
27. Nikolova, G. and E. Vilain, *Mechanisms of disease: Transcription factors in sex determination--relevance to human disorders of sex development*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006. **2**(4): p. 231-8.
28. Nef, S. and J.D. Vassalli, *Complementary pathways in mammalian female sex determination*. *J Biol*, 2009. **8**(8): p. 74.
29. Hoang-Ngoc, M., et al., [*Histologic study of the gonads in ovarian differentiation during organogenesis*]. *Arch Anat Cytol Pathol*, 1989. **37**(5-6): p. 201-7.
30. Satoh, M., *Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos*. *J Anat*, 1991. **177**: p. 85-107.
31. Minh, H.N., A. Smadja, and M. Prade, [*Classification of ovarian tumors based on embryogenesis*]. *Arch Anat Cytol Pathol*, 1995. **43**(3): p. 126-39.
32. Naora, H. and D.J. Montell, *Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(5): p. 355-66.
33. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 255-88.
34. Choi, K.C. and N. Auersperg, *The ovarian surface epithelium: simple source of a complex disease*. *Minerva Ginecol*, 2003. **55**(4): p. 297-314.
35. Wong, A.S. and N. Auersperg, *Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**(1): p. 70.
36. Katabuchi, H. and H. Okamura, *Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis*. *Med Electron Microsc*, 2003. **36**(2): p. 74-86.
37. Calas, A., Perrin, J., Plas, C., and Vanneste, P.,. *Précis de physiologie*. Doin Éditeurs, Vélizi Cedex. ed. 1997.
38. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. *Cancer*, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
39. Scully RE, Y.R., Clement PB., *Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament*. Thirs Series, Fascicle 23. 1998, Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology.
40. Berek JS, H.N., *Nonepithelial ovarian and tubal cancers.*, ed. H. Berek JS. Vol. Practical gynecologic oncology, 3rd ed. 2000, Baltimore, MA: Lippincott, Williams & Wilkins.
41. Hoskins, W.J., Young, R.C, Markma, M., Preze, A.P., Barakat, R.R., Randall, M., *Principles and Practice of Gynecologic oncology*. Lippincott, Williams & Wilkins ed, ed. t. edition. 2005, Philadelphie.

42. Schumer, S.T. and S.A. Cannistra, *Granulosa cell tumor of the ovary*. J Clin Oncol, 2003. **21**(6): p. 1180-9.
43. Franco, E.L., and Rohan, T.E., *Cancer Precursors; Epidemiology, Detection and Prevention*. Springer-Varlag New York inc. ed. 2002, New York, NY.
44. Ray-Coquard, I., *Ovarian germ-cell malignant tumors*. Orphanet Encyclopedia, 2004.
45. Channel, O.; Available from: <http://www.oncologychannel.com/ovariancancer/index.shtml>.
46. Aebi, S. and M. Castiglione, *Newly and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2009. **20 Suppl 4**: p. 21-3.
47. Bell, D.A. and R.E. Scully, *Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases*. Cancer, 1994. **73**(7): p. 1859-64.
48. Colombo, N., et al., *Ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **60**(2): p. 159-79.
49. Soslow, R.A., *Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 161-74.
50. Gilks, C.B. and J. Prat, *Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances*. Hum Pathol, 2009. **40**(9): p. 1213-23.
51. Siskind, V., et al., *Beyond ovulation: oral contraceptives and epithelial ovarian cancer*. Epidemiology, 2000. **11**(2): p. 106-10.
52. Gwinn, M.L., et al., *Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer*. J Clin Epidemiol, 1990. **43**(6): p. 559-68.
53. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* Lancet, 1971. **2**(7716): p. 163.
54. Fredrickson, T.N., *Ovarian tumors of the hen*. Environ Health Perspect, 1987. **73**: p. 35-51.
55. Riman, T., I. Persson, and S. Nilsson, *Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence*. Clin Endocrinol (Oxf), 1998. **49**(6): p. 695-707.
56. Preston-Martin, S., et al., *Increased cell division as a cause of human cancer*. Cancer Res, 1990. **50**(23): p. 7415-21.
57. Godwin, A.K., et al., *Growth regulation of ovarian cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**(4): p. 829-41.
58. Testa, J.R., et al., *Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells results in well to poorly differentiated tumors with a parallel range of cytogenetic complexity*. Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2778-84.
59. Auersperg, N., T. Ota, and G.W. Mitchell, *Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches*. Int J Gynecol Cancer, 2002. **12**(6): p. 691-703.
60. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **247**(1-2): p. 4-21.

61. Deligdisch, L., et al., *Ovarian dysplasia in epithelial inclusion cysts. A morphometric approach using neural networks.* *Cancer*, 1995. **76**(6): p. 1027-34.
62. Scully, R.E., *Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions.* *Int J Gynaecol Obstet*, 1995. **49 Suppl**: p. S9-15.
63. Scully, R.E., *Pathology of ovarian cancer precursors.* *J Cell Biochem Suppl*, 1995. **23**: p. 208-18.
64. Ziltener, H.J., et al., *Secretion of bioactive interleukin-1, interleukin-6, and colony-stimulating factors by human ovarian surface epithelium.* *Biol Reprod*, 1993. **49**(3): p. 635-41.
65. Berchuck, A., et al., *Growth regulation and transformation of ovarian epithelium.* *Cancer*, 1993. **71**(2 Suppl): p. 545-51.
66. Bast, R.C., Jr., et al., *Cell growth regulation in epithelial ovarian cancer.* *Cancer*, 1993. **71**(4 Suppl): p. 1597-601.
67. Whittemore, A.S., R. Harris, and J. Itnyre, *Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group.* *Am J Epidemiol*, 1992. **136**(10): p. 1212-20.
68. Rossing, M.A., et al., *Ovarian tumors in a cohort of infertile women.* *N Engl J Med*, 1994. **331**(12): p. 771-6.
69. Mandai, M., et al., *LH/hCG action and development of ovarian cancer--a short review on biological and clinical/epidemiological aspects.* *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **269**(1-2): p. 61-4.
70. Risch, H.A., *Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone.* *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(23): p. 1774-86.
71. Schildkraut, J.M., et al., *Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome.* *Obstet Gynecol*, 1996. **88**(4 Pt 1): p. 554-9.
72. Wakeley, K.E. and E.C. Grendys, *Reproductive technologies and risk of ovarian cancer.* *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2000. **12**(1): p. 43-7.
73. Konishi, I., H. Kuroda, and M. Mandai, *Review: gonadotropins and development of ovarian cancer.* *Oncology*, 1999. **57 Suppl 2**: p. 45-8.
74. Shoham, Z., *Epidemiology, etiology, and fertility drugs in ovarian epithelial carcinoma: where are we today?* *Fertil Steril*, 1994. **62**(3): p. 433-48.
75. Capen, C.C., *Mechanisms of hormone-mediated carcinogenesis of the ovary.* *Toxicol Pathol*, 2004. **32 Suppl 2**: p. 1-5.
76. Lukanova, A. and R. Kaaks, *Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(1): p. 98-107.
77. Harris, R., A.S. Whittemore, and J. Itnyre, *Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group.* *Am J Epidemiol*, 1992. **136**(10): p. 1204-11.

78. Adami, H.O., et al., *Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer*. Lancet, 1994. **344**(8932): p. 1250-4.
79. Keri, R.A., et al., *Luteinizing hormone induction of ovarian tumors: oligogenic differences between mouse strains dictates tumor disposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 383-7.
80. Samson, J., *Endometrical carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ*. Arch. Surg, 1925. **10**: p. 1-72.
81. Sueblinvong, T. and M.E. Carney, *Current understanding of risk factors for ovarian cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2009. **10**(1-2): p. 67-81.
82. Kobayashi, H., *Ovarian cancer in endometriosis: epidemiology, natural history, and clinical diagnosis*. Int J Clin Oncol, 2009. **14**(5): p. 378-82.
83. Mandai, M., et al., *Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management*. Int J Clin Oncol, 2009. **14**(5): p. 383-91.
84. Wellbery, C., *Diagnosis and treatment of endometriosis*. Am Fam Physician, 1999. **60**(6): p. 1753-62, 1767-8.
85. Brinton, L.A., et al., *Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **176**(3): p. 572-9.
86. Vlahos, N.F., K.P. Economopoulos, and S. Fotiou, *Endometriosis, in vitro fertilisation and the risk of gynaecological malignancies, including ovarian and breast cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. **24**(1): p. 39-50.
87. Rossing, M.A., et al., *Risk of epithelial ovarian cancer in relation to benign ovarian conditions and ovarian surgery*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(10): p. 1357-64.
88. Piek, J.M., et al., *Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer*. J Pathol, 2001. **195**(4): p. 451-6.
89. Carcangiu, M.L., et al., *Atypical epithelial proliferation in fallopian tubes in prophylactic salpingo-oophorectomy specimens from BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers*. Int J Gynecol Pathol, 2004. **23**(1): p. 35-40.
90. Finch, A., et al., *Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(1): p. 58-64.
91. Leeper, K., et al., *Pathologic findings in prophylactic oophorectomy specimens in high-risk women*. Gynecol Oncol, 2002. **87**(1): p. 52-6.
92. Medeiros, F., et al., *The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(2): p. 230-6.
93. Kindelberger, D.W., et al., *Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(2): p. 161-9.
94. Levanon, K., C. Crum, and R. Drapkin, *New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact*. J Clin Oncol, 2008. **26**(32): p. 5284-93.

95. Karst, A.M. and R. Drapkin, *Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution*. J Oncol. **2010**: p. 932371.
96. Stone, M.L. and A.B. Weingold, *Factors affecting survival of patients with ovarian carcinoma*. Clin Obstet Gynecol, 1969. **12**(4): p. 1025-37.
97. Bast, R.C., Jr., et al., *Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma*. J Clin Invest, 1981. **68**(5): p. 1331-7.
98. Woolas, R.P., et al., *Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(21): p. 1748-51.
99. Ghaemmaghami, F., M. Karimi Zarchi, and B. Hamed, *High levels of CA125 (over 1,000 IU/ml) in patients with gynecologic disease and no malignant conditions: three cases and literature review*. Arch Gynecol Obstet, 2007. **276**(5): p. 559-61.
100. Malkasian, G.D., Jr., et al., *Preoperative evaluation of serum CA 125 levels in premenopausal and postmenopausal patients with pelvic masses: discrimination of benign from malignant disease*. Am J Obstet Gynecol, 1988. **159**(2): p. 341-6.
101. Markman, M., *Optimizing primary chemotherapy in ovarian cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2003. **17**(4): p. 957-68, viii.
102. Bast, R.C., Jr., et al., *New tumor markers: CA125 and beyond*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15 Suppl 3**: p. 274-81.
103. Schorge, J.O., et al., *SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance*. Gynecol Oncol. **119**(1): p. 7-17.
104. Fader, A.N. and P.G. Rose, *Role of surgery in ovarian carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(20): p. 2873-83.
105. Vergote, I., et al., *Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma*. Lancet, 2001. **357**(9251): p. 176-82.
106. Simone, N.L., et al., *Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics*. Mol Diagn, 2000. **5**(4): p. 301-7.
107. Simone, N.L., et al., *Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis*. Trends Genet, 1998. **14**(7): p. 272-6.
108. Fend, F. and M. Raffeld, *Laser capture microdissection in pathology*. J Clin Pathol, 2000. **53**(9): p. 666-72.
109. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
110. Battifora, H., *The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing*. Lab Invest, 1986. **55**(2): p. 244-8.
111. Snell, G.D., *Biology of the laboratory mouse, in the Jackson Laboratory*, ed. F. Edition. 1941, New York, NY: Dover Publications Inc.
112. DePinho, R.A. and T. Jacks, *Introduction. The laboratory mouse in cancer research*. Semin Cancer Biol, 2001. **11**(3): p. 175-6.
113. Fong, M.Y. and S.S. Kakar, *Ovarian cancer mouse models: a summary of current models and their limitations*. J Ovarian Res, 2009. **2**(1): p. 12.
114. Vanderhyden, B.C., T.J. Shaw, and J.F. Ethier, *Animal models of ovarian cancer*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 67.

115. Perel, P., et al., *Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review*. *BMJ*, 2007. **334**(7586): p. 197.
116. Walsh, K.M. and J. Poteracki, *Spontaneous neoplasms in control Wistar rats*. *Fundam Appl Toxicol*, 1994. **22**(1): p. 65-72.
117. Gregson, R.L., D.J. Lewis, and D.P. Abbott, *Spontaneous ovarian neoplasms of the laboratory rat*. *Vet Pathol*, 1984. **21**(3): p. 292-9.
118. Kelland, L.R., *Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(6): p. 827-36.
119. Rygaard, J. and C.O. Povlsen, *Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1969. **77**(4): p. 758-60.
120. Kerbel, R.S., *Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved*. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(4 Suppl 1): p. S134-9.
121. Fidler, I.J., et al., *Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment*. *Cancer Metastasis Rev*, 1994. **13**(2): p. 209-22.
122. Killion, J.J., R. Radinsky, and I.J. Fidler, *Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(3): p. 279-84.
123. Fidler, I.J., *The organ microenvironment and cancer metastasis*. *Differentiation*, 2002. **70**(9-10): p. 498-505.
124. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
125. Le Page, C., et al., *Signature of a silent killer: expression profiling in epithelial ovarian cancer*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004. **4**(2): p. 157-67.
126. Alama, A., et al., *Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas*. *Gynecol Oncol*, 1996. **62**(1): p. 82-8.
127. Buller, R.E., et al., *Isolation and preliminary characterization of an ovarian carcinoma cell line from a patient with familial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 1995. **56**(1): p. 39-44.
128. Golombick, T., et al., *Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cell lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth characteristics, biochemical, and cytogenetic studies*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990. **26**(5): p. 447-54.
129. Grunt, T.W., et al., *Different propensity for spontaneous differentiation of cell clones isolated from the human ovarian surface epithelial cell line HOC-7*. *Differentiation*, 1993. **53**(1): p. 45-50.
130. Hamilton, T.C., et al., *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors*. *Cancer Res*, 1983. **43**(11): p. 5379-89.
131. Wong, W.S., et al., *Establishment and characterization of a new human cell line derived from ovarian clear cell carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1990. **38**(1): p. 37-45.

132. Yamada, T., et al., *Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary*. *Gynecol Oncol*, 1991. **40**(2): p. 118-28.
133. Langdon, S.P., et al., *Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines*. *Cancer Res*, 1988. **48**(21): p. 6166-72.
134. Hirte, H.W., J.S. Kaiser, and S. Bacchetti, *Establishment and characterization of four human epithelial ovarian carcinoma cell lines*. *Cancer*, 1994. **74**(3): p. 900-6.
135. Nishikawa, Y., et al., *Establishment of a novel human ovarian cancer cell line with high anchorage-independent growth ability*. *Int J Oncol*, 2003. **23**(6): p. 1679-86.
136. Mobus, V., et al., *Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines*. *Int J Cancer*, 1992. **52**(1): p. 76-84.
137. Provencher, D.M., et al., *Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000. **36**(6): p. 357-61.
138. Sutherland, R.M., J.A. McCredie, and W.R. Inch, *Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas*. *J Natl Cancer Inst*, 1971. **46**(1): p. 113-20.
139. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. *Science*, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
140. Sutherland, R.M., H.R. MacDonald, and R.L. Howell, *Multicellular spheroids: a new model target for in vitro studies of immunity to solid tumor allografts*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **58**(6): p. 1849-53.
141. Mueller-Klieser, W., *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(4 Pt 1): p. C1109-23.
142. Hirschhaeuser, F., et al., *Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again*. *J Biotechnol*. **148**(1): p. 3-15.
143. Thiery, J.P. and D. Chopin, *Epithelial cell plasticity in development and tumor progression*. *Cancer Metastasis Rev*, 1999. **18**(1): p. 31-42.
144. Heppner, G.H. and F.R. Miller, *The cellular basis of tumor progression*. *Int Rev Cytol*, 1998. **177**: p. 1-56.
145. Friedrich, J., R. Ebner, and L.A. Kunz-Schughart, *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?* *Int J Radiat Biol*, 2007. **83**(11-12): p. 849-71.
146. Mueller-Klieser, W., *Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1987. **113**(2): p. 101-22.
147. Desoize, B. and J. Jardillier, *Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?* *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000. **36**(2-3): p. 193-207.
148. Kunz-Schughart, L.A., M. Kreutz, and R. Knuechel, *Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology*. *Int J Exp Pathol*, 1998. **79**(1): p. 1-23.
149. Dubessy, C., et al., *Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000. **36**(2-3): p. 179-92.

150. Kunz-Schughart, L.A., et al., *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model*. J Biomol Screen, 2004. **9**(4): p. 273-85.
151. Durand, R.E. and P.L. Olive, *Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids*. Methods Cell Biol, 2001. **64**: p. 211-33.
152. Santini, M.T., G. Rainaldi, and P.L. Indovina, *Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **36**(2-3): p. 75-87.
153. Kim, J.B., R. Stein, and M.J. O'Hare, *Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **85**(3): p. 281-91.
154. Schwarz, R.P., T.J. Goodwin, and D.A. Wolf, *Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity*. J Tissue Cult Methods, 1992. **14**(2): p. 51-7.
155. Tan, Y., et al., *Metallothionein expression and nuclear size in benign, borderline, and malignant serous ovarian tumours*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 60-5.
156. Tan, W., R. Krishnaraj, and T.A. Desai, *Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 203-10.
157. Kelm, J.M., et al., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. Biotechnol Bioeng, 2003. **83**(2): p. 173-80.
158. Markovitz-Bishitz, Y., et al., *A polymer microstructure array for the formation, culturing, and high throughput drug screening of breast cancer spheroids*. Biomaterials.
159. Yu, L., M.C. Chen, and K.C. Cheung, *Droplet-based microfluidic system for multicellular tumor spheroid formation and anticancer drug testing*. Lab Chip.
160. Gidrol, X., et al., *2D and 3D cell microarrays in pharmacology*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(5): p. 664-8.
161. Wenning, L.A. and R.M. Murphy, *Coupled cellular trafficking and diffusional limitations in delivery of immunotoxins to multicell tumor spheroids*. Biotechnol Bioeng, 1999. **62**(5): p. 562-75.
162. Martin, C., et al., *The expression of P-glycoprotein does influence the distribution of novel fluorescent compounds in solid tumour models*. Br J Cancer, 2003. **89**(8): p. 1581-9.
163. Mairs, R.J., et al., *Differential penetration of targeting agents into multicellular spheroids derived from human neuroblastoma*. Prog Clin Biol Res, 1991. **366**: p. 495-501.
164. Cody, N.A., et al., *Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p*. Oncogene, 2007. **26**(4): p. 618-32.

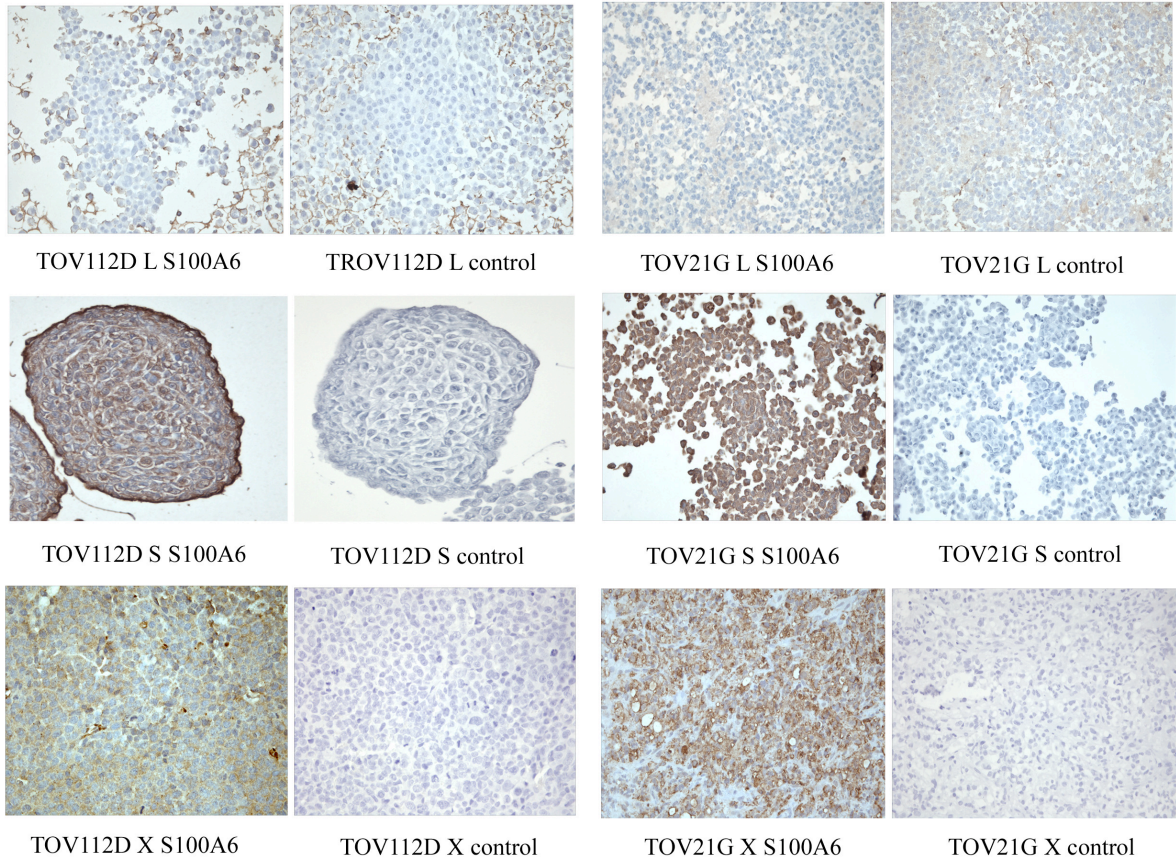
165. Alford, D. and J. Taylor-Papadimitriou, *Cell adhesion molecules in the normal and cancerous mammary gland*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1996. **1**(2): p. 207-18.
166. Jones, J.L., D.R. Critchley, and R.A. Walker, *Alteration of stromal protein and integrin expression in breast--a marker of premalignant change?* J Pathol, 1992. **167**(4): p. 399-406.
167. Howlett, A.R., et al., *Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 5)**: p. 1945-57.
168. Umbas, R., et al., *Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(18): p. 5104-9.
169. Christofori, G. and H. Semb, *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(2): p. 73-6.
170. Zutter, M.M., G. Mazoujian, and S.A. Santoro, *Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast*. Am J Pathol, 1990. **137**(4): p. 863-70.
171. Gottfried, E., et al., *Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions*. Cell Cycle, 2006. **5**(7): p. 691-5.
172. Bissell, M.J., H.G. Hall, and G. Parry, *How does the extracellular matrix direct gene expression?* J Theor Biol, 1982. **99**(1): p. 31-68.
173. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 69-125.
174. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. Trends Immunol. **31**(6): p. 220-7.
175. Hayashi, N. and G.R. Cunha, *Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the Dunning prostatic adenocarcinoma*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4924-30.
176. Cooper, M. and H. Pinkus, *Intrauterine transplantation of rat basal cell carcinoma as a model for reconversion of malignant to benign growth*. Cancer Res, 1977. **37**(8 Pt 1): p. 2544-52.
177. Shekhar, M.P., et al., *Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1320-6.
178. Tlsty, T.D. and P.W. Hein, *Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(1): p. 54-9.
179. Timmins, N.E., S. Dietmair, and L.K. Nielsen, *Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis*. Angiogenesis, 2004. **7**(2): p. 97-103.
180. Stewart, D.A., C.R. Cooper, and R.A. Sikes, *Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**(1): p. 2.

181. Sid, B., et al., *Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49**(3): p. 245-58.
182. Bost, F., M. Diarra-Mehrpour, and J.P. Martin, *Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix*. Eur J Biochem, 1998. **252**(3): p. 339-46.
183. Bornstein, P. and E.H. Sage, *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 608-16.
184. Yamagata, M. and K. Kimata, *Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 9)**: p. 2581-90.
185. Yamagata, M., et al., *Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 8012-8.
186. Ang, L.C., et al., *Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(6): p. 597-605.
187. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 617-23.
188. Debnath, J., S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures*. Methods, 2003. **30**(3): p. 256-68.
189. Mailleux, A.A., M. Overholtzer, and J.S. Brugge, *Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models*. Cell Cycle, 2008. **7**(1): p. 57-62.
190. Mailleux, A.A., M. Overholtzer, and J.S. Brugge, *[Entosis, a cell death process related to cell cannibalism between tumor cells]*. Med Sci (Paris), 2008. **24**(3): p. 246-8.
191. Sundfeldt, K., *Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule*. Mol Cell Endocrinol, 2003. **202**(1-2): p. 89-96.
192. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-99.
193. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-60.
194. Keeley, E.C., B. Mehrad, and R.M. Strieter, *CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases*. Adv Cancer Res. **106**: p. 91-111.
195. Arya, M., H.R. Patel, and M. Williamson, *Chemokines: key players in cancer*. Curr Med Res Opin, 2003. **19**(6): p. 557-64.
196. Pancholi, V., *Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(7): p. 902-20.
197. Weiber, H., et al., *Beta-microseminoprotein in gastric carcinoids: a marker of tumour progression*. Digestion, 1999. **60**(5): p. 440-8.

198. Bronckart, Y., et al., *Development and progression of malignancy in human colon tissues are correlated with expression of specific Ca(2+)-binding S100 proteins*. *Histol Histopathol*, 2001. **16**(3): p. 707-12.
199. Filipek, A., et al., *Characterization of the cell-cycle-regulated protein calyculin from Ehrlich ascites tumor cells. Identification of two binding proteins obtained by Ca2(+)-dependent affinity chromatography*. *Eur J Biochem*, 1991. **195**(3): p. 795-800.
200. Zeng, F.Y., V. Gerke, and H.J. Gabius, *Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calyculin-binding proteins in bovine heart*. *Int J Biochem*, 1993. **25**(7): p. 1019-27.
201. Tokumitsu, H., et al., *Molecular cloning of rabbit CAP-50, a calyculin-associated annexin protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **186**(3): p. 1227-35.
202. Mani, R.S. and C.M. Kay, *Calcium-dependent regulation of the caldesmon-heavy meromyosin interaction by caltropin*. *Biochemistry*, 1993. **32**(41): p. 11217-23.
203. Filipek, A. and U. Wojda, *p30, a novel protein target of mouse calyculin (S100A6)*. *Biochem J*, 1996. **320** (Pt 2): p. 585-7.
204. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 331-71.
205. Rescher, U. and V. Gerke, *Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 13): p. 2631-9.
206. Mussunoor, S. and G.I. Murray, *The role of annexins in tumour development and progression*. *J Pathol*, 2008. **216**(2): p. 131-40.
207. Lin, J.J., et al., *Chapter 1: roles of caldesmon in cell motility and actin cytoskeleton remodeling*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009. **274**: p. 1-68.
208. Dabrowska, R., N. Kulikova, and M. Gagola, *Nonmuscle caldesmon: its distribution and involvement in various cellular processes. Review article*. *Protoplasma*, 2004. **224**(1-2): p. 1-13.
209. Schneider, G. and A. Filipek, *S100A6 binding protein and Siah-1 interacting protein (CacyBP/SIP): spotlight on properties and cellular function*. *Amino Acids*.
210. Huber, P.A., *Caldesmon*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. **29**(8-9): p. 1047-51.
211. Ohuchida, K., et al., *The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinical implication as a diagnostic marker and therapeutic target*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(21): p. 7785-93.
212. Santamaria-Kisiel, L., A.C. Rintala-Dempsey, and G.S. Shaw, *Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family*. *Biochem J*, 2006. **396**(2): p. 201-14.
213. Allen, H.J., et al., *Isolation and morphologic characterization of human ovarian carcinoma cell clusters present in effusions*. *Exp Cell Biol*, 1987. **55**(4): p. 194-208.
214. Shield, K., et al., *Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology*. *Gynecol Oncol*, 2009. **113**(1): p. 143-8.
215. Lee, C.C., et al., *Overexpression of sprouty 2 inhibits HGF/SF-mediated cell growth, invasion, migration, and cytokinesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(30): p. 5193-202.

216. Sayed, D., et al., *MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3272-82.

Annexe I. Figures supplémentaires du chapitre 4



Supplementary figure 1. S100A6 expression at protein level in paraffin embedded TOV21G and TOV112D cell lines, spheroids and xenografts.

A strong immuno-staining is observed in spheroids and xenografts but not in monolayer cultures.

Gene symbol	Primer direction	Primer sequence from 5' to 3'	Annealing temperature	PCR reaction efficiency*
S100A6	F	ccggcagggagggtgacaa	55	1,05
S100A6	R	ggccccaggaaggtgacatac	55	1,05
MSMB1	F	tgggcagcgttgatctttg	55	1,22
MSMB1	R	cctgggagccctgtgctacta	55	1,22
THBS1	F	ctgatccccacccttactca	59	1,16
THBS1	R	agctggtgctcactgagatg	59	1,16
GAPDH	F	cgggaagctcactggcatggc	59	1,08
GAPDH	R	ggtggaggagtgggtgtcgtgtt	59	1,08

* The efficiency was calculated by the Rotor-Gene software

Supplementary Table I. Primer sequences and conditions used for Q-PCR experiments.

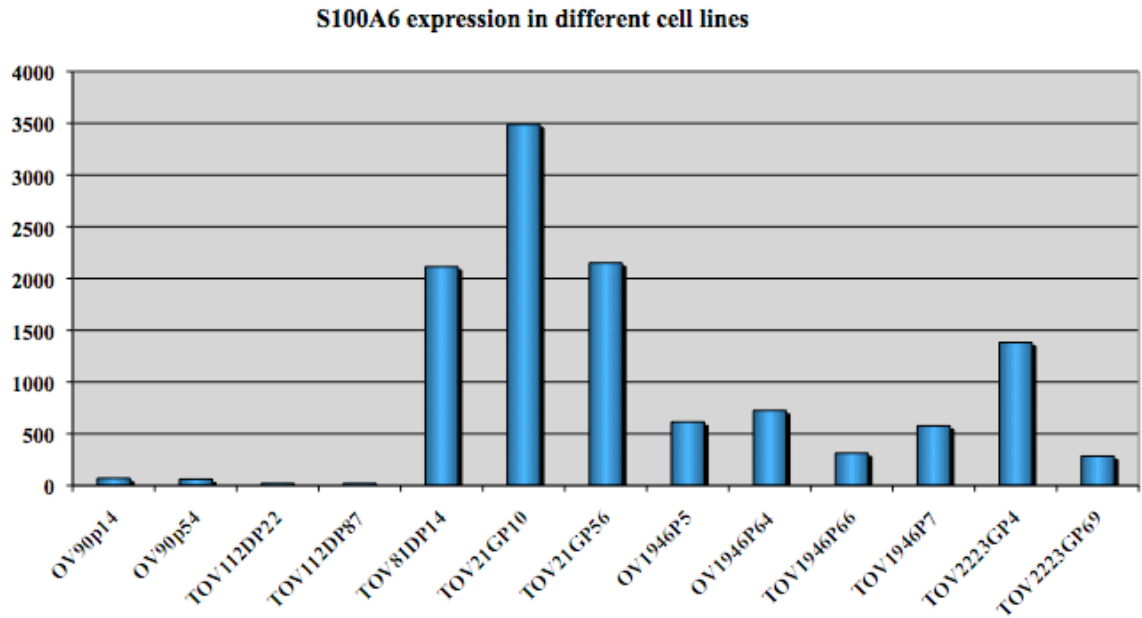
Table II. Six hundred and ten probe sets which significantly separate the two groups of model systems (monolayers versus spheroids and xenografts) for the OV-90 cell line.

This table can be found at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0899-1987/suppmat/index.html>. S1 and S2: spheroids collected at day 4 and 7 respectively of culture. TSC: subcutaneous xenograft and TIP: intraperitoneal xenograft. L: original cell line, LIP: cell line derived from an intraperitoneal xenograft, LSC: cell line derived from a subcutaneous xenograft. It should be noted that fold change and p values were calculated based on the comparison between 3-D models (spheroids and xenografts) and monolayer cultures.

Table III. GO terms molecular function analysis.

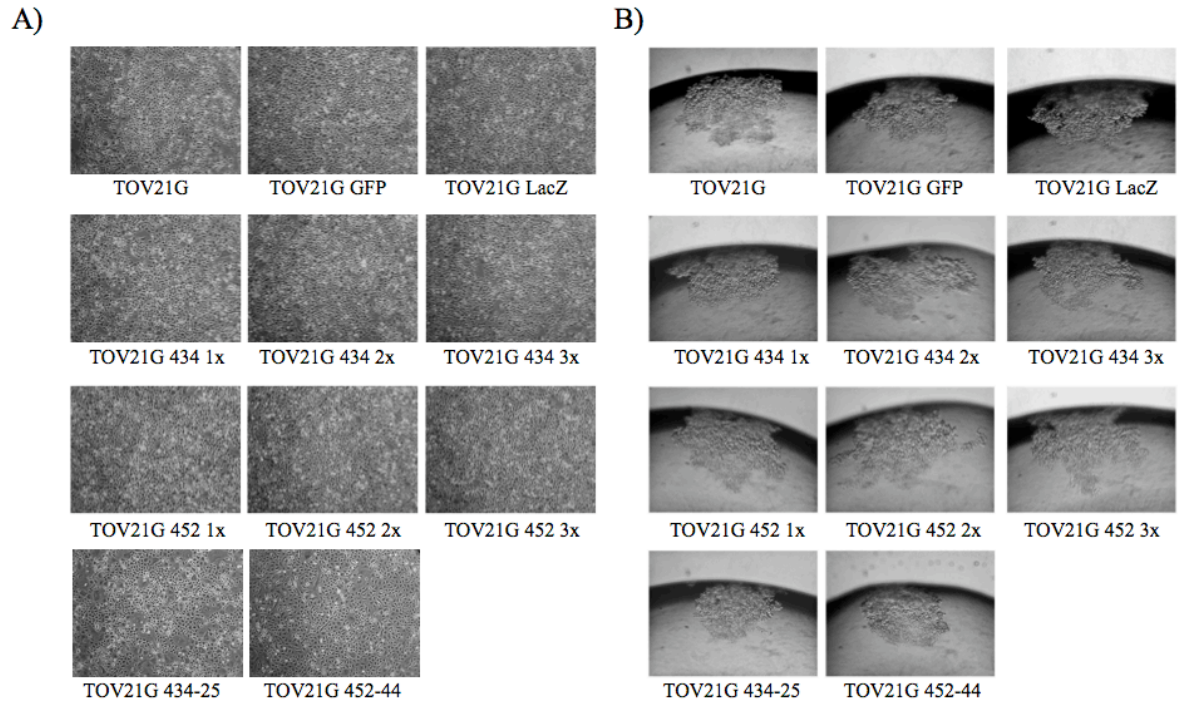
This table can be found at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0899-1987/suppmat/index.html>. ListCount represents number of genes corresponding to the GO term found among the 610 candidate genes stratifying monolayer cultures from 3D models identified using the OV90 cell lines. ChipCount represents the number of genes corresponding to the GO term found among all the genes on the microarray.

Annexe II. Figures supplémentaires chapitre 5



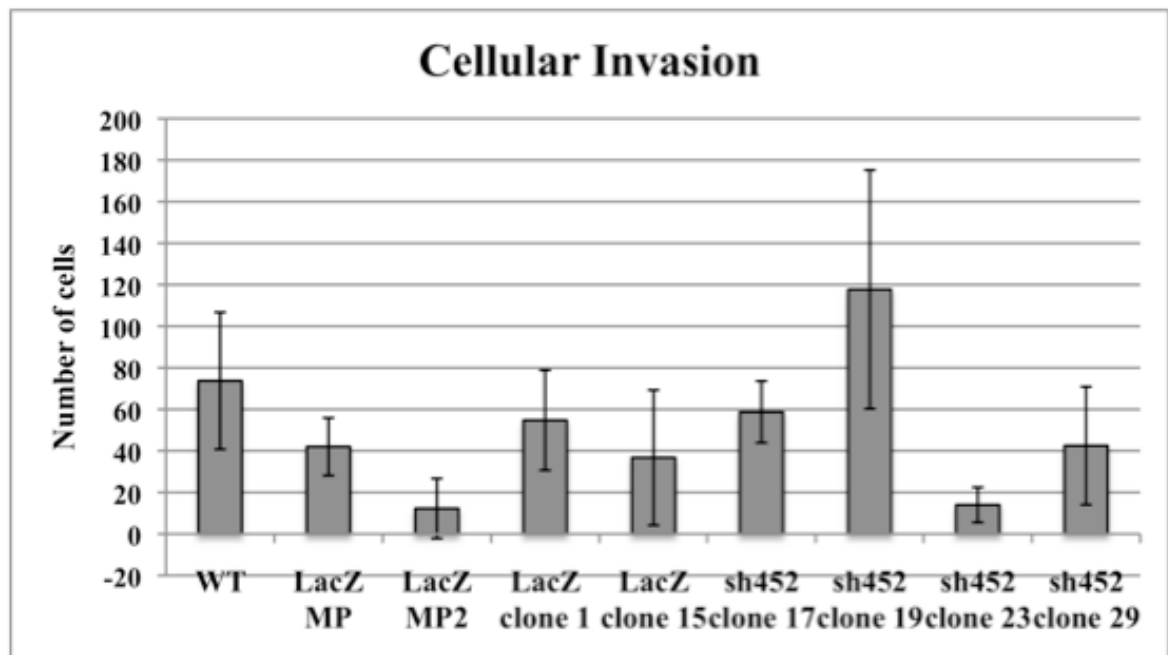
Supplementary Figure 1. S100A6 expression in different EOC cell lines.

EOC cell lines express very little or no S100A6 as verified by microarray analysis using Affymetrix HG-U133A high density DNA array. TOV21G is the only one of our aggressive EOC cell lines that over-expresses S100A6 in a monolayer.



Supplementary Figure 2. Morphology of the TOV-21G cell lines cultured as monolayers or spheroids.

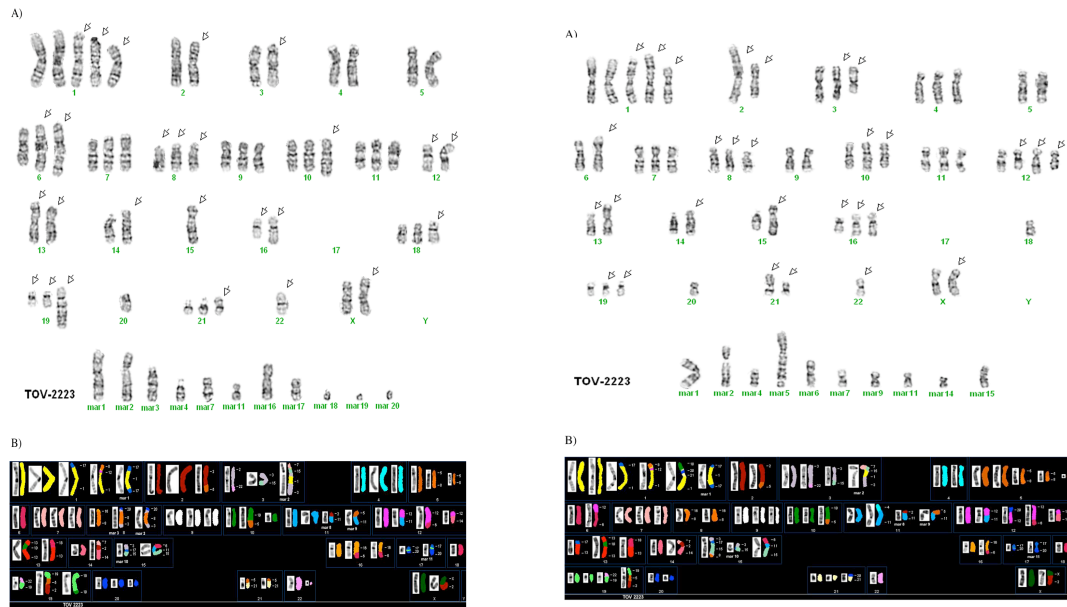
A) Cellular morphology was not affected by S100A6 inhibition. B) Greater aggregate density was not apparent at day five of culture in hanging droplets.



Supplementary Figure 3. Cellular invasion of OV-90 cells was assayed using the modified Boyden chambers.

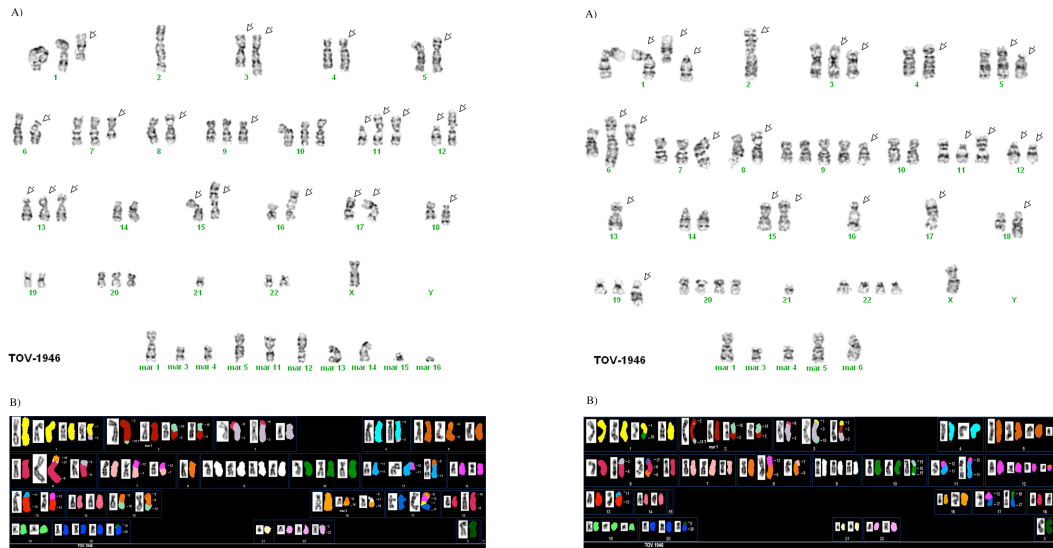
The capability of the cells cultured as monolayers to invade through matrigel membranes was verified and the invasion potential did not vary significantly between the controls and shS100A6 cell lines.

Annexe III. Figures supplémentaires du chapitre 6



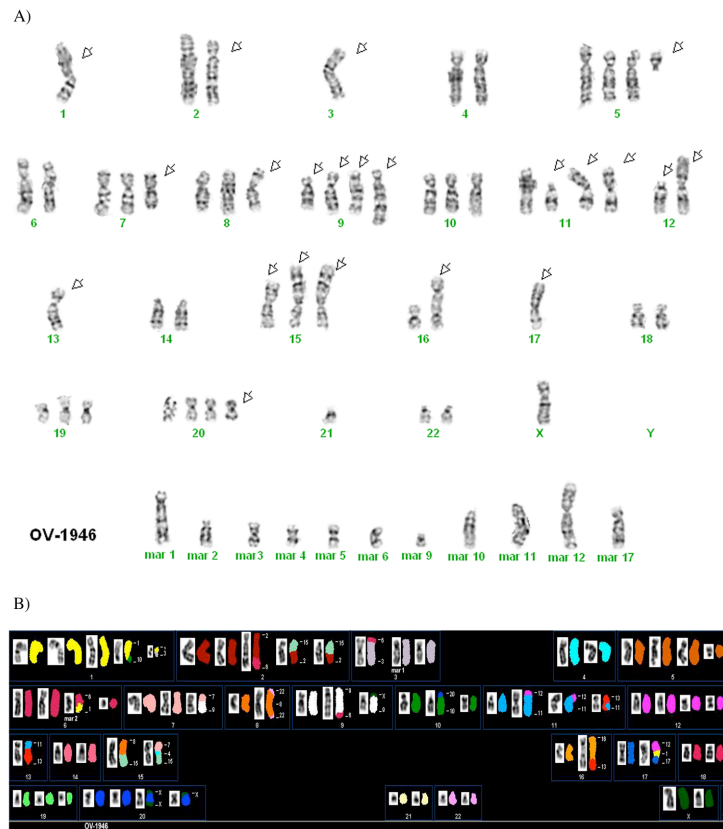
Additional Figure 1. G-banded metaphases and SKY analysis of TOV-2223 cell line.

A) and C) G-banded metaphases from the TOV-2223 cell line (cells 15 and 36 respectively). Arrows indicate the abnormal chromosomes, mar: marker chromosome. B) and D) Combined inverted-DAPI and SKY image of cell 45 and 46 respectively from the TOV 2223 cell line with identification of some marker chromosomes.



Additional Figure 2. G-banded metaphases and SKY analysis of TOV-1946 cell line.

A) and C) G-banded metaphases from the TOV-1946 cell line (cells 6 and 43 respectively). Arrows indicate the abnormal chromosomes, mar: marker chromosome. B) and D) Combined inverted-DAPI and SKY image of cell 44 and 36 respectively from the TOV-1946 cell line with identification of some marker chromosomes.



Additional Figure 3. G-banded metaphases and SKY analysis of OV-1946 cell line.

A) G-banded metaphase from the OV-1946 cell line (cell 24). Arrows indicate the abnormal chromosomes, mar: marker chromosome. B) Combined inverted-DAPI and SKY image of cell 11 from the OV-1946 cell line with identification of some marker chromosomes.

Annexe IV. Article Supplémentaire : A novel method of cell embedding for tissue microarrays.

Magdalena Zietarska¹, Jason Madore¹, Jean-Simon Diallo¹, Nathalie Delvoye¹, Fred Saad^{1,2}, Diane Provencher^{1,3}, Anne-Marie Mes-Masson^{1,4}.

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CR/CHUM)/ Institut du cancer de Montréal, ²Département d'urologie, Université de Montréal, ³Département de gynécologie et obstétrique, Université de Montréal, ⁴Département de médecine, Université de Montréal, Québec, Canada.

Article accepté en 2010 dans Histopathology.

Key words: tissue microarray, cell lines, cell culture

Contribution des auteurs :

L'élaboration du projet, la majorité des travaux présentés dans cet article et la rédaction ont été réalisées par le premier auteur. Tous les auteurs ont contribué au manuscrit. Jason Madore a construit le micro-étalage de cellules. Jean-Simon Diallo a participé à la mise au point de la méthode. Nathalie Delvoye a participé à la préparation de certains échantillons. Saad F, Provencher DM et Mes-Masson AM ont participé à l'écriture du manuscrit et à son approbation finale.

Abstract

Aims: Tissue microarrays (TMAs) have become a standard tool for the simultaneous study of protein expression in large cohorts of clinical tissue samples. Cell lines derived from tissue culture represent a practical transition between *in vitro* and *in situ* studies. The aim was to develop an efficient method of cell embedding for TMAs.

Methods and results: In this study a novel technique for creating formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cell cultures using HistoGel™ molds is described. HistoGel™ FFPE cells are processed under the same conditions as standard histology tissue samples. HistoGel™ embedding yields cell pellets with high enough density for TMA construction. In this study, the construction of a cell line TMA composed of 45 different cell lines using a novel method is described. To assess their effects on cell morphology and antigenicity, both trypsinized and scraped cells were used as well as cells fixed in formalin for different lengths of time. A panel of antibodies was used to validate the antigenicity of the FFPE cell cultures by immunochemical assay.

Conclusion: The new method of cell embedding allows an efficient inclusion of cell lines on TMAs as important controls for cross TMA analysis, as well as a rich source for antibody testing.

Introduction

Tissue microarrays (TMAs) represent a valuable technology for the identification of new diagnostic markers as well as therapeutic targets in human cancers^{1, 2} as they substantially accelerate the study of a large number of patient samples. Experimental research can be validated by *in situ* studies on hundreds of tissue samples in a single experiment. TMAs are constructed from 0.6-2.0 mm diameter cores taken from a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) pathology surgical samples placed into a single recipient TMA block^{3, 4}.

Numerous cancer cell characteristics, markers, and therapeutic targets are first studied or identified using cell culture systems. Therefore, including cell cultures in microarrays as experimental controls represents a practical advantage in the transition from

in vitro laboratory experiments to *in situ* human tissue studies. Construction of a TMA composed of different cell cultures not only allows for rapid analysis of many samples but also facilitates the identification of specific proteins in a particular cell line. Another important feature of this approach is the inherent reduction in both the cost and time associated with maintaining several cell lines in culture.

The difficulty in constructing a cell line microarray comes from the fact that cell pellets are often disrupted during standard tissue processing protocols. The FFPE embedded cell pellet needs to be dense enough so that when TMA specific cores are taken from the block, they contain enough cells to allow proper immunochemical studies. In this report, we describe a new method for fixing and paraffin embedding cell suspensions using HistoGel™. This simple method allowed us to construct a cell line microarray with high cell density per core. Within these high density cores, cells conserved their morphology and their immunoreactivity as assayed by standard immunochemical techniques with anti-p53, -Her2, -PTEN, -Nestin and -desmoplakin antibodies.

Methods

Cell cultures

Cell lines were grown in the appropriate media (as recommended by ATCC) as adherent cultures. At approximately 80% confluence, four 100mm petri dishes of cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and the cells collected by scraping and/or by trypsin treatment. Cells were then pelleted by centrifugation at 1500 RPM (Baxter Megafuge) for 10 minutes. The supernatant was discarded and cells were resuspended in formalin (Rapifix, Produits Chimiques ACP) and fixed for 7 days at 4°C.

Histogel mold

A summary of the procedure to generate the HistoGel™ mold is described in Figure 1. To start, 10 mls of HistoGel™ (in water bath at 80-90°C) was liquefied after which 5 ml

were poured into a 50 ml Falcon tube. The mold was created using a 15 ml Falcon tube inserted into the 50 ml tube and solidified on ice for 10 minutes. While the mold solidified, the cells in formalin were centrifuged at 2000 x rpm for 10 minutes. The formalin was discarded and the pellet resuspended in 100 μ l of formalin in order to transfer the cells into the mold. It was important not to over-fill the mold in order to allow optimal adherence of the capping HistoGel™ poured over the cell pellet. The mold with the fixed cells was centrifuged at 2500 x rpm for 5 mins and the formalin aspirated from the top of the pellet. The pellet was covered with 1 ml of liquefied HistoGel™. Once solidified, using a small spatula, the mold containing the cell pellet was gently scooped out onto a petri dish cover and the HistoGel™ was cut into a cube around the cell pellet core with a scalpel. The samples were placed in a tissue-embedding cassette and submerged in formalin at 4°C overnight. The samples were then embedded in paraffin using standard tissue processing protocols and sections were subsequently cut and stained with hematoxylin and eosin. Different times of formalin fixation were also examined to determine any negative effects of long formalin exposures on cellular morphology or antigenicity.

TMA construction

To construct the TMA, 45 different cell lines were used. Matched scraped as well as matched trypsinized cells were placed on the TMA. To test for any detrimental effects of formalin exposure on antigen immunoreactivity, PC3 cells were formalin fixed either for seven days followed by a 24 hour formalin fixation in the HistoGel™ mold, or 10 minutes followed by a seven day formalin fixation in the HistoGel™ mold. Cylindrical cores of 0.6 mm were collected from the donor block using a manual tissue arrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) and placed in a recipient block according to the manufacturer's protocol.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, p53 (D0-1) (sc-126 from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Her2 (ab16901 from Abcam, MA, USA), Nestin (sc-23927 from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), desmoplakin (sc-18083 from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and PTEN (AB1809 Cedarlane Laboratories Limited, On, Canada) antibodies were used. The TMA was sectioned in 4 μm slices and slides were deparaffinized in toluene and re-hydrated in a gradient of ethanol (100%, 95% and 80% ethanol/water solution). A 3% H₂O₂ treatment was used to eliminate endogenous peroxidase activity followed by a 15 min submersion in boiling citrate buffer (0.01M citric acid adjusted to pH 6.0) to unmask antigens. The sections were blocked using a protein blocking, serum-free reagent (DakoCytomation Inc., ON, Canada). Samples were incubated with primary antibody for 60 min followed by a 20 min incubation with the secondary biotinylated antibody and a 20 min incubation with streptavidin-peroxydase complex (Dako Diagnostics Canada Inc.) at room temperature. Reaction products were developed using diaminobenzidine containing 0.3% H₂O₂ as a substrate for peroxidase. The nuclei were counterstained with Hematoxylin.

Results

Using our HistoGelTM/FFPE method (figure 1), we were able to construct a TMA using high density FFPE cell pellets. The origin and the diseases represented by each of the cell lines are described in table I. As shown in figures 2, 3, and 4, this method yields high density cell pellets which have undergone the same processing protocol as standard formalin fixed paraffin embedded tissue samples, thus allowing tissue-analogous immunochemical studies.

In order to compare cellular morphology after cell embedding, some cell lines were collected either by trypsinization or scraping. Unlike trypsinization, scraped cell morphology is susceptible to mechanical disruption, however, the trypsinization method can potentially alter antigens susceptible to the enzyme's proteolytic activity. Hematoxylin/eosin staining, anti-p53 and anti-Her2 labeling were done in order to better

visualize cellular morphology as well as to verify if immunoreactivity changed depending on the method of cell collection. As shown in figure 2, only subtle differences were observed for the majority of cells that were scraped and those that were trypsinized when visualized by hematoxylin/eosin staining. To verify if trypsin treatment would affect membrane proteins, immunocytochemistry was performed for Her2, a cell surface receptor. Both scraped and trypsinized cells showed strong positive staining. A similar result was observed for desmoplakin a component of desmosomes that mediates intercellular adhesion⁵. Immunoreactivity was not affected by either of the collection methods. Of all the cell lines tested during the comparison of trypsinized and scraped cells (TOV112D, TOV1946, OV1946, OV90 and TOV2223), only one (TOV2223) displayed a difference in morphology (supplementary figure 1). However, similar differences in morphology can sometimes be observed in cell pellets that were processed following the same methodology (supplementary figure 1-B).

To verify if a longer period of formalin fixation would influence the immunoreactivity of cells, PC3 cells were fixed in formalin for either 10 minutes or 7 days prior to HistoGelTM embedding. As shown in figure 3, PC3 cells which do not express p53^{6,7} prepared under both conditions did not present nuclear staining and were positive for Nestin as described previously⁸. Furthermore, cellular morphology was not modified by different lengths of formalin fixation (figure 3). Moreover, as seen in figure 4, both the T47D and MDA-MB-453 mammary gland cancer cells, that were fixed for 32 and 27 days respectively prior to HistoGelTM embedding, retained high immuno-reactivity. As described previously, strong nuclear p53 staining was present in the T47D cells^{9, 10} and the MDA-MB-453 cells are positive when immuno-labeled for PTEN¹¹.

Different antibodies were used in order to validate the immunostaining of cell lines prepared using the HistoGelTM molds. Examples of cell lines stained with anti p53, PTEN, and Nestin antibodies are shown in figure 4. As described previously, positive p53 nuclear staining was observed for the T47D^{9,10} and Hek293¹² cells as opposed to MDA-MB-453 cells¹³ which do not express mutated p53. PTEN expression ranged from negative in LnCAP cells to highly positive in MDA-MB-231 and TD47 cells. This range of expression was previously described in different studies¹⁴⁻¹⁷. Different levels of protein expression

were also observed for Nestin, where it varied from null in BRC196 cells to medium in MDA-MB-453 and high in PC3 cells⁸. Differential protein levels related to variable cell concentrations in the cores are eliminated in our method since the cell pellet densities are similar among the cells lines tested. These observed variations in protein expression levels were further validated by western blots analysis (figure 4).

Discussion

TMA's have become a high-throughput tool of choice for the simultaneous analysis of a large number of tissue samples. TMA's not only allow minimization of cost and time but also preserve tissue samples that are valuable and limited. A single TMA slide containing hundreds of tissue samples enables simultaneous experiments, limiting the variability associated with repeated testing. Cell lines remain the most widely used and easily accessible models for *in vitro* studies. Cell line microarrays, similarly to tissue microarrays, present the same advantages, and can serve not only as optimization tools for immunochemical assays, but also as positive/negative controls that can be used directly alongside tissue samples within TMA's. Cell line microarrays constructed from the same cell lines subjected to different culture conditions, or in which a protein of interest is either over expressed or inhibited, is beneficial in the study of cell biology and tumorigenesis and can directly serve as a control for determining antibody specificity.

The novel method to embed cells using HistoGelTM molds that we describe here can generate paraffin blocks from any cell culture or cell suspension with high enough densities to allow microarray construction. HistoGelTM is an aqueous gel composition used in the processing of small histological samples. It is solid at room temperature and liquefies when heated. HistoGelTM, by encasing the cell pellet in a mold, maintains cell pellet density and prevents pellet disruption. The samples can then be paraffin embedded and processed as standard histology samples.

In addition to using different cell lines for the construction of our microarray, we have also used the same cell lines collected by alternate methods. Both trypsinized and scrapped cells were placed on the microarray as well as cells that were fixed in formalin for

different lengths of time. To date, it remains uncertain in the literature how fixation time influences antigen presentation. Some believe that fixation time should not exceed 48 hours¹⁸, while others show that formalin fixation for up to 3 weeks has very little effect on cell or tissue antigenicity^{19, 20}. In order to gain access to a greater number of different cell lines, some cell lines previously fixed in formalin were provided by different laboratories, and for practical purposes needed to be stored longer between collection and embedding. For this reason we wanted to verify if longer periods of fixation would affect cellular morphology or antigenicity. Our results show that cells may be fixed up to seven days without affecting subsequent immunochemical labeling which presents a great advantage in allowing sufficient time to collect cell lines from different research groups. Consequently, cell line TMAs represent an obvious advantage for different studies on cell lines that otherwise would not be immediately available.

Two different cell collection methods were used, scraping or trypsinization, on five cell lines in order to compare their influence on morphology and antigenicity. Only one cell line showed subtle morphological differences between the two methods. TOV2223 cells appeared to maintain better morphology when trypsinized versus collection using the scraping method. The density of trypsinized cell pellets was minimally higher than scraping. Trypsin is a serin protease routinely used in cell culture for detaching and resuspending cells from culture dishes. Although no overt effects were observed in our study, trypsinization could potentially affect proteins involved in cell-cell interactions or even cell surface proteins susceptible to trypsin's enzymatic activity. Hence, a greater number of cell lines collected by both methods and immunolabeled with antibodies directed against cell-cell interacting proteins is needed to confirm if trypsinization is indeed the better collection method.

Finally, we have used three different antibodies in order to validate the antigenicity of our HistoGelTM embedded cell lines (figure 4). Where possible, staining results of our TMA cell lines were compared to those reported in the literature. The cell line TMA can be effectively used for antibody optimization as well as for identification of positive and negative controls in immunohistochemistry experiments. The observed differential levels of protein expression were independently confirmed by western blots. It is important to note

that even though the method of cell processing is different between western blots and FFPE cell pellet creation, the results remain highly correlative.

In conclusion, we describe a new and different method to construct cell line TMAs that can be used on suspended as well as adherent cells. The HistoGelTM embedding allows the cells to be processed in a fashion similar to histology samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Luc Masson for critical reading of this manuscript. We would like to thank members of the Department of Pathology of the CHUM for block processing and in particular, Anna Desy for technical assistance. This work was supported by a strategic initiative grant from the Cancer Research Society, a grant from the Canadian Institutes of Health Research and from Valorisation Recherche Québec to A.-M.M.-M. M.Z. was supported by the Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal.

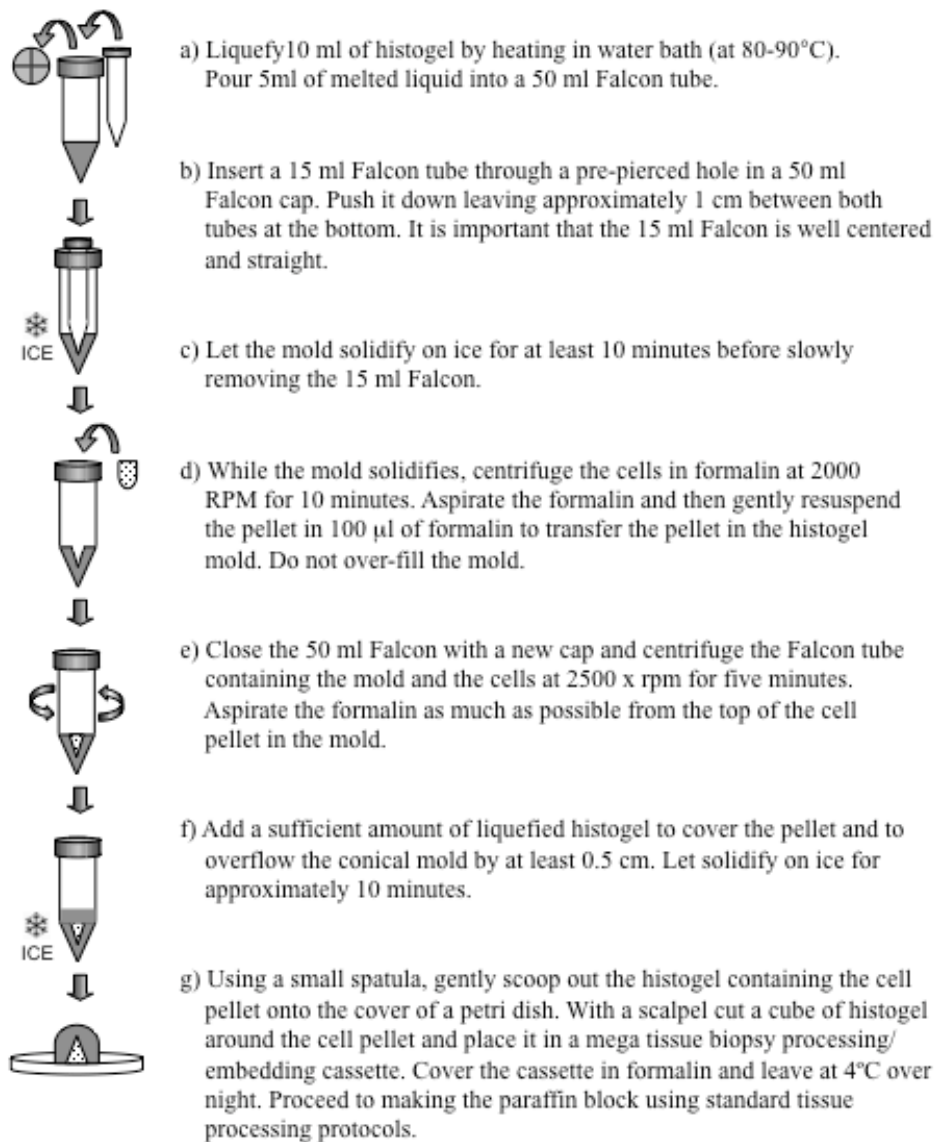


Figure 1.

Figure 1. Summary of histogel mold preparation and embedding of cell pellets.

Cell line	Origin	Disease
	kidney (transformed with adenovirus 5 DNA)	
HEK-293		
22RV1	prostate	carcinoma
A549	lung	carcinoma
BRC-17	mammary gland	carcinoma, lobular
BRC-196	mammary gland	carcinoma, ductal
BRC-31	mammary gland	carcinoma, ductal
BRC-32	mammary gland	carcinoma, lobular
BRC-36	mammary gland	carcinoma, ductal
BT549	mammary gland	carcinoma, ductal
Capan 1	pancreas (liver metastasis)	adenocarcinoma
DU145	prostate (brain metastasis)	carcinoma
HCT116	colon	carcinoma, colorectal
Hela	cervix	adenocarcinoma
Hs578T	mammary gland	carcinoma, ductal
JURKAT	peripheral blood/T lymphocyte	acute T cell leukemia
K562	bone marrow (pleural effusion)	chronic myelogenous leukemia
LNCaP	prostate (lymph node metastasis)	carcinoma
LoVo	colon (lymph node metastasis)	adenocarcinoma, colorectal
MCF7	mammary gland (pleural effusion)	adenocarcinoma
MDA-MB-231	mammary gland (pleural effusion)	adenocarcinoma
MDA-MB-453	mammary gland (pleural effusion)	carcinoma
MDA-MB-468	mammary gland (pleural effusion)	adenocarcinoma
MOV1078D	uterus (ovary metastasis)	carcinoma, endometrioid
NIH 3T3	embryonic mouse fibroblasts	
NOV 2645G	ovary (normal tissue)	
NOV3210.	ovary	normal tissue
OV1946	ovary (ascities)	adenocarcinoma, serous papillary
OV2295(2)	ovary (ascities)	adenocarcinoma, serous
OV866(2)	ovary (ascities)	adenocarcinoma, serous papillary
OV90	ovary (ascities)	adenocarcinoma
PC3	prostate (bone metastasis)	adenocarcinoma
		Tumor, Abelson murine leukemia virus induced
RAW	monocyte/macrophage (mouse)	
RWPE-1	prostate	normal tissue
SKOV3	ovary (ascities)	adenocarcinoma
T47D	mammary gland (pleural effusion)	carcinoma, ductal
TOV112D	ovary	adenocarcinoma, endometrioid
TOV1946	ovary	adenocarcinoma, serous papillary
TOV21G	ovary	adenocarcinoma, clear cells
TOV2223	ovary	adenocarcinoma, serous papillary
TOV2414	ovary	adenocarcinoma, mucinous
TOV2835 EP	ovary	adenocarcinoma, serous papillary
TOV2929D	ovary	adenocarcinoma, serous
TOV81D	ovary	adenocarcinoma, serous papillary
U937	macrophage	lymphoma, histiocytic

Table I. The origin and the diseases represented by each of the cell lines.

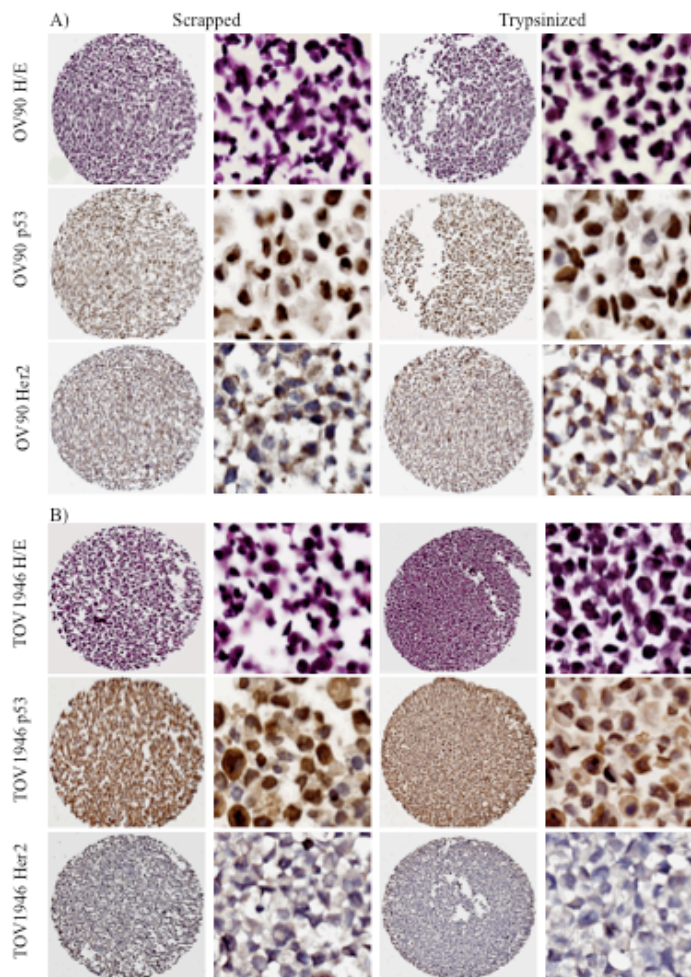


Figure 2.

Figure 2. Comparative morphology of scraped versus trypsinized embedded cells.

Hematoxyline/ eosine staining, anti-p53 and Her2 staining of A) OV90, B) TOV1946 cell lines both scraped and trypsinized. Left panels represent cores at 10x magnification and right panels represent cells at 40x magnification.

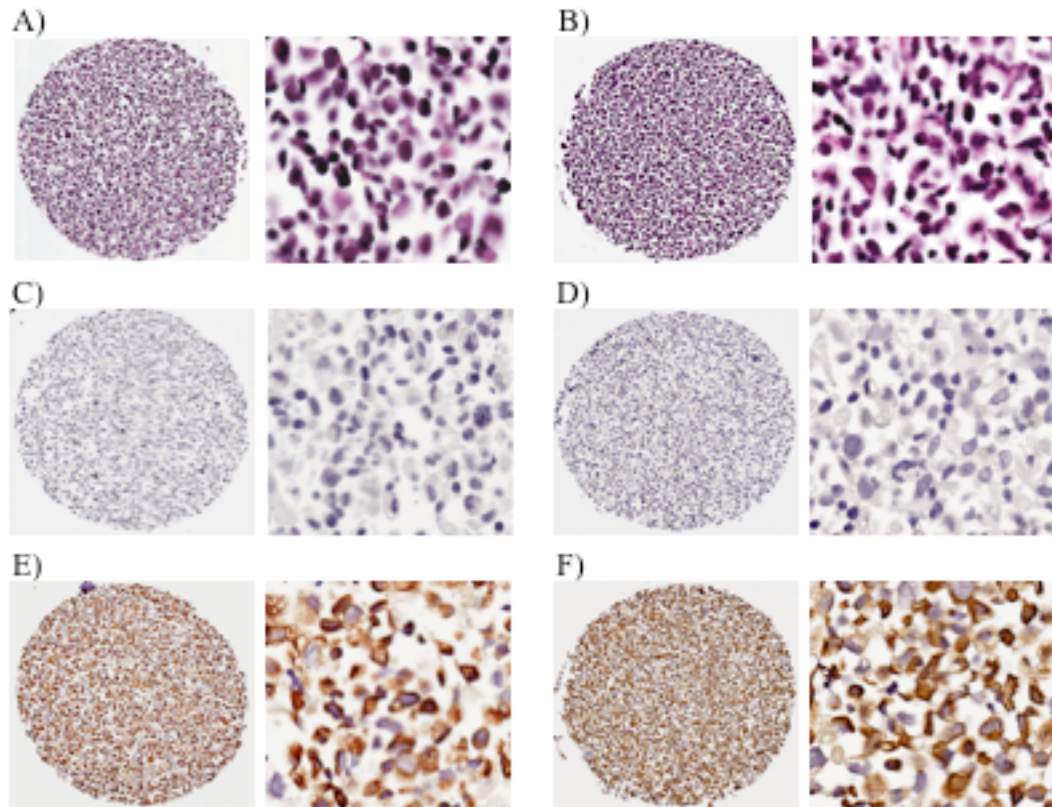


Figure 3. Comparative morphology and immunostaining of cells fixed in formalin for different lengths of time.

Hematoxyline/ eosine staining of A) PC3 cells fixed for seven days in formalin followed by a 24 hour fixation in histogel and formalin, and B) PC3 cells fixed for 10 minutes in formalin followed by seven days fixation in histogel and formalin. Anti-p53 C), D) and Nestin E), F) staining for both PC3 cells fixed for seven days in formalin followed by a 24 hour fixation in histogel and formalin and PC3 cells fixed 10 minutes in formalin followed by seven days fixation in histogel and formalin respectively. Left panels represent 10x magnification and right panels 40x magnification of individual cores.

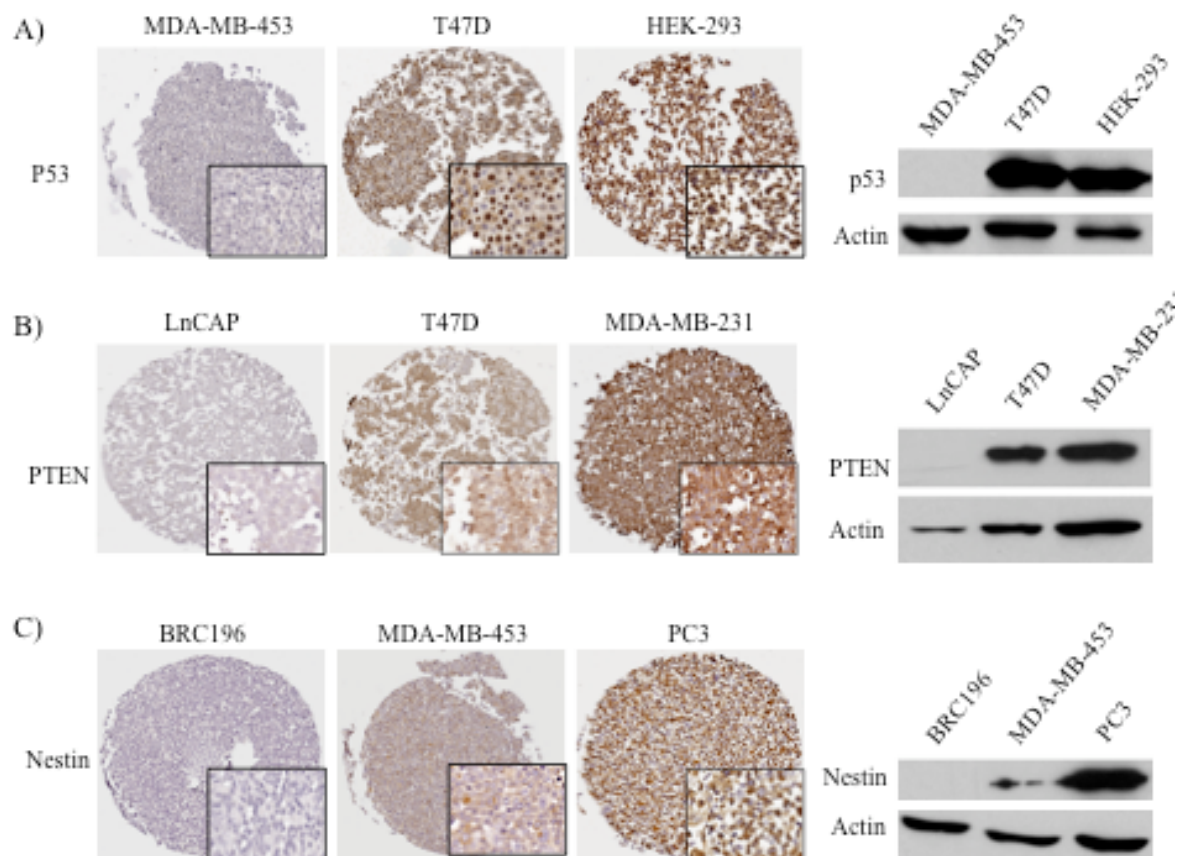
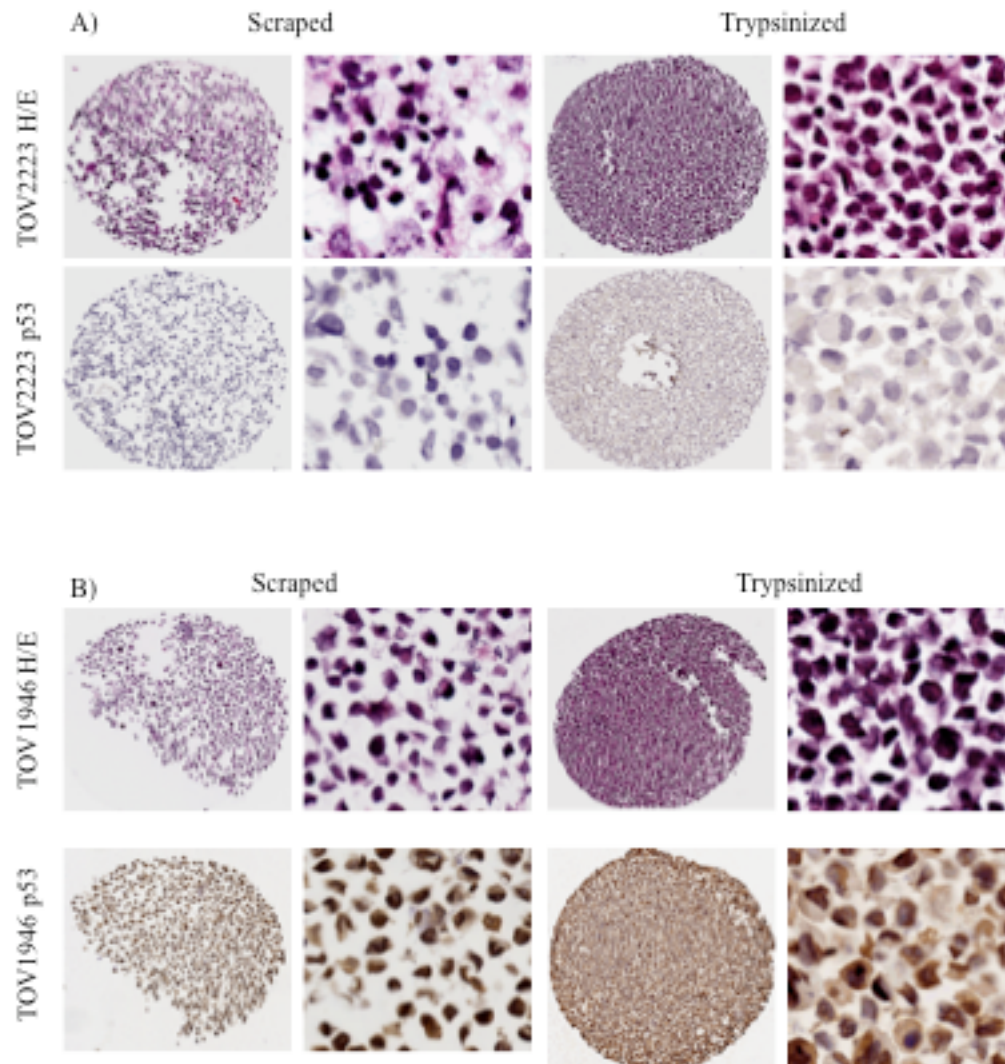


Figure 4. Examples of differential protein expression in cell lines from the cell line array.

Immunocytochemistry and western blots were performed with anti A) P53, B) PTEN and C) Nestin antibodies. Entire cores (10x) and higher magnification (40x) are shown in lower right squares.



Supplementary figure 1. Morphological differences observed between cell samples.

Comparative morphology of scraped versus trypsinized embedded cells. Hematoxyline/eosine staining and anti-p53 staining of A) TOV2223 and B) TOV1946 both scraped and trypsinized cells. Differences in morphology can be observed independently of the method of cell collection. Left panels represent cores at 10x magnification and right panels represent cells at 40x magnification.

Bibliography

1. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4;844-847.
2. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19;19-25.
3. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001;94;1-5.
4. Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med* 2008;37;166-176.
5. Sonnenberg A, Liem RK. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* 2007;313;2189-2203.
6. Rubin SJ, Hallahan DE, Ashman CR et al. Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumor suppressor genes. *J Surg Oncol* 1991;46;31-36.
7. Scott SL, Earle JD, Gumerlock PH. Functional p53 increases prostate cancer cell survival after exposure to fractionated doses of ionizing radiation. *Cancer Res* 2003;63;7190-7196.
8. Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME et al. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res* 2007;67;9199-9206.
9. Dinda S, Kodali-Gali S, Sevilla L, Burkley M, Hurd C, Moudgil VK. Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biochem* 1997;175;81-89.
10. Elstner E, Williamson EA, Zang C et al. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002;74;155-165.
11. Zhang M, Fang X, Liu H et al. Bioinformatics-based discovery and characterization of an AKT-selective inhibitor 9-chloro-2-methylellipticinium acetate (CMEP) in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2007;252;244-258.
12. Yun S, Lie ACC, Porter AC. Discriminatory suppression of homologous recombination by p53. *Nucleic Acids Res* 2004;32;6479-6489.
13. Kanovsky M, Raffo A, Drew L et al. Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98;12438-12443.
14. Hsiang CH, Tunoda T, Whang YE, Tyson DR, Ornstein DK. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate* 2006;66;1413-1424.
15. Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J et al. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet* 1999;8;185-193.

16. Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13;3577-3584.
17. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2004;23;8571-8580.
18. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000;24;1016-1019.
19. Xu H, Yang L, Wang W et al. Antigen retrieval for proteomic characterization of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Proteome Res* 2008;7;1098-1108.
20. Oyama T, Ishikawa Y, Hayashi M, Arihiro K, Horiguchi J. The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. *Breast Cancer* 2007;14;182-188.

