

Université de Montréal

**Développement d'un nouveau modèle *in vitro*
du cancer épithélial de l'ovaire.**

par
Magdalena Zietarska

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

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

août, 2004

© Magdalena Zietarska, 2004



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Développement d'un nouveau modèle *in vitro*
du cancer épithélial de l'ovaire.**

Présenté par :
Magdalena Zietarska

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Présidente-rapporteuse : Dr Manuela Santos
Directrice de recherche : Dr Anne-Marie Mes-Masson
Codirectrice de recherche : Dr Diane Provencher
Membre du jury : Dr Mario Chevrette

Résumé

Les lignées cellulaires du cancer épithélial de l’ovaire sont un outil pratique pour la recherche en biologie moléculaire et cellulaire. Cependant, les variations affectant l’expression des gènes des cellules en culture, par comparaison aux cellules de la tumeur d’origine, ne sont pas encore bien élucidées. Nous avons développé un nouveau modèle tridimensionnel (3D) de culture *in vitro* afin d’évaluer si nous pouvions reproduire certaines des conditions de croissance des tumeurs humaines *in vivo*. Trois lignées cellulaires, provenant de tumeurs malignes ovariennes (TOV21G, TOV112D) et d’ascite néoplasique (OV90) ont été cultivées en gouttelettes inversées pour former des sphéroïdes. Afin d’obtenir un modèle *in vivo*, ces mêmes lignées ont été implantées dans les souris Nu. Les ARNs de bonne qualité des trois modèles ont été extraits. Le profil d’expression génique correspondant à chaque modèle a été analysé grâce aux biopuces d’ADN Affymetrix et des gènes candidats ont été sélectionnés. Les coupes transversales de sphéroïdes nous ont permis d’étudier leur structure interne et d’effectuer ultérieurement des recherches sur des phénomènes pertinents aux tumeurs *in vivo* tels que l’hypoxie. Nous envisageons également d’aborder les phénomènes d’angiogenèse et des interactions cellule-cellule en effectuant des expériences de co-culture en sphéroïde de cellules tumorales et de cellules normales (endothéliales ou du stroma). Pour faire le suivi des cellules tumorales en co-culture, nous avons établi des lignées cellulaires tumorales transfectées avec des protéines fluorescentes (GFP et pHcRED). Finalement, nous avons utilisé le modèle tridimensionnel dans une étude préliminaire de l’influence du sérum bovin et de l’ascite sur la formation des sphéroïdes en gouttelettes inversées. En conclusion, nous avons réussi à développer un nouveau modèle *in vitro* qui semble être plus représentatif de la maladie *in vivo* que le modèle monocouche. Nous croyons que le modèle sphéroïde pourra contribuer à une meilleure compréhension de la tumorigenèse ovarienne. De plus, il représente un modèle intéressant pour les études sur le développement et la prédiction du comportement tumoral en réponse à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : sphéroïde, cancer de l’ovaire, culture tridimensionnelle, biopuces, modèles de culture.

Abstract

Epithelial ovarian cancer cell lines are a useful tool for molecular and cellular research with a well-defined cell population but it is not clear how culture affects overall gene expression when compared to the original primary tumor. We have established an *in vitro* three-dimensional (3D) culture system model based on our ovarian cell lines that potentially recapitulates more closely growth conditions encountered by human tumor cells *in vivo*. For the 3D culture, we used three long-term cell lines from ovarian malignant tumors (TOV21G and TOV112D) and ascites (OV90) that were previously established in our laboratory. In order to obtain an *in vivo* model these same cell lines were implanted in Nude mice to form xenografts. Good quality RNA was extracted from the standard monolayer cultures, the 3-D spheroids and *in vivo* tumors to perform gene expression profile analyses by the Affymetrix DNA array and candidate genes were identified. Cross sections of spheroids allowed us to study their structure and eventually phenomena relevant to an *in vivo* tumor such as hypoxia. We aim to eventually study angiogenesis and cell-cell interactions in co-culture experiments of spheroids and normal cells (endothelial or stromal). In order to be able to follow the tumor cells in co-culture systems, we have established tumor cell lines transfected with fluorescent proteins (GFP and pHcRED). We have also used our 3D model in a preliminary study of the influence of serum and ascites on the formation of spheroids in hanging droplets. In conclusion, we have established a new 3D model which seems to recapitulate more closely *in vivo* tumor growth conditions than the monolayer cultures. The new 3-D *in vitro* spheroid model of ovarian cancer could represent a useful innovative tool to contribute to the understanding of molecular events associated with the establishment and/or progression of epithelial ovarian cancer. The spheroid model presents a great potential in the development as well as the prediction of the tumor behavior in response to the new therapeutic strategies.

Key words: spheroid, 3D culture, DNA chip, microarray, model system.

Table des matières

Sommaire en français.....	III
Sommaire en anglais.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations.....	XII
Remerciements.....	XIV

1.0 Introduction

1.1 Revue bibliographique.....	2
1.1.1 Cancer de l’ovaire.....	6
1.1.2 L’histoire de l’ovaire.....	6
1.1.3 L’anatomie de l’ovaire.....	8
1.1.4 Les tumeurs ovariennes.....	10
1.1.5 L’épithélium de surface.....	11
1.2 Les modèles du cancer de l’ovaire.....	14
1.2.1 Les tissus tumoraux.....	15
1.2.2 La microdissection au laser.....	16
1.2.3 Le modèle animal.....	19
1.2.3.1 Les xénogreffes.....	21
1.2.4 Les cultures primaires.....	22
1.2.5 Les lignées cellulaires.....	23
1.2.6 La culture 3D.....	25
1.3 Les micropuces.....	29
1.4 Les objectifs.....	31
1.4.1 Objectif principal	31
1.4.2 Objectif secondaire.....	32
1.4.3 Objectif tertiaire	33

2.0 Matériel et méthodes

2.1 Le modèle monocouche.....	35
2.2 Le modèle xéno greffe.....	35
2.3 Le modèle sphéroïde.....	36
2.4 Les extractions d'ARN.....	37
2.5 Les biopuces.....	37
2.6 L'immunohistochimie.....	39
2.7 Les transfections avec des protéines fluorescentes.....	40
2.8 L'ascite et le sérum.....	41

3.0 Résultats

3.1 Les modèles du cancer épithélial de l'ovaire.....	43
3.1.1 Les monocouches.....	43
3.1.2 Les xéno greffes.....	45
3.1.3 Les sphéroïdes sur agarose.....	47
3.1.4 Les sphéroïdes en gouttelettes inversées.....	49
3.2 Comparaison des modèles.....	51
3.2.1 L'ARN.....	51
3.2.2 Analyse des données de biopuces.....	59
3.2.2.1 Analyse de corrélation.....	59
3.2.2.2 Analyse non supervisée de regroupement de Genespring.....	63
3.2.2.3 Identification des patrons d'expression et des gènes candidats à l'aide de l'analyse supervisée de l'expression différentielle des gènes.....	66
3.2.2.3.1 Analyse de l'expression différentielle des gènes pour la lignée OV90.....	66
3.2.2.3.2 Analyse de l'expression différentielle des gènes pour la lignée TOV21G.....	82
3.2.2.3.3 Analyse de l'expression différentielle des gènes pour la lignée TOV112D.....	87

3.3 Les coupes histologiques.....	90
3.4 Les transfections avec des protéines fluorescentes.....	94
3.5 Étude préliminaire de l'impact de sérum et ascite sur le sphéroïde.....	97
4.0 Discussion	
4.1 Les modèles	100
4.2 Les analyses des profils géniques d'expression.....	104
4.3 L'immunohistochimie.....	120
4.4 Les transféctions avec les protéines fluorescentes.....	120
4.5 L'étude préliminaire (FBS et ascite).....	121
4.6 Conclusion et perspectives.....	122
5.0 Bibliographie.....	125

Liste des tableaux

Tableau I	Tableau récapitulatif du modèle xénogreffe du cancer épithélial de l’ovaire chez la souris Nu.....	45
Tableau II	Tableau représentant les noms et la classification des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde de la lignée OV90 du modèle xénogreffe chez la souris.....	70
Tableau III	Tableau représentant les noms et la classification des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche de la lignée OV90.....	78
Tableau IV	Tableau représentant les noms et la classification des gènes qui sont spécifiques au modèle sphéroïde de la lignée OV90.....	81
Tableau V	Tableau représentant les noms et la classification des gènes sélectionnés pour la lignée TOV21G.....	85
Tableau VI	Tableau récapitulant les gènes candidats retrouvés en commun au moins dans deux lignées différentes.....	115

Liste des figures

Figure 1	Apparence morphologique des lignées cellulaires développées au laboratoire à partir d'échantillons de tumeurs ovariennes.....	43
Figure 2	Apparence morphologique des sphéroïdes en culture sur agarose.....	47
Figure 3	Apparence morphologique du développement des sphéroïdes en gouttelettes inversées.....	50
Figure 4	Figure représentant différents tests effectués dans le but de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différents modèles développés à partir de la lignée OV90.....	53
Figure 5	Figure représentant différents tests effectués dans le but de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différents modèles développés à partir de la lignée TOV112D.....	55
Figure 6	Figure représentant différents tests effectués dans le but de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différents modèles développés à partir de la lignée TOV21G.....	57
Figure 7	Coefficients de corrélation entre les différents modèles de la lignée OV90.....	60

Figure 8	Coefficients de corrélation entre les différents modèles de la lignée TOV112D.....	61
Figure 9	Coefficients de corrélation entre les différents modèles de la lignée TOV21G.....	62
Figure 10	Représentation graphique de l'analyse par regroupement à l'aide du programme Genespring des échantillons regroupés selon les profils géniques similaires.....	64
Figure 11	Représentation du patron d'expression des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde de la lignée OV90 du modèle xéno greffe de la même lignée.....	67
Figure 12	Représentation du profil d'expression des chémokines au niveau des modèles développés à partir de la lignée OV90.....	73
Figure 13	Représentation du profil d'expression des protéines du choc thermique au niveau des modèles développés à partir de la lignée OV90.....	74
Figure 14	Représentation du patron d'expression des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche de la lignée OV90.....	76
Figure 15	Représentation du patron d'expression des gènes qui sont spécifiques au modèle sphéroïde de la lignée OV90.....	80
Figure 16	Représentation des patrons d'expression de la lignée TOV21G.....	83

Figure 17	La représentation du patron d'expression des gènes de modèles développés à partir de la lignée TOV112D.....	87
Figure 18	Comparaison morphologique des coupes histologiques du modèle sphéroïde et du modèle xénogreffe chez la souris.....	91
Figure 19	Coupes histologiques des sphéroïdes de la lignée TOV112D.....	92
Figure 20	Sphéroïdes de la lignée TOV112D transfectés avec une protéine fluorescente verte soit la GFP ainsi qu'avec une protéine fluorescente rouge soit la pHcRED.....	94
Figure 21	Sphéroïdes de la lignée OV90 transfectés avec une protéine fluorescente verte soit la GFP ainsi qu'avec une protéine fluorescente rouge soit la pHcRED.....	96
Figure 22	Représentation de l'effet du sérum et de l'ascite sur la formation des sphéroïdes.....	98

Liste des abréviations

3D	Tridimensionnel
A	Avec ascite
ADN	Acide désoxyribonucléique
APOE	Apolipoprotein E
ARHGAP6	GTPase-activating protein, rho6
ARN	Acide ribonucléique
AS	Avec sérum
BSP	Bone sialoprotein
COL3A1	Collagène
CSPG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 ou versican
CYR61	Cysteine-rich, angiotensine inducer 61
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
ENO1	Enolase 1
FBS	Fetal Bovine Serum(sérum foetal bovin)
FN1	Fibronectin 1
GFP	Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)
HABP2	Hyaluronic acid-binding protein 2
HBE1	Hemoglobin epsilon locus
HEY1	Hairy/enhancer of split-related with YRPW motif 1
HIF1 α	Hypoxia induced factor 1alpha
HMOX1	Heme oxygenase 1
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 2
L	Lignée cellulaire
LIP	Lignée cellulaire dérivée d'une xéno greffe intrapéritonéale
LSC	Lignée cellulaire dérivée d'une xéno greffe sous cutanée
MARCKS	Myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate
MMP1	Metalloprotéinase de la matrice
MSMB	Microseminoprotein beta
MSN	Moesin
MT	Metallothionein
NASA	National aeronautics and space administration
OSE	Ovary surface epithelium
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PECAM1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
pHcRED	Protéine fluorescente rouge
PPAP2B	Phosphatidic acid phosphatase type 2b
S	Sphéroïde

S100A6	S100 Calcium-binding protein A6.
signal A	Absent
signal M	Marginal
signal P	Présent
SLC3A1	Solute carrier family 3, member 1
SS	Sans sérum
TIP	Xéno greffe intrapéritonéale
TSC	Xéno greffe sous cutanée

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier Dre. Anne-Marie Mes-Masson de m'avoir généreusement accueilli dans son laboratoire. Je dois souligner la franchise et la compréhension dont elle a fait preuve à mon égard. J'aimerais également remercier Dre. Diane Provencher pour tous les efforts qu'elle fait pour créer des ponts entre la clinique et la recherche fondamentale.

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. J'aimerais particulièrement remercier Michela Bossolasco pour son amitié et support dans les moments joyeux comme dans les moments difficiles, Lise Portelance pour son aide précieuse au niveau de la culture cellulaire ainsi que Stéphane Houle sans qui je ne pourrais jamais injecter et sacrifier les souris Nu.

Je tiens particulièrement à remercier ma famille. Grâce à leur générosité, support et encouragements j'ai pu poursuivre mes études. Merci surtout à ma mère qui a enduré toutes mes crises existentielles à chaque fois que j'avais un examen difficile.

Enfin, je tiens à remercier mon conjoint qui a toujours cru en moi, qui a toujours été patient envers moi, qui a toujours pu résoudre mes problèmes informatiques et qui a toujours su me faire rire quand je ne voulais que pleurer.

La réalisation de ce projet a été rendue possible grâce à la contribution financière d'Initiative René Malo, Canderel, FRSQ et VRQ.

1.0 INTRODUCTION

1.1 Revue bibliographique

À chaque instant, des milliers de cellules sont en division dans notre corps. Normalement, cette division cellulaire est soumise à un contrôle très strict et la croissance ainsi que le développement spécialisé se font de façon ordonnée. Cependant, lorsqu'une cellule devient maligne, elle se comporte de manière profondément anormale.

Le premier à avoir reconnu la différence entre les cellules malignes et bénignes fut Hippocrate (460-377 A.D), un médecin Grec. En fait, l'invasion tumorale lui rappelait tellement les pinces de crabe qu'il a appelé la maladie « karkinos » qui est le mot Grec pour crabe. En français, le mot adopté est cancer, le mot latin pour crabe [91].

Le cancer se développe à partir d'une cellule qui a subi des mutations génétiques au niveau de son ADN. Ainsi, les cellules cancéreuses, au lieu de se développer, parvenir à maturité et mourir, vont se diviser indéfiniment. Cependant, le développement du cancer chez l'humain implique une succession d'événements qui normalement peuvent prendre des dizaines d'années avant de devenir apparents. Le cancer fait donc appel à un processus complexe au cours duquel les cellules acquièrent des mutations au niveau des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi qu'au niveau des gènes qui contrôlent directement ou indirectement la prolifération cellulaire [1, 2]. Les oncogènes sont des gènes qui promouvoient la division cellulaire et la croissance continue des cellules et dont l'activation peut contribuer au développement du cancer. Les gènes suppresseurs de tumeurs quant à eux contribuent au phénotype tumoral malin par une perte de fonction [3]. Il a été démontré que la délétion d'un nombre très réduit

de ces gènes peut être à l'origine d'un cancer comme par exemple dans le cas des rétinoblastomes chez les enfants [4]. Cependant, la plupart du temps lorsqu'un cancer est développé au point où il est détectable, de nombreuses mutations au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs ont eu lieu. Il faut également souligner que ces deux types de gènes sont une des sources de signaux pour la machinerie impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est le contrôleur ultime du destin d'une cellule. C'est à ce niveau que la cellule décide de proliférer, de devenir quiescente ou encore d'entrer en état de différenciation post mitotique [5]. Cependant, l'objectif principal du cycle cellulaire est d'assurer la réplication correcte de l'ADN et la répartition égale des copies identiques de chromosomes entre les deux cellules filles. Il faut également mentionner que dans un organisme tel que l'humain, il y a des milliers de divisions cellulaires tout au long de sa vie ce qui fait que l'intégrité de son ADN est constamment menacée. Les cellules ont donc développé différents moyens afin d'éviter ou contrôler l'instabilité génomique. Ainsi, la cellule peut induire un arrêt du cycle cellulaire en réponse à un dommage au niveau du génome. Cet arrêt permet à la cellule de réparer son ADN ou encore, lorsque le dommage est trop important, d'induire l'apoptose. Des défauts au niveau de ces mécanismes essentiels au bon fonctionnement de la cellule peuvent donc conduire à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse [6].

Plusieurs mécanismes intracellulaires sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN qui peuvent donner lieu aux phénotypes mutateurs soit la réparation directe, «nucleotide excision repair» (NER), «base excision repair» (BER), «mismatch repair» (NMR), la réparation des doubles cassures double brin

et la réparation des «interstand cross-link» [7]. Il existe donc de nombreux contributeurs génétiques à l'instabilité génomique cependant, des facteurs épigénétiques peuvent également induire des changements au niveau du contrôle du cycle cellulaire. L'hyperméthylation des suppresseurs de tumeurs ainsi que des régions promotrices des gènes responsables du mismatch repair est un exemple de mécanisme épigénétique impliqué dans la tumorigenèse [8]. De plus, il y a des évidences que le raccourcissement des télomères augmente l'instabilité génomique ainsi que la formation des tumeurs chez la souris [9]. Ce qui pourrait expliquer pourquoi les risques de développer un cancer augmentent avec l'âge et que 77% de tous les cancers sont diagnostiqués à 55 ans et plus [92].

En plus des facteurs génétiques et épigénétiques, notre style de vie ainsi que l'environnement influencent grandement le développement des tumeurs dans le corps humain. Il semble qu'il y aurait, par exemple, un lien entre l'obésité, le stress et le cancer [10, 11]. 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, tout d'abord, consiste en un contact avec certaines substances qui peuvent initier le cancer en induisant des dommages aux cellules ce qui résulte en une mutation génétique. Ces agents sont appelés des carcinogènes ou encore des mutagènes. Plusieurs mutagènes ont été identifiés en laboratoires et parmi eux on retrouve par exemple la lumière ionisante ou encore certaines substances chimiques telles que l'asbestos, le talc, le chrome ou le chlorure de vinyle [93].

La promotion, quant à elle, consiste en une exposition répétée à d'autres substances qui peuvent promouvoir ou faciliter le processus cancéreux en prévenant la réparation des cellules endommagées. L'action des promoteurs est beaucoup plus difficile à identifier et à tester. Parmi ceux-là on retrouve des substances telles que l'alcool et certains gras contenus dans les aliments.

Il faut souligner que la plupart des substances chimiques mutagéniques sont des carcinogènes complets et peuvent donc aussi bien initier que promouvoir le cancer. La fumée des cigarettes qui contient des milliers des substances chimiques est un exemple de carcinogène complet. L'asbestos en est un autre [12, 13].

Certains virus peuvent également jouer un rôle dans le développement de cancers. En effet, des virus peuvent être détectés au niveau de certains cancers humains tels que les lymphomes, les leucémies ou les cancers du col utérin [14]. Enfin, il est de plus en plus évident que l'histoire familiale de cancer joue un rôle au niveau de la détermination du niveau de risque de développer ce dernier. Les individus des familles « à risque » doivent être particulièrement vigilants et exigent une surveillance plus accrue. Il est cependant clair que ce qui détermine le développement des cancers chez la majorité des humains est surtout relié à notre style de vie plutôt qu'à notre héritage génétique. En fait, seulement 10% des cancers seraient véritablement d'origine génétique [94].

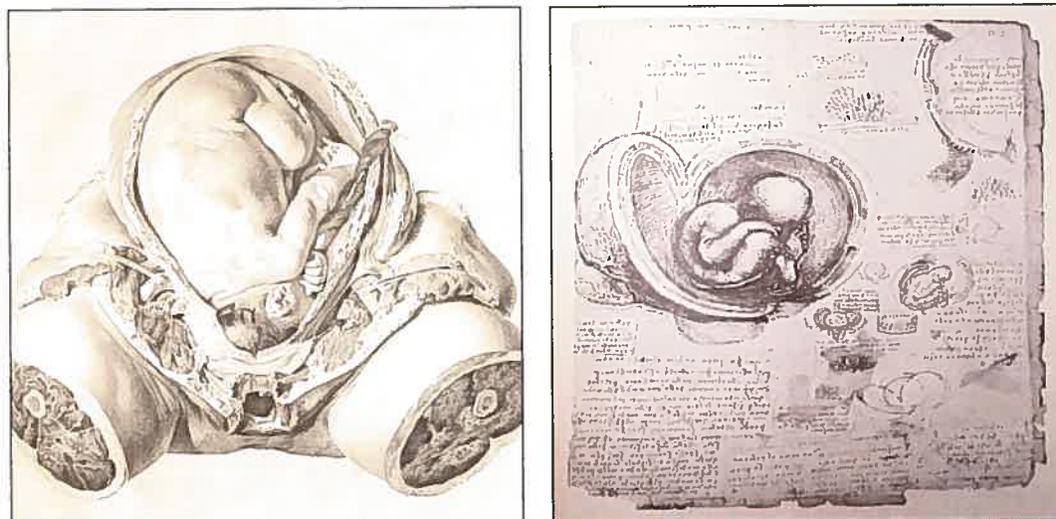
1.1.1 Cancer de l'ovaire

Parmi les cancers les plus communs on retrouve le cancer des poumons, le cancer colorectal, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer de l'utérus, le mélanome, les leucémies et le cancer de l'ovaire. Ce dernier, est le cinquième cancer en importance et le plus mortel des cancers gynécologiques chez la femme. Aujourd'hui encore, la prévention (ex. éliminer l'usage du tabac ou d'alcool en grande quantité) et la détection précoce sont les meilleurs outils pour éviter les conséquences graves du cancer et pour augmenter les chances de survie à celui-ci. Dans le cas du cancer de l'ovaire, seulement 25% des femmes sont diagnostiquées au stade I de la maladie où le taux de guérison est encore supérieur à 90%. Ceci est principalement dû au fait que le cancer de l'ovaire est souvent asymptomatique ou encore, qu'il présente des symptômes difficilement reconnaissables aux stades précoces de la maladie. Les femmes diagnostiquées à un stade plus avancé de la maladie font donc face à un taux de survie inférieur à 20% [15].

1.1.2 L'histoire de l'ovaire

Au cours de l'histoire, Hippocrate fut le premier à avoir vu les ovaires (46-370 A.D) et il croyait que ceux-ci étaient l'équivalent des testicules chez les hommes. Cependant, ce n'était pas l'opinion d'Aristote (384-322 A.D) qui lui croyait que l'utérus contenait plutôt un fluide qui une fois mélangé au sperme de l'homme donnait lieu à un cœur à l'intérieur du fœtus qui à son tour gouvernerait le développement de l'embryon. Hérophilus, un anatomiste du troisième siècle A.D, issu de la même école à Alexandrie que ces prédécesseurs, fut le premier à

décrire les ovaires. Cependant, même s'il a bien décrit le col de l'utérus et l'utérus, il affirmait que les ovaires étaient reliés à la vessie par ce qu'on appelle aujourd'hui les trompes de Fallope. Cette croyance a persisté pendant presque 500 ans jusqu'au temps où Galen (A.D 130-200), un médecin et biologiste grec (qui lui aussi a étudié à l'école d'Alexandrie) a observé que les ovaires étaient en effet reliés à l'utérus. Ce dernier a émis l'hypothèse que c'est le mélange du liquide séminal mâle et femelle (provenant des ovaires) qui est à l'origine de la vie. La doctrine de Galen, avec ses échos d'Aristote, persista pendant presque 14 siècles! Ensuite, au cours du 16^{ième} et du 17^{ième} siècle, il y a eu des contributions importantes de la part de scientifiques tels que Vesalius, Fallopius et Fabricius qui ont produit des dessins très précis du système reproducteur. Cependant, c'est William Harvey (1578-1657) qui fut le premier à mettre en doute la théorie du mélange du sperme et du liquide séminal des ovaires comme origine de l'embryon et il a affirmé que le sperme n'est pas à l'origine du fœtus. De plus, sans encore connaître ni le rôle ni la fonction des ovaires dans la reproduction, il publia un ouvrage (*Ex ovo omnia*) dans lequel il émit l'hypothèse que tous les êtres vivants viennent des œufs. Les preuves de son hypothèse seront présentées seulement 200 ans plus tard. Avec l'apparition de la microscopie (vers la fin du 17^{ième} siècle), l'étude du système reproducteur progressa beaucoup plus rapidement. De Graaf observa le passage des ovules dans les trompes de Fallope. Cependant, il n'avait pas encore de preuve que l'ovule provient de l'ovaire. C'est seulement en 1827 que von Baer observa l'ovule à l'intérieur de l'ovaire. C'était donc la première étape importante dans la caractérisation de la composition cellulaire des ovaires [97].



Images représentant le système reproducteur des femmes enceintes étudié et dessiné par Vesalius (1514-64) à gauche et Leonardo da Vinci (1452-1519) à droite [97, 102].

1.1.3 L'anatomie de l'ovaire

L'ovaire est constitué de deux zones l'une centrale ou médullaire et l'autre périphérique ou corticale. La zone médullaire n'a pas de limites précises et elle est située au centre de l'ovaire. Elle est composée d'un tissu conjonctif lâche et elle contient surtout des nerfs, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques. La zone corticale, quant à elle, est composée tout d'abord d'une couche conjonctive dense sous épithéliale qui est l'albuginée. Sous cette dernière, on retrouve le stroma cortical qui contient les 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. Il faut

souligner que dès la naissance de la femme, l'ovaire contient tous les ovules que cette femme émettra au cours de son existence. Cet organe est rattaché au ligament large (ligament qui est attaché de chaque côté de la paroi pelvienne pour supporter l'utérus) par le mésovarium qui est un repli péritonéal qui permet le passage des vaisseaux et des nerfs. La prolongation du revêtement épithélial pavimenteux du mésovarium est à l'origine de l'épithélium de surface de l'ovaire. Ce dernier est une monocouche de cellules cubiques simples dont les noyaux sont hyperchromatiques et le cytoplasme est peu abondant [98].

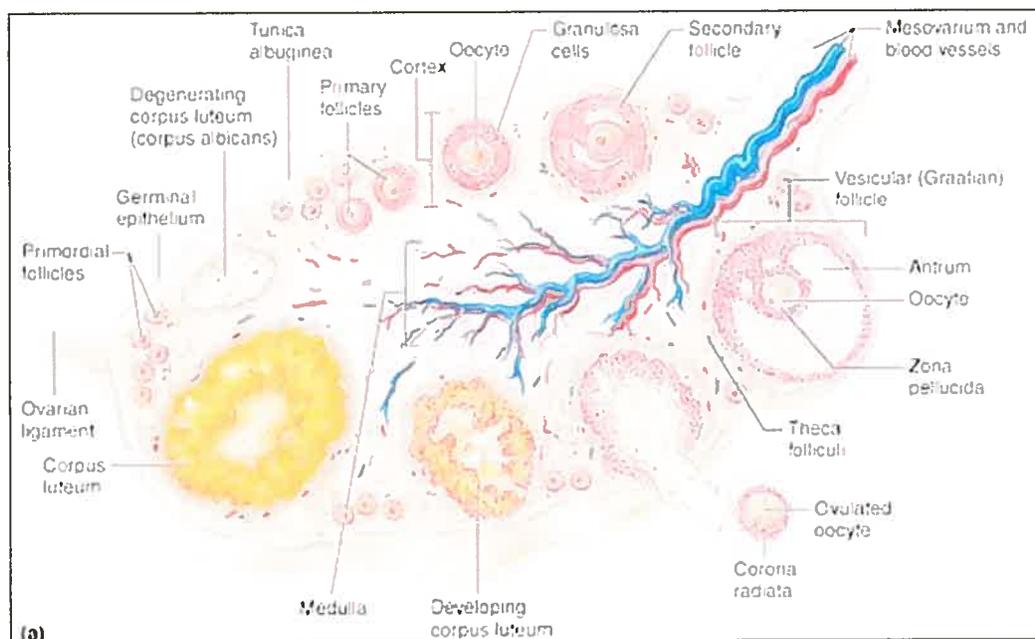


Image représentant l'anatomie microscopique de l'ovaire [98].

1.1.4 Les tumeurs ovariennes

L'épithélium de surface de l'ovaire est très important au niveau de la tumorigenèse de l'ovaire. En effet, plus de 80% des cancers ovariens sont d'origine épithéliale. Les tumeurs germinales et les tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels comptent pour 20% des cancers ovariens. Ce sont les trois principales classifications histologiques du cancer primaire de l'ovaire et chacune des catégories inclus un nombre de sous-types [16]. La complexité des tumeurs ovariennes tient à la multiplicité des types lésionnels rencontrés, conséquences d'une embryogenèse complexe.

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. Ainsi, les tumeurs épithéliales communes peuvent être classées en tumeurs séreuses (les plus communes), mucineuses, endométrioïdes, de Brenner, des adénocarcinomes à cellules claires, mixtes épithéliales et des carcinomes indifférenciés. Les tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels sont classées en tumeurs à cellules de la granulosa et stromales, en tumeurs de Sertoli-Leydig, en tumeurs des cordons avec tubules annelés et en gynandroblastoma. Enfin, les tumeurs germinales se divisent en dysgerminome, tumeur du sinus endodermique, carcinome embryonnaire, polyembryome, choriocarcinome, tératome immature, tératome mature, tératome mono-dermique, tumeurs germinales mixtes associées aux éléments du mésenchyme ou des cordons sexuels.

Les tumeurs sont également classées en bénignes si elles ne présentent pas de prolifération cellulaire exubérante et n'ont pas de comportement invasif. En « borderline » (ou à faible potentiel de malignité) si elles prolifèrent de façon importante mais qu'il n'y a pas lieu d'invasion. Finalement, en tumeurs malignes lorsqu'on retrouve de l'invasion. De plus, on évalue l'étendue et la sévérité de l'atteinte tumorale en y attribuant un stade (de I à IV). Le stade I correspond aux tumeurs limitées aux ovaires. Les tumeurs de stade II sont unilatérales (IIA) ou bilatérales (IIB) avec extension pelvienne qui peut être génitale (utérus et trompe) ou viscérale (vessie, intestin grêle), ou encore avec une présence d'ascite (IIC). Le stade III est celui des tumeurs unilatérales ou bilatérales avec métastases intrapéritonéales et extrapelviennes. Enfin, le stade IV correspond aux tumeurs unilatérales ou bilatérales avec métastases à distance comme par exemple des métastases hépatiques ou pulmonaires [95]. De plus, on attribue aux tumeurs des grades selon le degré de différenciation ou de maturité qu'ont atteint les cellules qui composent ces tumeurs. Ainsi, il y a des tumeurs hautement (grade 1), modérément (grade 2) ou peu (grade 3) différenciées [16, 17].

1.1.5 L'épithélium de surface

Dû au fait que la grande majorité des cancers ovariens sont dérivés de l'épithélium de surface, il est important de discuter de la morphologie et de la structure de cette couche cellulaire. La surface extérieure des ovaires est composée d'une monocouche de cellules dérivées de l'épithélium cœlomique que l'on appelle l'épithélium de surface. Ces cellules ont une forme allongée ou cuboïdale [18, 19]. On réfère souvent à l'épithélium de surface comme un

mésauthélium (couche cellulaire qui tapisse la cavité péritonéale) puisqu'ils partagent la même origine embryologique et quelques caractéristiques mésauthéliales.

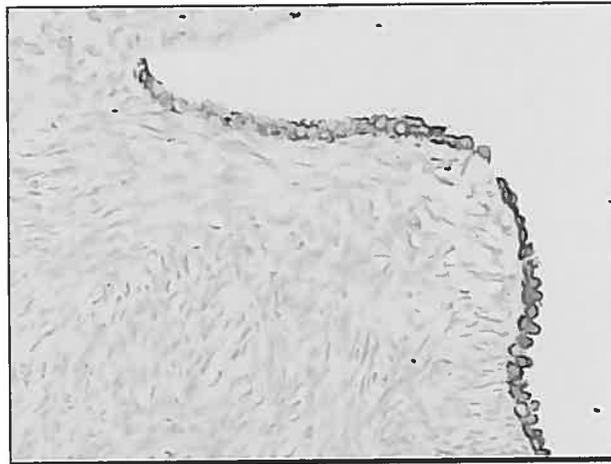


Image représentant une coupe histologique d'un ovaire sain où l'on peut voir en bordure l'épithélium de surface. (L'image est tirée des travaux effectués au sein du laboratoire).

Ainsi, l'épithélium de surface possède des caractéristiques épithéliales telles que les kératines, les mucines, les desmosomes, les microvilis apicales et la lame basale. Cependant, on y retrouve également des caractéristiques mésenchymales 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. Malgré sa structure relativement simple, l'épithélium de surface joue un rôle important au niveau des ovaires. Les cellules de l'épithélium de surface humain des ovaires secrète des enzymes lysosomiaux qui détruisent les tissus conjonctifs constituant la paroi des follicules matures. Il prend donc part dans le

cycle ovulatoire de rupture et de réparation en modulant la synthèse de la matrice extracellulaire. Après ovulation, les cellules de l'épithélium de surface participent également dans le processus de réparation du follicule ovarien ce qui a pour conséquence de former des inclusions épithéliales dans le stroma (ou encore des kystes d'inclusion qui sont également soupçonnées d'avoir la capacité de générer des cancers ovariens dû à leur origine épithéliale). De plus, l'épithélium de surface transporte les matériaux de et à la cavité péritonéale et il possède 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 [19-21]. 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 [22]. Cette hypothèse fut proposée pour la première fois par un pathologiste du nom de Fathalla en 1971 [23]. Il a spéculé que le processus de la prédisposition maligne de l'épithélium de surface était relié à la rupture de la surface de l'épithélium durant l'ovulation. Sa théorie « d'ovulation incessante » fut basée sur les études épidémiologiques qui associaient la nulliparité avec un risque plus élevé du cancer de l'ovaire. 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 [24]. 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. Maintenant, nous savons que le simple processus de réplication d'ADN est mutagénique en soi puisqu'il est prompt à

l'erreur [25]. 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 [26]. Les contraceptifs oraux et la grossesse protègent entre autres contre cette maladie en diminuant le nombre d'ovulations [26]. Ainsi, même si l'épithélium de surface des ovaires occupe environ 1% d'un ovaire normal et qu'il semble être un simple mésathélium, il est d'une importance pathophysiologique considérable dans la genèse du cancer ovarien [22].

1.2.0 Les modèles du cancer de l'ovaire

Malgré une connaissance plus approfondie de l'étiologie du cancer de l'ovaire, d'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. Les modèles expérimentaux sont donc d'une importance cruciale afin de comprendre les facteurs biologiques et génétiques qui jouent des rôles importants dans la maladie du cancer de l'ovaire afin de développer de nouvelles stratégies d'intervention et pour la compréhension plus approfondie de la tumorigenèse ovarienne. Le cancer de l'ovaire, comme tout autre système biologique, est une maladie complexe composée de plusieurs facteurs qui jouent tous des rôles importants. 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 très complexe, sinon impossible en plus soulever des questions d'ordre éthique. La science expérimentale progresse en contrôlant une variable à la fois et en observant les effets générés par la modulation de cette variable d'où la nécessité de développer différents modèles. L'inconvénient majeur des modèles est cependant le fait que ce ne sont que des modèles et non pas la véritable maladie. Par leur nature, ils ne sont qu'une réflexion imparfaite de la maladie en investigation et de sa dynamique *in vivo* dans l'hôte. D'où l'importance de l'utilisation et du choix adéquat des modèles. Un échec dans le choix du modèle pour l'étude d'un problème donné peut compromettre un programme de recherche des plus inspiré et méticuleux.

Plusieurs types de modèles ont déjà été développés afin de faciliter des études sur les cancers. Tous les modèles ont des avantages et des désavantages qui doivent être pris en considération lors de leur choix pour des études subséquentes.

1.2.1 Les tissus tumoraux

Les tissus tumoraux provenant du patient sont probablement le modèle *in vitro* le plus représentatif de la maladie humaine *in vivo* ou plutôt de cette maladie au moment où l'échantillon est prélevé. Cependant, la difficulté d'étudier ce modèle réside principalement dans l'inaccessibilité des échantillons ainsi que dans le fait que ces tissus sont très hétérogènes au niveau des populations cellulaires qui les composent. De plus, les populations cellulaires d'intérêt peuvent être minoritaires dans certains types de cancers et représenter une petite partie de l'échantillon. Les tissus tumoraux peuvent également être composés autant de cellules tumorales que des cellules normales ce qui peut rendre

l'interprétation des études de tissus entiers problématique. L'hétérogénéité peut également être considérée comme un avantage des tissus tumoraux et ce par le fait qu'elle reflète la complexité du microenvironnement tumoral qui peut moduler la croissance ainsi que les interactions cellulaires. De plus, nous ne pouvons nier l'importance des tissus tumoraux (et normaux) dans les études d'immunohistochimie ainsi que dans la dérivation des lignées cellulaires [27].

1.2.2 La microdissection au laser

La compréhension des événements moléculaires qui sont à l'origine de la morphogenèse du tissu normal et de l'évolution des lésions pathologiques représente un défi scientifique important. Les tissus sont des structures tridimensionnelles complexes et composées de différents types de populations cellulaires qui interagissent ensemble ce qui représente une difficulté de taille lors des études des tumeurs. L'hétérogénéité cellulaire est donc un désavantage majeur des tissus tumoraux d'origine [28, 29]. La microdissection au laser représente une nouvelle technologie qui nous permet d'isoler des populations homogènes de cellules à l'intérieur même de l'environnement tissulaire dans lequel elles se trouvent [30]. La méthode nous permet donc de surmonter le problème de l'hétérogénéité tissulaire. De plus, elle nous permet de définir et d'analyser séparément des sous-populations de cellules à l'intérieur d'une néoplasie et d'identifier ainsi des propriétés ou caractéristiques qui leur sont propres. De telles études, autrement presque impossibles à réaliser, peuvent maintenant fournir des informations cruciales sur la biologie tumorale [29].

La technologie de la microdissection au laser fut développée au National Cancer Institute au National Institutes of Health (Bethesda, MD, Etats-Unis) et Emmert-Buck *et al* ont été les premiers à la décrire [99]. La méthodologie consiste à mettre une lame contenant une coupe de tissu sur le plateau du microscope et d'y choisir une zone d'intérêt. Ensuite, une capsule couvre la région d'intérêt du spécimen tissulaire avec un film de thermoplastique transparent (composé d'éthylène vinyle acétate soit EVA). On choisit les cellules cibles et on ajuste la taille de la région couverte par le laser à la taille appropriée pour le prélèvement. Enfin, on active un laser infra rouge qui fait fondre le plastique directement au dessus de la région à prélever. Ce polymère fondu se dilate et imprègne l'espace vide dans le tissu ciblé pour ensuite se solidifier en refroidissant rapidement. Lorsque la capsule est levée du tissu, celui-ci déchire sur les bords du composé polymère/tissu laissant tout le tissu non ciblé attaché à la lame. Ainsi, seulement le tissu ciblé par le laser et capturé par le polymère est transféré tandis que le reste du tissu reste intact sur la lame pour les analyses ultérieures. La morphologie des cellules transférées reste intacte et peut être visualisée sous le microscope. Les cellules sont ensuite récupérées dans un tube (ependorf) contenant des solutions nécessaires afin d'isoler les molécules d'intérêt (ARN, ADN, etc.) [28-30]. Les plus grandes qualités de cette technique (par rapport aux autres techniques de microdissection) sont la précision et la versatilité.

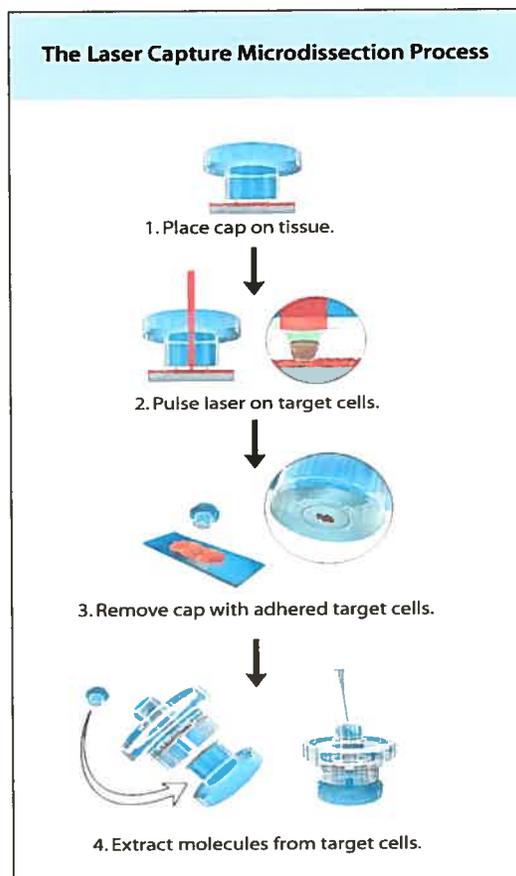


Image représentant les principales étapes de la méthodologie de la microdissection au laser. Image tirée du site officiel d'Arcturus® [103].

Ce système élégant n'est pas cependant sans défauts. Le principal étant le fait que l'échantillon obtenu est de très petite taille. Les études subséquentes demandent donc une amplification ce qui peut induire certains biais. De plus, l'échantillon de tissu sous forme de coupe placé sur une lame n'est pas recouvert d'une lamelle ce qui a pour effet de diminuer la résolution optique et peut occasionner, dans certains cas, des problèmes au niveau de la précision de dissection. De plus, cette technologie requiert un investissement financier important tant pour le microscope et le système informatique qui l'accompagne

que pour le personnel qualifié et disponible (surtout dans le cas où un grand nombre d'échantillons doivent être traités) [31].

1.2.3 Le modèle animal

La diversité génétique et la difficulté au niveau de l'accessibilité des tumeurs et des échantillons de tissu 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 ou *in vivo*.

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

George D.Snell [100]

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 [101]. Au cours des deux dernières décennies, l'utilisation des souris dans la recherche sur le cancer a significativement augmenté avec l'avènement de transgénèse et du ciblage génétique pour créer de nouvelles lignées de souris susceptibles de développer différents cancers. De plus, ces lignées nous ont permi

de mieux comprendre les gènes impliqués dans la tumorigenèse humaine, la progression histopathologique des cancers ainsi que les voies de signalisation impliquées dans les cancers. De plus en plus, nous sommes conscients que le cancer est une maladie de l'organisme et non seulement de quelques cellules génétiquement dérégulées. Ainsi, certains aspects de la maladie du cancer ne peuvent être étudiés que dans le contexte d'un animal entier où les néoplasies se développent dans un microenvironnement approprié. On n'a qu'à penser aux interactions complexes qui existent entre la tumeur et l'hôte. Les souris transgéniques sont sans aucun doute un outil important sinon essentiel pour l'avancement de la recherche tant fondamentale que clinique (surtout au niveau des études sur les nouvelles stratégies thérapeutiques). Malgré de nombreux avantages du modèle souris *in vivo*, il ne faut pas oublier que cela ne reste qu'un modèle et qu'il n'est pas sans défauts. Ainsi, la principale caractéristique qui éloigne le modèle murin de l'humain est la différence entre les espèces. Le développement de la souris est évidemment différent de celui de l'homme et si on regarde seulement au niveau de la taille, dans la souris il y a considérablement moins de tissus cibles pour les transformations oncogéniques. De plus, la longévité de la souris affecte différemment l'apparition et la progression de la tumeur qui dans ce cas doit avoir un programme accéléré par rapport à l'humain où la maladie peut être latente pendant plusieurs années avant de se manifester [2]. Il faut également souligner que le développement de modèles de souris pour différents cancers peut être très long, fastidieux et coûteux. Finalement, il est important de mentionner qu'au niveau des modèles *in vivo* la souris n'est pas le seul animal utilisé mais plutôt l'animal le plus souvent utilisé. Ainsi, pour le

cancer de l'ovaire, en plus de souris, on a étudié par exemple des poulets (à cause de la haute fréquence de l'ovulation due à la pondaison) [24] et des rats (des rats Wistar et Sprague-Dawley) [32, 33] qui développent ce type de cancer spontanément. D'autres types de cancers ont également été étudiés entre autres dans les modèles félins, canins, chez les cochons ou encore chez les singes.

1.2.3.1 Les xénogreffes

Une autre façon d'utiliser les animaux en tant que modèles, sans pour autant effectuer des changements génétiques au niveau de leurs génomes, sont les xénogreffes. Ainsi, dans le modèle xénogrefe, on injecte les souris NU (athymiques) ou encore des souris SCID (avec immunodéficienc e combinée sévère) qui sont toutes les deux immunodéficientes avec des cellules tumorales provenant directement des biopsies ou des cultures cellulaires [34]. La croissance d'un tissu tumoral dans une souris Nu immunodéficiente fut rapportée pour la première fois en 1969 par Rygaard et Povlsen [35]. 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 d'une importance capitale au niveau du développement préclinique de nouvelles drogues anticancéreuses [34]. Cependant, les études sur les modèles xénogreffes impliquent plusieurs variables qui peuvent avoir un impact sur les résultats finaux. Ainsi, le site de l'implantation, les caractéristiques de croissance de la xénogrefe et sa taille lorsque le traitement est appliqué, les modalités de l'administration de l'agent étudié sont parmi les facteurs qui peuvent faire en sorte qu'un traitement anti-cancéreux peut être très efficace chez les souris et pas du tout chez l'humain

[36]. De nombreuses études effectuées par le groupe de Dr. Fidler ont également démontré que le microenvironnement d'un organe peut affecter la réponse cellulaire à la chimiothérapie en plus d'influencer la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et la survie cellulaire [115-117]. De plus, il y a certaines études où l'utilisation de ce type de modèle n'a aucune valeur comme par exemple les études sur les métastases (les xénogreffes sous cutanées métastasient rarement) ou encore des études sur l'angiogenèse (la vascularisation dans ces modèles est d'origine murine) [34]. Il est également important de souligner que le système immunitaire joue un rôle important au niveau des cancers tant de protection que de sélection de certains types de cellules tumorales. En effet, il a été démontré que les tumeurs formées en absence du système immunitaire intacte sont plus immunogéniques que celles formées à l'intérieur d'un hôte immunocompétent [37]. Ainsi, ces faits doivent être pris en considération lors des études faisant appel à l'utilisation des souris immunodéficientes. De plus, l'utilisation des modèles xénogreffes peut demander beaucoup de temps et de ressources mais ils peuvent aussi être une source renouvelable et relativement facilement accessible de cellules tumorales humaines. Finalement, l'utilisation de n'importe quel type de modèle animal pose toujours des considérations d'ordre éthique importantes à évaluer.

1.2.4 Les cultures primaires

Une alternative à l'utilisation des modèles animaux *in vivo* c'est évidemment l'utilisation de modèles *in vitro* développés et caractérisés au cours du dernier siècle. Il existe encore très peu de modèles *in vitro* des cancers. On a

tout d'abord les cultures primaires, ensuite les lignées cellulaires et enfin les cultures tridimensionnelles. Les cultures primaires consistent à prélever des tumeurs (à partir de biopsies, suite à une chirurgie ou provenant d'ascites) ou encore de tissu ovarien normal et de les mettre en culture dans un milieu propice à leur croissance. L'avantage de ce système est surtout la facilité à obtenir les cultures primaires et aussi le fait qu'il représente le matériel de départ en l'occurrence le tissu ovarien normal ou malin [38]. Cependant, le désavantage majeur des cultures primaires est le fait que ces cultures ne sont pas immortelles et qu'elles vont mourir après un certain nombre de passages. De plus, dépendamment de la méthode de mise en culture des cellules, il peut y avoir contamination des cellules tumorales par des fibroblastes et ensuite sélection d'une certaine sous-population de cellules plus tolérantes aux nouvelles conditions de croissance.

1.2.5 Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont quant à elles dérivées des cultures primaires suite à une immortalisation spontanée ou encore induite. Les lignées cellulaires peuvent donc se diviser indéfiniment. L'avantage principal et le plus important des lignées cellulaires est la facilité de manipulation de ces cellules et l'accessibilité au matériel pour les études. Cependant, la culture cellulaire (que ce soit des cultures primaires ou des lignées cellulaires) peut ne pas représenter de façon adéquate les événements moléculaires qui ont lieu dans le tissu d'origine. Les cellules en culture peuvent perdre certaines de leurs propriétés lorsqu'elles sont séparées des éléments de tissu qui contrôlent l'expression génique telles que les facteurs solubles, la matrice extracellulaire et les interactions cellule-cellule.

Donc, l'absence de l'hétérogénéité dans les cultures cellulaires représente une barrière importante au niveau de l'analyse moléculaire du tissu normal et tumoral [29]. Cependant, 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. De plus, 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, les lignées cellulaires ont joué un rôle majeur dans les recherches sur le cancer. De nombreux groupes ont réussi de dériver et caractériser différentes lignées du cancer épithélial de l'ovaire. Cependant, on ne connaît pas toujours leur provenance ou encore les traitements qu'a pu subir la patiente dont provient la lignée cellulaire en question. Ces informations sont primordiales lorsqu'on veut étudier la tumorigenèse ovarienne puisque les cellules sont différentes selon le type de cancer dont elles proviennent et leur comportement est souvent parallèle à celui observé *in vivo* [52]. Les traitements que subissent les patientes peuvent également influencer les cellules en culture et donc introduire des événements géniques indésirables dans le cas des études de profils géniques par exemple.

Enfin, il devient de plus en plus évident que les cultures en monocouches de cellules tumorales ne peuvent représenter adéquatement les caractéristiques des tumeurs solides qui sont tridimensionnelles.

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>

Tableau représentant quelques unes des lignées cellulaires dérivées du cancer épithélial de l'ovaire [104-115].

1.2.6 La culture 3D

Dans les années 1970, Sutherland et ses associés ont développé un nouveau modèle tridimensionnel de tumeur afin d'étudier de façon systématique la réponse tumorale aux traitements [39]. 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 [39-42]. Les sphéroïdes sont donc des agrégats sphériques de cellules et ils ont une complexité intermédiaire entre les tumeurs *in vivo* et les cultures en monocouches. De plus, il a déjà été démontré qu'ils représentent un modèle plus adéquat pour l'étude de la biologie tumorale que les modèles de culture en monocouche [39, 41]. En effet, il est important de se rappeler que les diverses caractéristiques tumorales telles que la croissance, les métastases et la résistance aux différents types de traitements anti-tumoraux sont souvent dictées par les propriétés collectives des populations de cellules tumorales plutôt que par les propriétés

intrinsèques d'une cellule tumorale individuelle. Cet effet de 'communauté multicellulaire' est déterminé par des interactions directes ou indirectes des cellules tumorales entre elles ou encore avec le microenvironnement qui les entoure. Ainsi, ces interactions provoquent différents changements moléculaires au niveau de la cellule tumorale et peuvent affecter l'expression génique ainsi que le comportement biologique de cette cellule [43, 44].

Afin que les cellules puissent croître sous forme d'agrégats tridimensionnels, elles doivent se trouver dans des conditions où les forces adhésives entre les cellules sont plus grandes que les forces adhésives entre ces cellules et le substrat sur lequel elles sont cultivées. Ainsi, il existe plusieurs méthodes pour initier la culture des sphéroïdes à partir des lignées cellulaires dérivées des différentes tumeurs.

Tout d'abord, la façon jusque là la plus simple était de cultiver les cellules dans le milieu approprié sur un base d'agar qui empêche les cellules d'adhérer sur le substrat. Ainsi, les cellules migrent l'une vers l'autre et forment spontanément des agrégats. Ensuite, les cellules se divisent ce qui a pour effet d'augmenter la taille du sphéroïde [45]. Les cellules n'adhèrent pas au substrat mais plutôt poussent sur ce substrat. Ce détail est cependant important puisque le fait que les cellules sont en contact avec le substrat peut changer leur comportement d'adhésion. D'autres types de substrats tels que l'agarose ou les membranes Matrigel® peuvent être utilisés pour remplacer l'agare.

Une autre approche à la culture tridimensionnelle est l'utilisation de systèmes rotatifs giratoires. Essentiellement, il s'agit de mettre les cellules dans un erlenmeyer avec une quantité appropriée de milieu que l'on place ensuite sur

un agitateur dans l'incubateur. Ainsi, comme l'erenmeyer est agité et que les cellules sont en mouvement dans le liquide, elles n'entrent en contact avec aucun substrat. Cette méthode est utile lorsqu'on veut produire un grand nombre de sphéroïdes à la fois [45]. Une alternative à ce système est un système développé par la NASA dans les années 1990 (Rotary Cell Culture System). En simulant la microgravité, les cellules sont maintenues dans une suspension de fluide dynamique qui est agité 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 [46]. Les résultats de ce type de culture montrent que les sphéroïdes cultivés dans ce système sont non seulement de plus grande taille mais également d'avantage différenciés morphologiquement et phénotypiquement que les sphéroïdes obtenus par la culture dans les systèmes rotatifs giratoires [45]. Mais, l'avantage probablement le plus important du système développé par NASA est le fait qu'on peut y introduire différents types cellulaires afin de faire des études de co-culture. Évidemment, le coût d'un tel système devient une barrière importante lorsqu'on envisage la culture de sphéroïdes à grande échelle.

Des cultures tridimensionnelles *in vitro* peuvent également être effectuées sur des systèmes de support ou d'échafaudage préfabriqués. Ces supports sont le plus souvent à base de collagène. De nouveaux supports biodégradables consistant de molécules naturelles ou de polymères synthétiques peuvent également en faire partie. Ainsi, les cellules s'attachent à ces structures et migrent le long des fibres qui les composent. Ensuite, les cellules, qui peuvent provenir

des cultures primaires aussi bien que des lignées cellulaires, se divisent et remplissent les espaces interstices pour former des structures tridimensionnelles. Ces supports ont le potentiel de reproduire un environnement similaire au tissu vivant [47, 48]. Aussi, comme les supports sont composés de molécules qui font partie de la matrice extracellulaire, en plus de fournir un support naturel aux cellules, ils peuvent également fournir des signaux de voies de signalisation qui jouent un rôle au niveau de la migration, de la prolifération et de la différenciation. Ce système de culture est aujourd'hui surtout utilisé dans le domaine de l'ingénierie de différents tissus telles que les os, la peau ou encore des tissus cardiaques. La culture sur support est encore peu connue en oncologie. De plus, en choisissant ce type de culture tridimensionnelle, on fait face aux problèmes d'ordre économique, de la difficulté d'appliquer ces systèmes aux cultures à grande échelle ainsi que des problèmes au niveau de la reproductibilité.

Finalement, il existe une dernière méthode de culture tridimensionnelle qui a été récemment développée en parallèle par notre laboratoire et le groupe de Lars K.Nielsen [49] et qui fait objet de ce travail. La méthode en question est la culture en gouttelettes inversées (hanging droplets) et elle sera décrite plus en profondeur dans la section matériel et méthodes.

Le sphéroïde est donc un modèle *in vitro* qui devient de plus en plus intéressant au fur et à mesure que de nouvelles méthodes de culture sont développées surtout lorsque ces méthodes sont de plus en plus faciles à appliquer, peu coûteuses et capables d'être intégrées dans des études à grande échelle. Ce sont là quelques caractéristiques que devrait avoir une bonne méthode de culture cependant, le modèle généré par une telle méthode doit surtout avoir la

caractéristique de bien représenter le système, l'organisme ou le phénomène que l'on veut étudier. Ce modèle devrait également être reproductible, facilement accessible et permettre d'étudier plusieurs aspects différents, dans notre cas, du cancer épithélial de l'ovaire.

1.3 Micropuces

L'avènement des nouvelles technologies au niveau de la génomique telles que les micropuces d'ADN nous permet d'accomplir des études de plus en plus poussées afin de mieux caractériser et analyser les nouveaux modèles. Auparavant, l'analyse de l'expression génique se faisait en étudiant l'expression d'un gène à la fois typiquement en utilisant la technologie du «Northern Blot». Cependant, la technologie des micropuces nous permet l'étude rapide et simultanée de plusieurs milliers de gènes à la fois. La première utilisation de la technologie de micropuces d'ADN fut publiée en 1987 par Augenlicht *et al.* Ces chercheurs ont utilisé une membrane de nylon contenant 4000 ADN complémentaires dans le but d'étudier les changements dans l'expression génique dans le cancer du colon [50]. Depuis ce temps, les micropuces ont été grandement raffinées et modifiées afin d'optimiser la sensibilité des études ainsi que le nombre de gènes examinés dans une expérience donnée. Il existe principalement deux façons différentes de production des micropuces d'ADN. La première consiste à placer des ADN complémentaires ou des courts oligonucléotides déjà synthétisés sur un support solide. La deuxième méthode est une production directe des oligonucléotides sur un support et elle implique la photolithographie. Il existe différents supports qui peuvent être utilisés (membrane de nylon, silicone ou des lames en verre). Ces supports permettent à l'ADN de s'y attacher et en plus, ils

ont une faible fluorescence de fond. Les séquences des gènes qui font partie de la micropuce sont choisies à partir de différentes banques de données publiques qui contiennent des informations sur des séquences de gènes déjà caractérisés aussi bien que sur des séquences dont la fonction n'est pas encore connue (EST). Ensuite, les oligonucléotides qui se trouvent sur la micropuce servent d'une sorte d'appât pour les sondes marquées. Les sondes sont préparées à partir de l'ARN extrait de l'échantillon que l'on veut étudier et cet ARN est marqué avec un colorant fluorescent soit la cyanine. Une fois que l'hybridation a eu lieu, on mesure l'intensité de la fluorescence pour chaque point. La technologie d'Affymetrix nous donne ainsi un signal qualitatif et quantitatif tandis que la technologie alternative compare les échantillons testés à une référence. On obtient donc une signature génétique de l'échantillon à un moment donné dans le temps [38]. L'avantage principal de cette nouvelle technologie est la capacité de voir un système dans son ensemble. On sait que le cancer est causé par un ensemble de facteurs et c'est en étudiant les patrons d'expression de gènes plutôt que les gènes individuels que l'on peut mieux comprendre cette maladie. Le désavantage principal de la technologie des micropuces est paradoxalement son plus grand avantage soit la quantité de données générées. Lorsqu'on compare plusieurs milliers de gènes à la fois d'un échantillon à l'autre, très vite on se rend compte qu'on doit faire appel aux outils bioinformatiques puissants et ces derniers ne sont pas encore parfaits. Ainsi, parmi les nombreux outils bioinformatiques disponibles pour l'analyse de données de biopuces il y a tout d'abord l'approche de prédiction de classes qui est une méthode que l'on appelle la méthode supervisée. Elle consiste en une comparaison entre différents groupes prédéfinies

d'échantillons (par exemple cellules normales versus cellules tumorales) ce qui permet l'identification de gènes à l'aide desquels on peut ensuite prédire l'appartenance d'un l'échantillon à l'un ou l'autre des groupes et ce avec une grande force de prédiction. Cette méthode s'appelle donc supervisée puisqu'elle implique que l'observateur définit *a priori* les différentes classes ou groupes d'échantillons. La méthode non supervisée quant à elle implique que les classes ne sont pas prédéfinies et elle fait appel aux différents outils afin de déterminer les classes selon la similarité des profils d'expression génique. Les analyses de regroupements en sont un exemple [38]. Il nous reste encore beaucoup de travail avant que l'on puisse établir une seule et excellente méthode d'analyse des données de micropuces. Néanmoins, les résultats que l'on obtient déjà sont très prometteurs. Il faut également souligner que les biopuces représentent un outil très important et puissant pour la comparaison des différents modèles puisqu'elles nous permettent d'étudier les systèmes dans leur ensemble et d'observer et identifier les différents gènes modulés d'un système à l'autre. Ceci est un avantage considérable 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 interaction de plusieurs gènes à la fois.

1.4 Objectifs

1.4.1 Objectif principal

L'objectif principal de mon étude est de développer un nouveau modèle tridimensionnel *in vitro* du cancer épithélial de l'ovaire en se basant sur l'hypothèse que ce modèle tridimensionnel, par certains aspects, va être une

réflexion plus juste de ce qui se passe *in vivo* par rapport au modèle de culture en monocouche. Cet objectif est également le plus grand défi de ce travail puisqu'il demande de faire face à une méthodologie sans précédent. À partir de trois lignées de cancer épithélial de l'ovaire (OV90, TOV112 et TOV21G) développées auparavant au laboratoire, nous désirons d'établir un modèle 3D reproductible, facilement manipulable, économique et surtout plus représentatif de la maladie *in vivo* que le modèle *in vitro* en monocouche. De plus, le nouveau modèle doit permettre l'isolation d'une quantité d'ARN de bonne qualité suffisante afin de pouvoir effectuer des études de son profil génique.

1.4.2 Objectif secondaire

L'objectif secondaire sera de comparer ce nouveau modèle tridimensionnel *in vitro* au modèle monocouche ainsi qu'au modèle xéno greffe *in vivo* afin de déterminer si en effet, le nouveau modèle 3D se rapproche du modèle *in vivo* d'avantage que le modèle de culture en monocouche. Dans cette optique, mon projet se divise 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, d'effectuer des études de comparaison des profils géniques entre ces différents modèles afin d'établir les similarités ou les différences entre eux en plus de trouver des gènes candidats spécifiques au nouveau modèle 3D qui pourront éventuellement servir de cibles potentielles de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour les analyses génomiques, nous nous servons de la technologie des micropuces Affymetrix. Nous voulons comparer ainsi le profil génique du modèle 3D aux profils géniques des cultures

en monocouches et des xénogreffes établis à partir des mêmes lignées cellulaires qui sont à l'origine du modèle 3D. Nous désirons ainsi trouver des gènes qui rapprochent le modèle 3D *in vitro* du modèle *in vivo* et que l'on ne retrouve pas dans le modèle monocouche. Ces gènes représenteraient des gènes candidats qui pourront désormais être étudiés *in vitro*.

1.4.3 Objectif tertiaire

La caractérisation du modèle tridimensionnel par des études d'immunohistochimie et des phénomènes que l'on retrouve dans les tumeurs *in vivo* (comme par exemple l'hypoxie) s'ajoute aux objectifs précédents. Nous voulons également établir des lignées cellulaires fluorescentes, à partir desquelles nous allons développer des sphéroïdes fluorescents qui pourront nous servir dans les études subséquentes de co-cultures.

Finalement, nous désirons appliquer notre modèle tridimensionnel aux différentes autres études qui sont conduites au laboratoire telles que des tests d'invasion sur les matrices Matrigel ou encore l'influence de différents facteurs tels que la concentration de sérum ou encore la présence de surnageants d'ascites sur les cellules en culture tridimensionnelle.

2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Le modèle monocouche

Les trois lignées cellulaires du cancer épithélial de l'ovaire (TOV112D, TOV21G et OV90) ont été cultivées et maintenues dans du milieu OSE (Ovarian Surface Epithelium) composé d'un mélange 50:50 des milieux 199 et 105 (Sigma). Ce milieu a été supplémenté avec 2,5 µg/ml de fongizone, 50 µg/ml de gentamycine et 10% de sérum foetal bovin (FBS). Les cellules ont été maintenues dans un incubateur humidifié à 37°C avec une atmosphère de 5% de CO₂. Les divisions cellulaires ont été effectuées, dans une proportion de 1:2, deux fois par semaine.

2.2 Le modèle xéno greffe

Afin d'obtenir les modèles xéno greffes du cancer épithélial de l'ovaire, nous avons injecté des souris NU de la souche Cd-1® BR homozygotes (de Charles River) avec des cellules de chacune des trois lignées cellulaires étudiées (soit TOV112D, TOV21G, OV90). Trois millions de cellules dans un volume de 0,3ml de PBS ont été injectées de façon sous cutanée ou intrapéritonéale dans les souris femelles de 7-8 semaines. En parallèle, les souris contrôles ont été injectées avec une solution PBS à un pH de 7,4. Les souris ont été sacrifiées lorsque la tumeur visible atteignait une taille de 1cm ou lorsque la souris présentait des symptômes cliniques de malaises. Toutes les souris ont été sacrifiées après une période de 4 mois. Une partie des tumeurs prélevées a été immédiatement placée dans une solution RNA Later (d'Ambion®), afin de préserver l'ARN pour les

extractions ultérieures. L'autre partie de la tumeur a été placée dans une solution de PBS afin de nous permettre la mise en culture des cellules de ces tumeurs.

2.3 Le modèle sphéroïde

Les sphéroïdes ont été développés à partir des trois lignées cellulaires étudiées (soit TOV112D, TOV21G et OV90). Ils ont été maintenus dans le même milieu OSE utilisé pour la culture des cellules en monocouches contenant 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de fongizone, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine et 10% de sérum foetal bovin (FBS). Les sphéroïdes ont été cultivés de deux façons différentes.

Tout d'abord, on a utilisé la méthode de culture sur agarose. Ainsi, 50 μl d'agarose 2% mélangé avec du milieu OSE 2X (dans une proportion 50:50) fut déposé dans le fond d'une plaque de 96 puits. Ensuite, nous avons déposé 4000 cellules dans un volume de 100 μl de milieu OSE (contenant 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de fongizone, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine et 10% de FBS) par-dessus l'agarose. L'agarose empêche l'adhésion des cellules sur le fond de la plaque de 96 puits. Ces plaques ont été placées dans un incubateur humidifié à 37°C avec une atmosphère de 5% de CO₂. Par la suite, afin d'empêcher le dépôt des sphéroïdes sur l'agarose, nous nous sommes servis de différents agitateurs tridimensionnels sur lesquels nous avons déposé les plaques de 96 puits.

La deuxième méthode de culture de sphéroïdes fut développée au laboratoire et consiste à placer 4000 cellules dans un volume de 15 μl du milieu OSE (contenant 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de fongizone, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine et 10% de FBS) que l'on place ensuite, sous forme de goutte, sur le couvercle d'un pètris de

150mm. Le couvercle est ensuite placée sur le pétris qui contient 15ml de milieu OSE pour empêcher la déshydratation de la goutte. Les cellules sont donc cultivées dans les gouttelettes inversées où par gravité elles sont attirées vers le fond de la goutte où elles poussent sans substrat. Les sphéroïdes sont ultérieurement recueillis par un simple lavage suivi d'une centrifugation.

2.4 Les extractions d'ARN

Les extractions d'ARN ont été effectuées à partir des trois modèles pour chaque lignée étudiée (OV90, TOV112D et TOV21G). À cette fin, nous nous sommes servis de la méthode d'extraction au TRIZOL (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.). Brièvement, l'ARN a été extrait des lignées une fois que celles-ci ont atteint environ 80% de confluence, des sphéroïdes au jour 7 et des tissus. Les tissus ont été placés dans du RNA Later d'Ambion immédiatement après la dissection afin de préserver l'ARN. Tous les ARN ont été ensuite quantifiés à l'aide du spectrophotomètre aux longueurs d'ondes 260 et 280 afin d'en évaluer la concentration et le ratio. De plus, la qualité des ARNs a été vérifiée sur gel d'agarose, ainsi qu'à l'aide du bioanalyzer (Agilent®) avant d'être analysés sur les biopuces.

2.5 Les biopuces

Afin d'effectuer les études de biopuces, nous avons envoyé sur glace sèche 20µg d'ARN de bonne qualité de chaque échantillon au Centre de Génome d'Université de McGill où les manipulations subséquentes ont été effectuées.

(Voir site le web d'affymetrix pour le protocole d'hybridation. <http://www.affymetrix.com>).

Les expériences de biopuces ont été toutes effectuées une seule fois. Cependant, nous avons trois échantillons qui représentent les modèles monocouches (n=3) soit la lignée d'origine, la lignée dérivée d'une xéno greffe sous-cutanée et intrapéritonéale. Nous avons choisi les lignées dérivées de xéno greffes afin de s'assurer que les profils géniques observés représentent bien le type de culture (en occurrence la monocouche) et non pas les changements que les cellules ont pu subir suite aux injections dans les souris. Donc, indépendamment de la provenance de la lignée, le profil génique obtenu représente la culture en monocouche. Pour les modèles sphéroïdes, nous avons effectué l'expérience une fois (n=1) en formant des sphéroïdes à partir de la lignée originale. Pour les modèles xéno greffes, nous avons effectué l'expérience deux fois (n=2), l'une sur une xéno greffe sous-cutanée et l'autre sur une xéno greffe intrapéritonéale.

Les analyses statistiques ont ensuite été effectuées à l'aide du logiciel Excel de Microsoft ainsi qu'avec le logiciel GeneSpring pour les analyses de regroupement. Lors de la normalisation des données nous avons maximisé les valeurs des signaux d'hybridation à une valeur de 50, les valeurs en dessous de cette valeur sont considérées comme le bruit de fond de la biopuce. Pour les analyses de corrélation, nous les avons ancrés à la lignée correspondante à l'étude. De plus, pour les analyses de la variation d'expression, nous avons pris en considération les valeurs au moins quatre fois surexprimées ou encore au moins trois fois sous-exprimées par rapport au modèle sphéroïde. Les colorations au

niveau des profils ont été effectuées à l'aide d'une macro développée au laboratoire. Ainsi, la couleur rouge signifie que les gènes sont surexprimés par rapport à la moyenne des signaux au niveau des modèles pour le même gène et la couleur verte signifie que le gène en question est sous-exprimé par rapport à la même moyenne. Les profils spécifiques ont été ensuite établis manuellement en regardant gène par gène parmi les gènes sur et sous-exprimés.

2.6 L'immunohistochimie

Les sphéroïdes obtenus par la méthode des gouttelettes inversées ont été recueillis par un simple lavage du couvercle du pétris avec du milieu OSE. Ensuite, les sphéroïdes ont été centrifugés pendant cinq minutes à 2500g. Le surnageant a été décanté et les sphéroïdes ont été resuspendus dans de l'éthanol 70% pendant 10min dans le but de les fixer. Les sphéroïdes ont ensuite été placés dans du Histogel afin de les inclure ultérieurement dans des blocs de paraffine. Les coupes de quatre microns ont été placées sur des lames afin de permettre des études d'immunohistochimie et d'effectuer des colorations à l'hématoxyline éosine.

Les études d'immunohistochimie ont été effectuées sur des sphéroïdes dérivés des lignées OV90 et TOV112D. Pour ce faire nous avons utilisé l'anticorps dirigé contre le PCNA. Brièvement, les lames ont tout d'abord été chauffées pendant 30 min à 60°C. Ensuite, elles ont été placées consécutivement dans le toluène et l'éthanol (96%, 90% et 80%) pour la déshydratation. Les lames ont été ensuite rincées et placées dans une solution de peroxyde 3%, suivi d'un rinçage et d'un bain de 10 min dans le citrate bouillant. Rincées au PBS, les lames

ont été recouverte du Protein blocking reagent de DakoCytomation, de l'anticorps primaire (PCNA) à une concentration 1 :100, suivi du PBS et de l'anticorps secondaire biotinilé (de DakoCytomation) . Avant de recouvrir avec l'anticorps tertiaire (Streptavidin-HRP de DakoCytomation), un autre rinçage au PBS a eu lieu. Ensuite, on a recouvert avec du DAB additionné de peroxyde 0,3%. Enfin, on a rincé à l'eau, coloré avec de l'Hémathoxylin Harris, rincé à l'eau et fini par déshydrater au toluène et à l'éthanol puis recouvert avec des lamelles.

2.7 Les transfections avec des protéines fluorescentes

Nous avons transformé des bactéries compétentes DH5 α E.coli avec un vecteur pHcRed1-C1 de Clontech qui encode pour la protéine rouge HcRed. Ensuite, nous nous sommes servis d'un kit de Qiagen en suivant le protocole du manufacturier pour effectuer des midi-prep sur les bactéries transformées avec pHcRed ou encore GFP (les bactéries transformées avec la GFP nous ont été fournies par Francis Rodier). L'ADN obtenu a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre. Nous avons ensuite procédé aux transfections de nos trois lignées cellulaires (soit OV90, TOV112D et TOV21G) selon le protocole du manufacturier de la lipofectamine de Invitrogen life technologies. Les cellules ont été ensuite maintenues dans un milieu de sélection OSE contenant 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de fongizone, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine, 40 $\mu\text{g/ml}$ de G418 et 10% de FBS.

2.8 L'ascite et le sérum

L'étude avec le sérum et l'ascite a été effectuée à l'aide de milieu OSE contenant soit 2,5 µg/ml de fongizone, 50 µg/ml de gentamycine et 10% de FBS, soit 2,5 µg/ml de fongizone, 50 µg/ml de gentamycine et 10% d'ascite. L'ascite a été auparavant séparé et seulement la portion non cellulaire a été utilisée pour cette étude. Les sphéroïdes des trois lignées étudiées (OV90, TOV112D et TOV21G) ont été cultivés par la méthode de gouttelettes inversées dans chacun de ces milieux.

3.0 RÉSULTATS

3.1 Les modèles du cancer épithélial de l'ovaire

3.1.1 Les monocouches

Nous avons utilisé trois lignées cellulaires représentatives du cancer épithélial de l'ovaire comme point de départ pour le développement des modèles de monocouches, de xénogreffes ainsi que des sphéroïdes. Les lignées cellulaires proviennent de trois types de cancers de l'ovaire soit le carcinome à cellules claires dans le cas de la lignée TOV21G, le cancer endométrioïde dans le cas de la lignée TOV112D et de l'ascite d'un adénocarcinome dans le cas de la lignée OV90. Ces trois lignées ont déjà été développées et caractérisées auparavant au laboratoire [52]. Les lignées cellulaires que l'on voit dans la figure 1 sont donc notre modèle monocouche ainsi que notre matériel de départ pour le développement de nouveaux modèles.

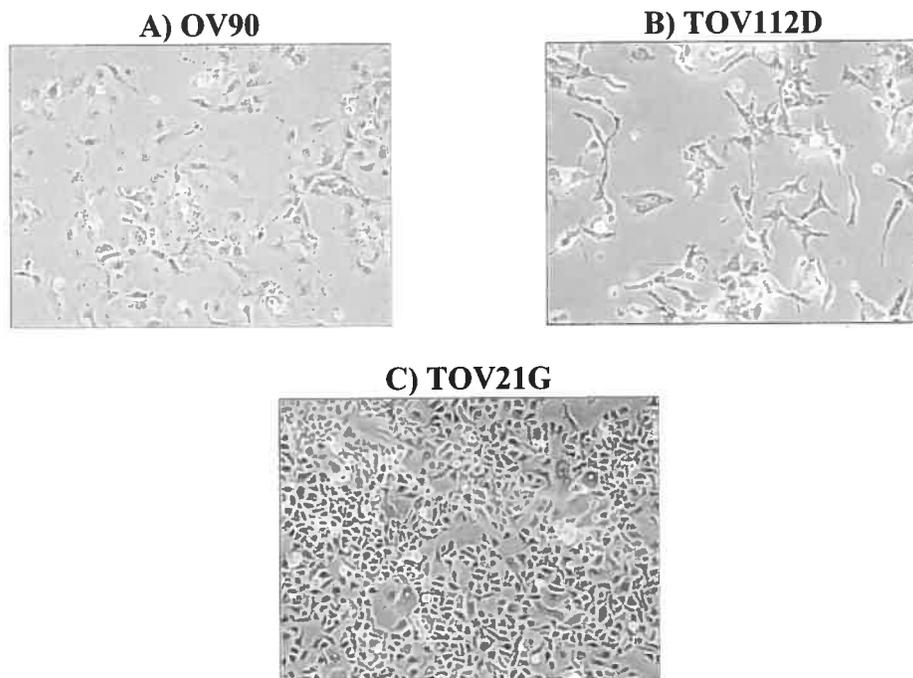


Figure 1

Figure 1 Apparence morphologique des lignées cellulaires développées au laboratoire à partir d'échantillons de cancer épithélial de l'ovaire. A) la lignée OV90 a été dérivée à partir d'un ascite provenant d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome; B) la lignée TOV112D provient d'un carcinome endométrioïde; C) la lignée TOV21G provient d'un carcinome à cellules claires. Les lignées OV90 et TOV112D ont une morphologie semblable quoique la première présente des cellules plus petites que la deuxième. La lignée TOV21G présente des cellules plus uniformes, petites et plus arrondies. Les trois lignées proviennent des patientes qui n'ont subi aucune radiothérapie ni chimiothérapie avant les prélèvements de tumeurs. Les lignées TOV21G et OV90 ont un temps de doublement de 1,5 jours tandis que la lignée TOV112D a un temps de doublement de 0,8 jours. Le grossissement est le même dans tous les cas soit 100X.

3.1.2 Les xénogreffes

Nous avons procédé au développement du modèle xénogreffe dans les souris Nu. Ce modèle fut développé de deux façons différentes soit par injection de 3×10^6 de cellules dans les souris de façon sous cutanée ou intrapéritonéale. Les nodules tumoraux ont été prélevés et conservés dans le RNA Later d'Ambion pour les extractions d'ARN subséquentes ou encore dans le PBS pour la mise en culture. Les nodules sous-cutanés avaient tous un aspect similaire soit nodule dure, blanchâtre et uniforme, d'une taille d'environ 1cm donc la taille à laquelle le protocole exige le sacrifice de la souris. Les nodules intrapéritonaux développés à partir d'une même lignée cellulaire variaient surtout par leur taille et dans certains cas par leur texture et aspect cependant, tous ont été prélevés au niveau de la cavité péritonéale. Nous n'avons jamais observé de nodules à l'extérieur de la cavité péritonéale dans le cas des injections intrapéritonéales ou à l'extérieur du site d'injection dans le cas des injections sous-cutanées (données non montrées).

Lignée Cellulaire	Croissance chez la souris Nu	Temps d'apparition (semaines)	Passage
OV90	3/7	4-12	82
TOV112D	3/7	3-12	94
TOV21G	7/7	2-8	64
PBS	0/7	0	ND

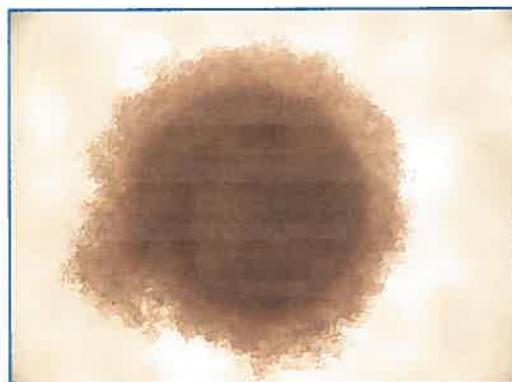
Tableau I

Tableau I Tableau récapitulatif du modèle de xénogreffes du cancer épithélial de l'ovaire chez la souris Nu. Les souris ont été injectées avec 3×10^6 cellules dans un volume de 0,3ml de PBS Gibco. Les souris ont toujours été injectées à la même période de la journée et ce de façon sous-cutanée sur chaque flanc (2/7 souris) ou intrapéritonéale (5/7 souris). Les animaux ont été sacrifiés lorsque la tumeur sous-cutanée visible atteignait 1cm de diamètre ou lorsque la souris présentait des symptômes de malaise.

3.1.3 Les sphéroïdes sur agarose

Pour le développement du modèle tridimensionnel, nous avons tout d'abord essayé un protocole décrit auparavant par des groupes travaillant sur d'autres types de cancers que la cancer épithélial de l'ovaire, soit la culture sur agarose [45]. Nous avons donc placé 50 μ l d'agarose 2%, mélangée dans une proportion de 50:50 avec du milieu OSE 2X, dans le fond des plaques de 96 puits sur lequel nous avons ensuite implanté 4000 cellules de deux des trois lignées étudiées dans un volume de 100 μ l de milieu OSE 1X. Les sphéroïdes obtenus formaient une sorte de colonie au centre du puit au lieu de former une sphère comme attendu. De plus, ces sphéroïdes ne sont jamais devenus assez compacts pour être prélevés en entier et sans difficulté. Aussi, comme ils poussaient sur l'agarose (sans nécessairement y adhérer), il était très difficile de prélever les sphéroïdes sans en même temps prélever une partie de l'agarose, ce qui pourrait nuire aux extractions d'ARN subséquentes. Nous avons essayé, sans succès cependant, d'utiliser des agitateurs tridimensionnels afin de maintenir les sphéroïdes en suspension et empêcher un contact constant avec l'agarose.

A) TOV112D



B) TOV21G



Figure 2

Figure 2 Apparence morphologique des sphéroïdes en culture sur agarose. 4000 cellules des deux lignées (soit la TOV21G et la TOV112D) ont été déposées dans un volume de 100µl sur 50µl d'agarose 2% (mélangé avec du milieu 2X OSE dans une proportion de 50:50). En A) photo représentant le sphéroïde formé à partir de la lignée TOV112D. Ce sphéroïde est d'apparence assez compacte sans les bords bien définis. En B) photo représentant le sphéroïde formé à partir de la lignée TOV21G. Ce sphéroïde n'est pas compact. Les deux sphéroïdes ont une forme aplatis, se déposent directement sur l'agarose et poussent en contact avec celle-ci.

3.1.4 Les sphéroïdes en gouttelettes inversées

Pour s'affranchir de l'utilisation des agitateurs et de l'agarose, nous avons adapté une technique de culture des cellules souches en gouttelettes inversées à la culture des lignées cellulaires. Cette technique est utilisée afin de permettre l'agrégation et la différenciation des cellules souches sous forme de ce qu'on appelle «embroid bodies». En plaçant nos cellules dans une gouttelette inversée, nous avons réussi à obtenir des sphéroïdes plus compacts et uniformes que par la première méthode de culture sur agarose. Les cellules dans la gouttelette inversée par gravité se ramassent dans l'apex de la goutte où elles poussent sans contact avec un substrat quelconque. Cela permet aux cellules de créer des liens et de former des sphéroïdes qui sont de véritables sphères. Comme on peut le voir dans la figure 3, nous avons obtenus des sphéroïdes compacts et uniformes au jour 4 de la culture pour les lignées TOV112D et OV90. Les sphéroïdes commencent à se défaire et perdent leur structure à partir du jour 11 (données non montrées). Dans le cas de la lignée TOV21G, les sphéroïdes formés ont été moins compacts et ressemblaient d'avantage à des amas de cellules. Cependant, ces amas ont été assez solides pour se déplacer comme un tout dans la goutte sans se défaire.

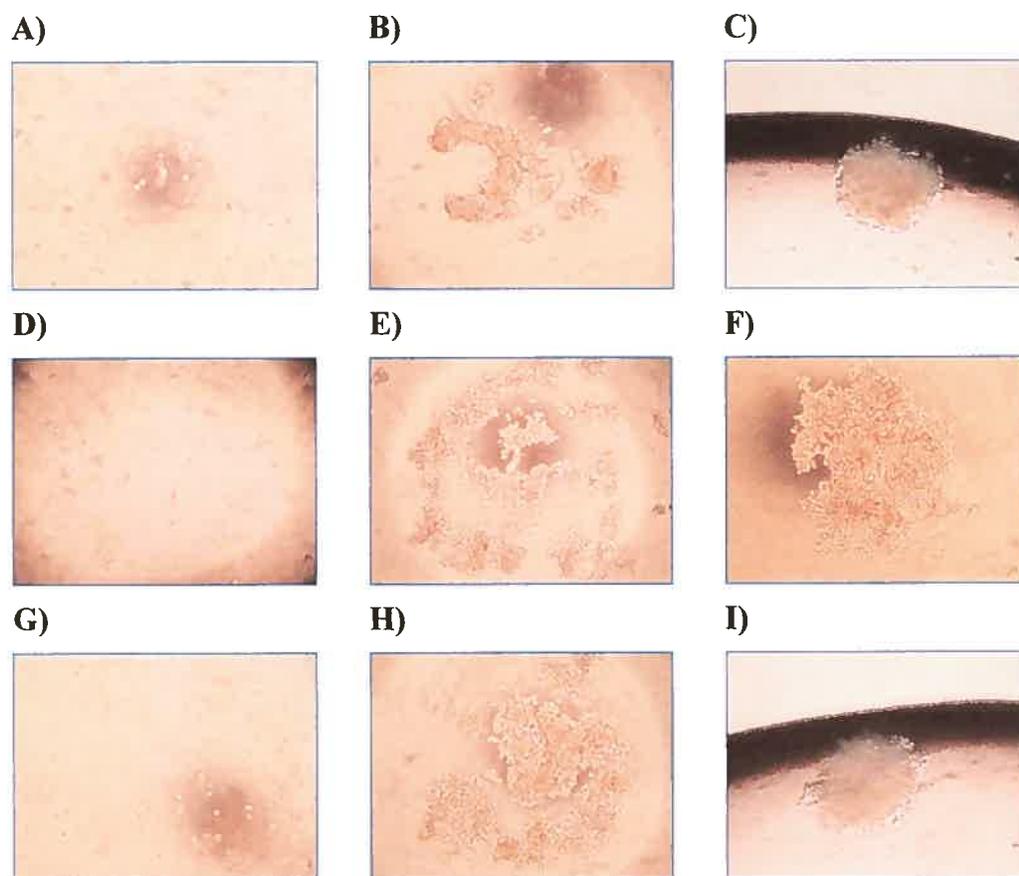


Figure 3

Figure 3 Apparence morphologique du développement des sphéroïdes en gouttelettes inversées. En A), D) et G) les lignées OV90, TOV112D et TOV21G respectivement, au moment de l'implantation dans la goutte donc au temps 0. En B), E) et H) OV90, TOV112D et TOV21G respectivement, les cellules 24 heures après l'implantation des cellules dans la goutte. En C) F) et I) OV90, TOV112D et TOV21G respectivement quatre jours après l'implantation dans les gouttes, les sphéroïdes sont compacts et ont atteint leur taille maximale (soit environ 500 μm).

3.2 Comparaison des modèles

Nous avons décidé de comparer nos différents modèles en effectuant des analyses au niveau de leurs profils respectifs d'expression génique. Pour ce faire, nous avons besoin d'effectuer tout d'abord des extractions d'ARN sur les échantillons dans le but d'obtenir de l'ARN qui devait être en quantité suffisante mais surtout d'excellente qualité. Les analyses de profils géniques obtenus à partir des biopuces nous ont permis d'observer les changements au niveau de l'expression des gènes de façon globale c'est-à-dire, que nous pouvions voir les systèmes dans leur ensemble plutôt qu'une partie seulement de ceux-ci. Pour ce faire nous avons fait appel aux différentes méthodes d'analyse des données de biopuces soit tout d'abord la corrélation ensuite le regroupement d'échantillons à l'aide du programme GeneSpring («clustering») et enfin une analyse de la variation différentielle d'expression au niveau des gènes («fold change»). Cette dernière nous a permis d'identifier des patrons d'expression ainsi que des gènes candidats pour les différents modèles.

3.2.1 L'ARN

Nous avons réussi à obtenir de l'ARN de très bonne qualité ce qui est d'une importance capitale pour les études subséquentes des profils géniques. Nous avons tout d'abord effectué des migration d'ARN sur gel afin d'en vérifier de façon grossière la qualité. En effet, pour tous nos échantillons nous avons observé deux bandes distinctes ce qui nous indique qu'il y avait bien les deux portions ribosomales de l'ARN soit la 28S et la 18S. De plus, ces bandes

présentent bien des ratios d'intensité de 2:1 (28S/18S) ce qui est une autre indication de bonne qualité de l'ARN.

Cependant, afin d'effectuer des études de qualité de l'ARN plus stringentes, nous avons effectué des contrôles de qualité à l'aide de la technologie du Bioanalyzer d'Agilent. Encore une fois, tous les graphiques de nos échantillons confirment la bonne qualité de notre ARN. Ainsi, on voit bien sur tous les graphiques les deux pics représentant les deux portions ribosomales de l'ARN.

Enfin, une fois nos hybridations sur les biopuces effectuées, nous avons analysé la qualité du signal obtenu et donc de l'ARN en vérifiant la proportion des signaux P (pour présent) par rapport aux signaux M (pour marginal) ou A (pour absent, donc sous la limite de détection). Ainsi, afin que les données des biopuces soient considérées comme valides, on doit observer un minimum de 30% de signaux P. Les graphiques en forme de tartes montrent bien que tous nos échantillons répondent à ce critère de qualité. Nous avons donc procédé à l'analyse des données de biopuces.

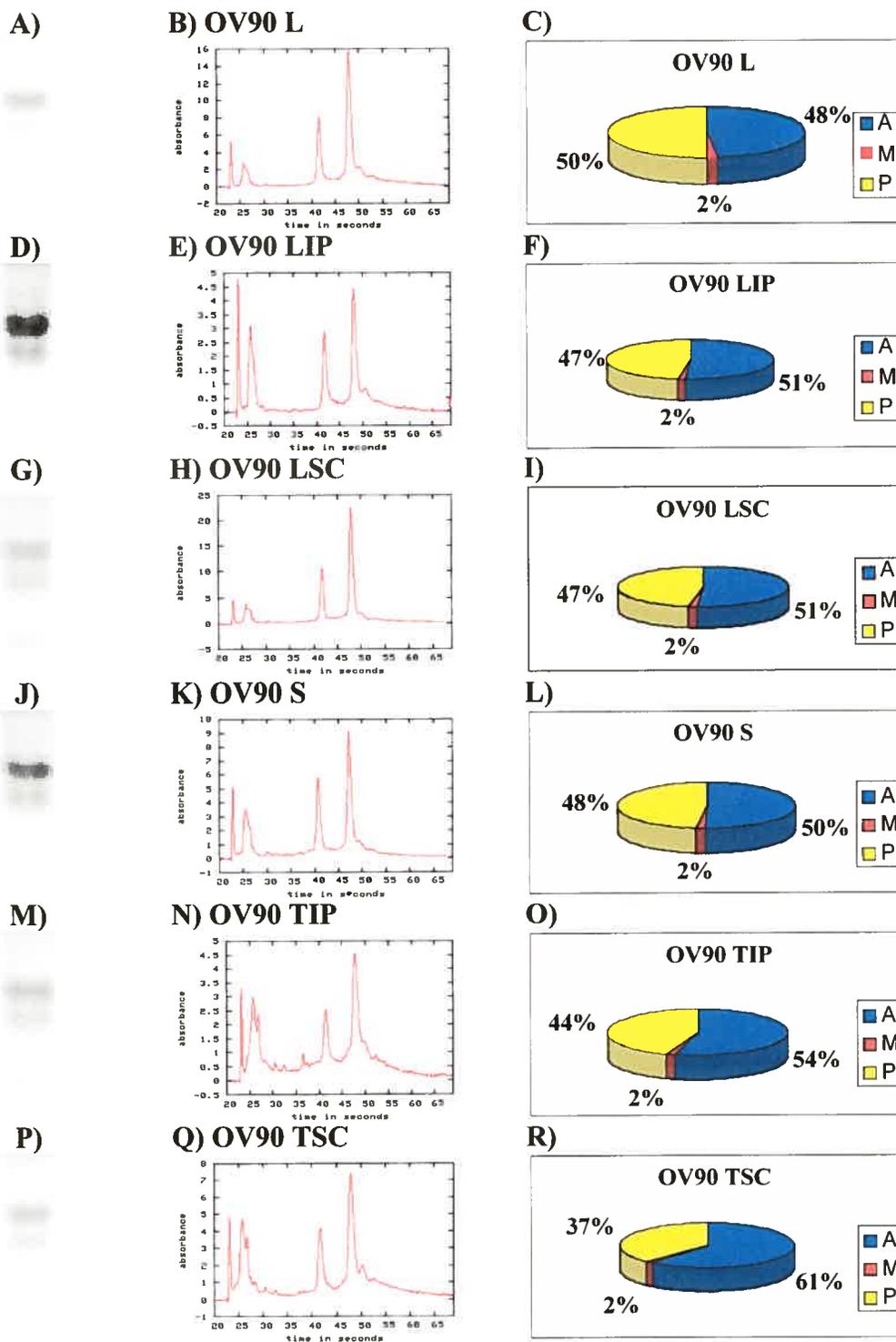


Figure 4

Figure 4 Figure représentant différents tests effectués dans le but de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différents modèles développés à partir de la lignée OV90. La colonne de gauche présente les résultats de la migration de l'ARN sur un gel d'agarose, la colonne de milieu présente les figures obtenues à partir du Bioanalyzer et la colonne de droite présente l'analyse des signaux obtenus à partir des biopuces. En A), B) et C) données pour le modèle monocouche (L pour lignée). En D), E) et F) données pour le modèle monocouche développé à partir d'une xéno greffe intrapéritonéale chez la souris Nu (LIP pour Lignée IntraPéritonéale). En G), H) et I) données pour le modèle monocouche développé à partir d'une xéno greffe sous cutanée chez la souris Nu (LSC pour Lignée Sous Cutanée). En J), K) et L) données pour le modèle sphéroïde (S pour Sphéroïde). En M), N) et O) données pour le modèle xéno greffe intrapéritonéale de la souris Nu (TIP pour Tissu IntraPéritonéale). En P), Q) et R) données pour le modèle xéno greffe sous cutanée de la souris Nu (TSC pour Tissu Sous Cutané).

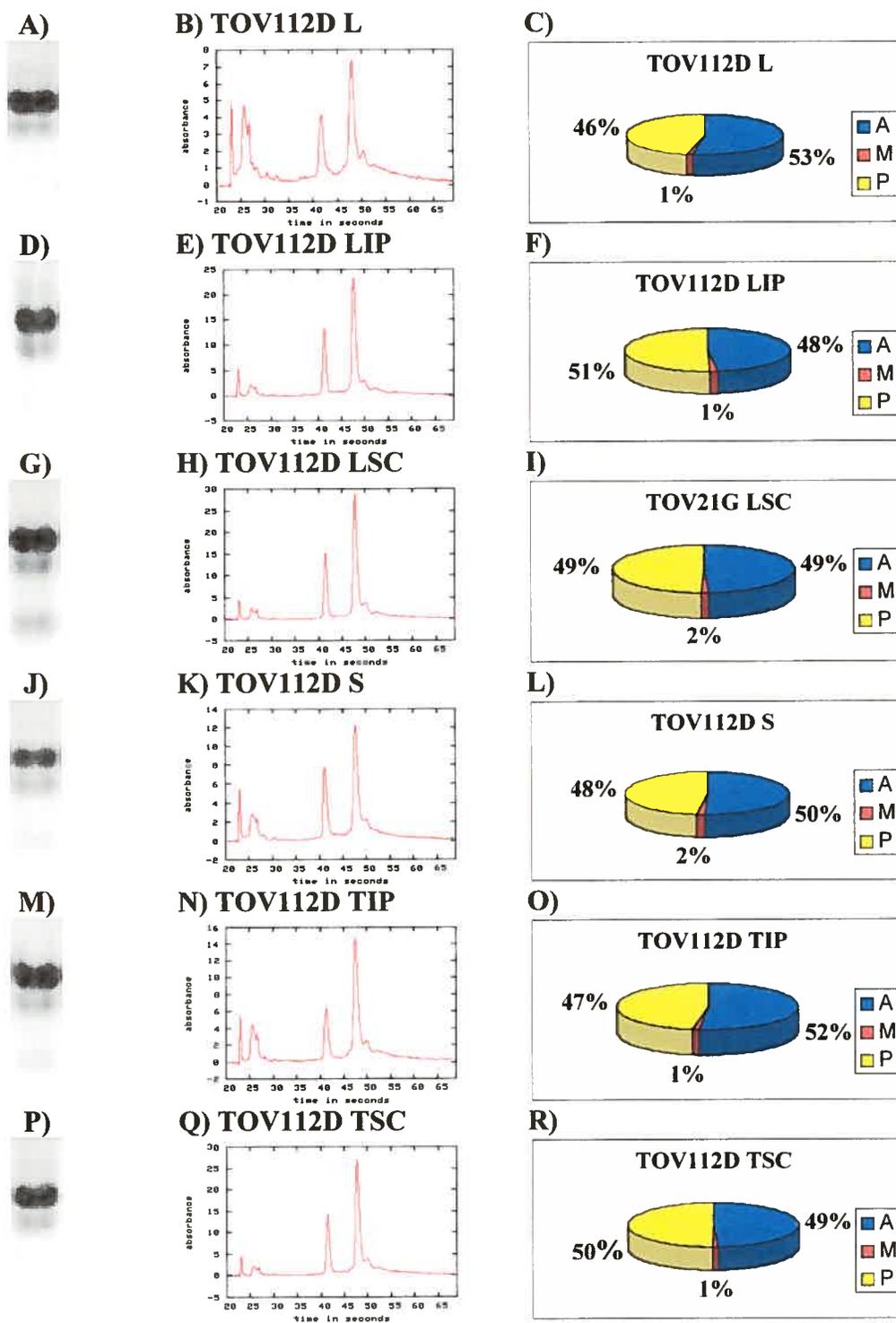


Figure 5

Figure 5 Figure représentant différents tests effectués dans le but de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différents modèles développés à partir de la lignée TOV112D. La colonne de gauche présente les résultats de la migration de l'ARN sur un gel d'agarose, la colonne de milieu présente les figures obtenues à partir du Bioanalyzer et la colonne de droite présente l'analyse des signaux obtenus à partir des biopuces. En A), B) et C) données pour le modèle monocouche (L pour lignée). En D), E) et F) données pour le modèle monocouche développé à partir d'une xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu (LIP pour Lignée IntraPéritonéale). En G), H) et I) données pour le modèle monocouche développé à partir d'une xénogreffe sous cutanée chez la souris Nu (LSC pour Lignée Sous Cutanée). En J), K) et L) données pour le modèle sphéroïde (S pour Sphéroïde). En M), N) et O) données pour le modèle xénogreffe intrapéritonéale de la souris Nu (TIP pour Tissu IntraPéritonéale). En P), Q) et R) données pour le modèle xénogreffe sous cutanée de la souris Nu (TSC pour Tissu Sous Cutané).

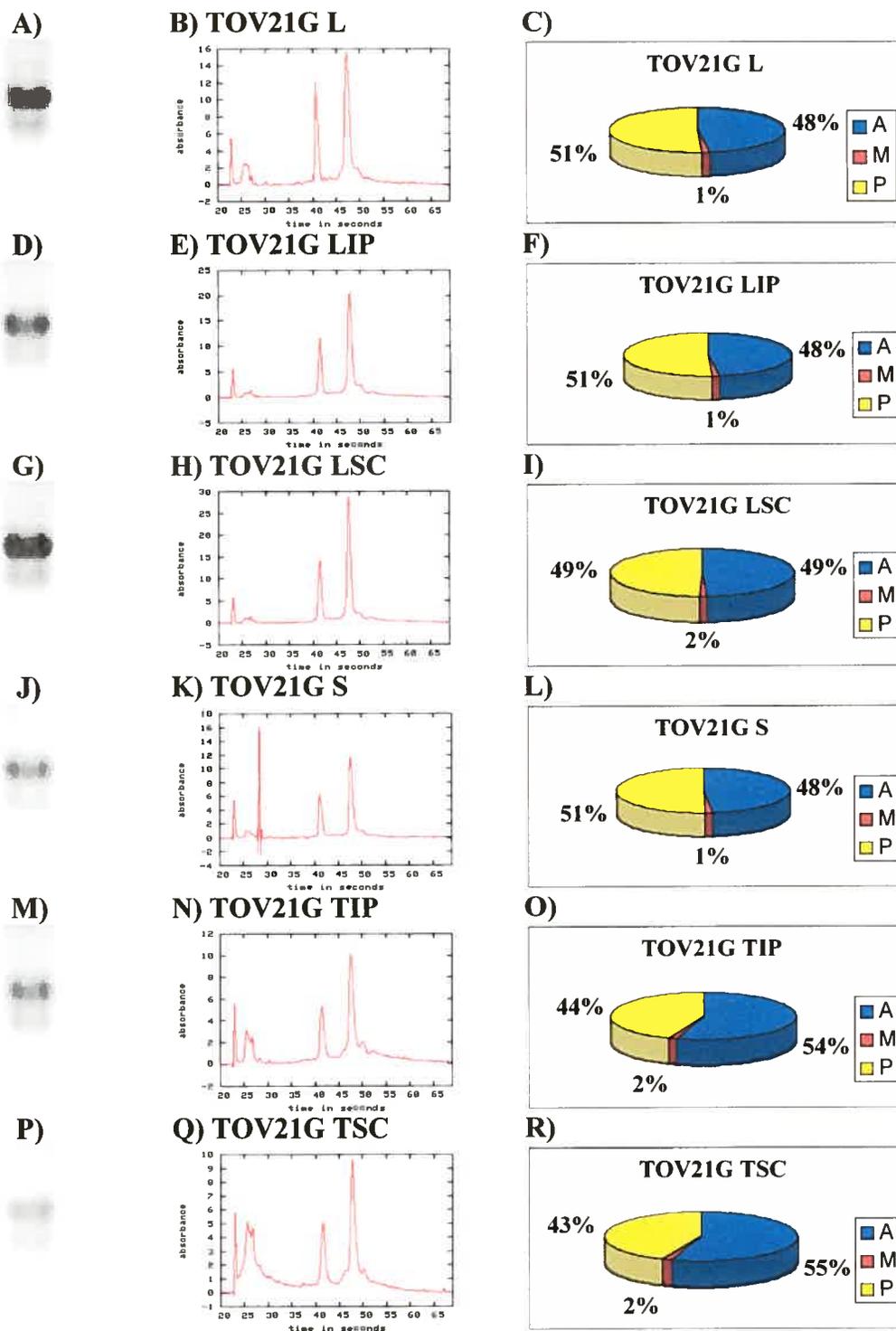


Figure 6

Figure 6 Figure représentant différents tests effectués dans le but de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différents modèles développés à partir de la lignée TOV21G. La colonne de gauche présente les résultats de la migration de l'ARN sur un gel d'agarose, la colonne de milieu présente les figures obtenues à partir du Bioanalyzer et la colonne de droite présente l'analyse des signaux obtenus à partir des biopuces. En A), B) et C) données pour le modèle monocouche (L pour lignée). En D), E) et F) données pour le modèle monocouche développé à partir d'une xéno greffe intrapéritonéale chez la souris Nu (LIP pour Lignée IntraPéritonéale). En G), H) et I) données pour le modèle monocouche développé à partir d'une xéno greffe sous cutanée chez la souris Nu (LSC pour Lignée Sous Cutanée). En J), K) et L) données pour le modèle sphéroïde (S pour Sphéroïde). M), N) et O) données pour le modèle xéno greffe intrapéritonéale de la souris Nu (TIP pour Tissu IntraPéritonéale). En P), Q) et R) données pour le modèle xéno greffe sous cutanée de la souris Nu (TSC pour Tissu Sous Cutané).

3.2.2 Analyse de données de biopuces

3.2.2.1 Analyse de corrélation

La première des analyses que nous avons décidé d'appliquer sur nos données de biopuces fut l'analyse de corrélation. Cette dernière mesure le degré d'association qu'il y a entre deux variables. Ainsi, lorsque le coefficient de corrélation est proche de 1, les variables sont très semblables et lorsque ce coefficient diminue le degré d'association en fait autant. Nous avons ancré cette analyse à la lignée correspondante. Ainsi, dans la figure 7, on peut voir que le modèle sphéroïde de la lignée OV90 se situe entre le modèle monocouche *in vitro* et le modèle xénogreffe *in vivo* au niveau de sa ressemblance à l'un ou l'autre de ces deux modèles.

Dans les figures 8 et 9, les résultats semblent un peu moins évidents. En fait, dans la figure 8, les coefficients de corrélation sont trop similaires afin de pouvoir observer des différences entre les modèles de la lignée TOV112D. Ce résultat n'est pas surprenant, puisque tous les modèles étant issus de la même lignée les différences entre eux sont probablement minimales. Dans le cas de la lignée TOV21G, soit la figure 9, on observe une séparation entre les modèles sphéroïde et monocouche et les modèles xénogreffe et monocouche qui en sont dérivés. La différence semble se faire entre les cellules avant implantation dans la souris et après implantation dans la souris. Donc, les différences que l'on observe semblent être dues à une sélection que les cellules ont pu subir *in vivo* et non pas au système de culture. Cependant, des analyses plus poussées doivent être effectuées puisqu'on ne peut affirmer qu'une variation de coefficient de corrélation aussi subtile ne peut être due à la variation biologique.

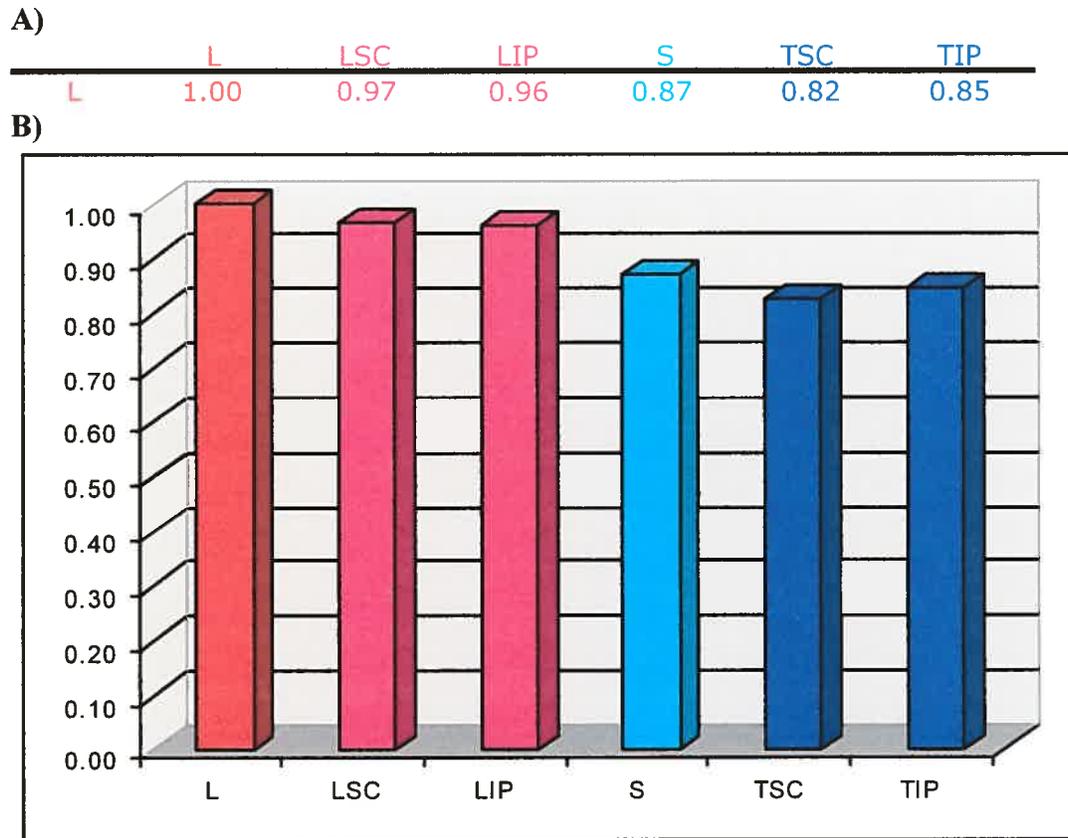


Figure 7

Figure 7 Coefficients de corrélation entre les différents modèles de la lignée OV90. En A) tableau des valeurs numériques des coefficients de corrélation. En B) la représentation graphique de corrélation entre les différents modèles. (L= lignée en monocouche, LSC= lignée en monocouche à partir de la xénogreffe sous cutanée chez la souris Nu, LIP= lignée en monocouche à partir de la xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu, S= sphéroïde, TSC= xénogreffe sous cutanée chez la souris Nu, TIP= xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu). L'analyse est ancrée au modèle monocouche de la lignée OV90.

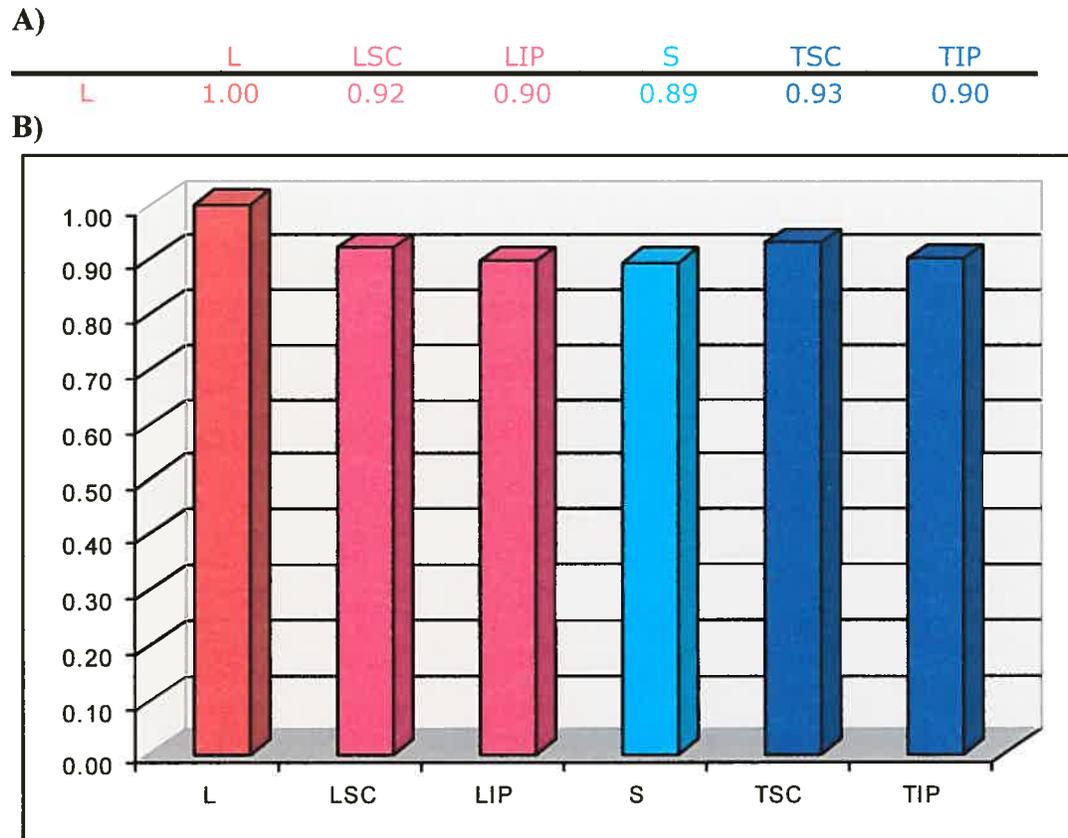


Figure 8

Figure 8 Coefficients de corrélation entre les différents modèles de la lignée TOV112D. En A) tableau des valeurs numériques des coefficients de corrélation. En B) la représentation graphique de corrélation entre les différents modèles. (L= lignée en monocouche, LSC= lignée en monocouche à partir de la xénogreffe sous cutanée chez la souris Nu, LIP= lignée en monocouche à partir de la xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu, S= sphéroïde, TSC= xénogreffe sous cutanée chez la souris Nu, TIP= xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu). L'analyse est ancrée au modèle monocouche de la lignée TOV112D.

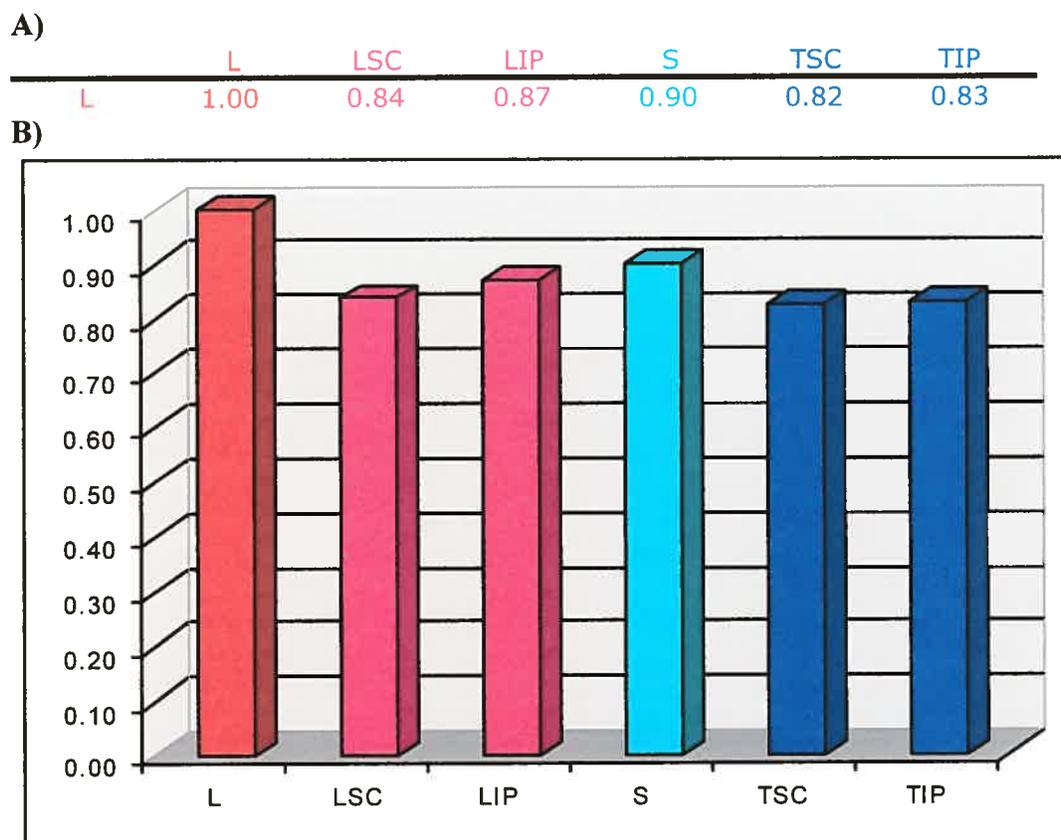


Figure 9

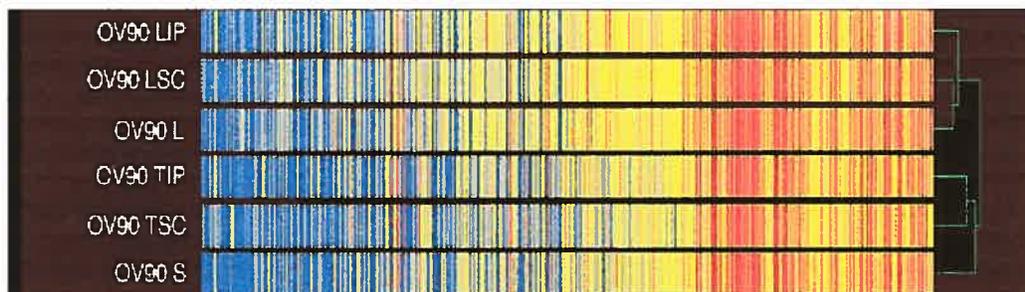
Figure 9 Coefficients de corrélation entre les différents modèles de la lignée TOV21G. En A) tableau des valeurs numériques des coefficients de corrélation. En B) la représentation graphique de corrélation entre les différents modèles. (L= lignée en monocouche, LSC= lignée en monocouche à partir de la xénogreffe sous cutanée chez la souris Nu, LIP= lignée en monocouche à partir de la xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu, S= sphéroïde, TSC= xénogreffe sous cutané chez la souris Nu, TIP= xénogreffe intrapéritonéale chez la souris Nu). L'analyse est ancrée au modèle monocouche de la lignée TOV21G.

3.2.2.2 L'analyse non supervisée du type regroupement de Genespring

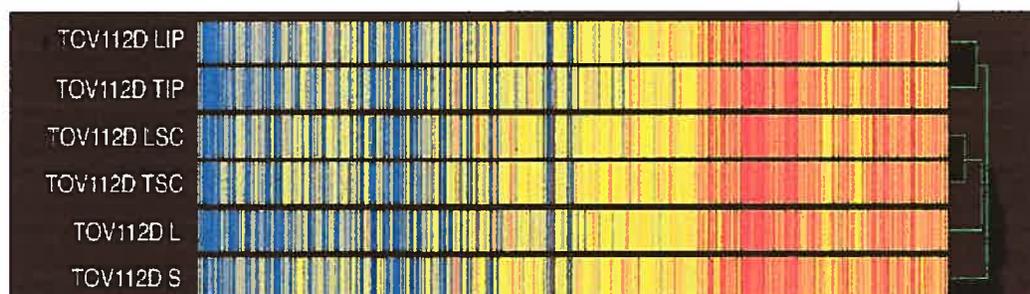
L'analyse de regroupement à l'aide du programme Genespring fut le deuxième type d'analyse que nous avons appliqué à nos données. Ce type d'analyse permet de regrouper ensemble les échantillons dont les profils géniques sont semblables. Ainsi, les échantillons qui sont très semblables vont se trouver regroupés en branches très rapprochées tandis que les échantillons de plus en plus différents seront de plus en plus éloignés. Nous avons donc observé dans le cas des modèles de la lignée OV90 que le modèle sphéroïde se retrouve associé d'avantage avec le modèle xénogreffe qu'avec le modèle de la lignée en monocouche. On peut voir dans la figure 10, en A) que le modèle sphéroïde est dans le même embranchement que le modèle xénogreffe sous cutanée et intrapéritonéale. De plus, tous les modèles monocouches provenant soit de la souris ou encore de la lignée d'origine sont reliés ensemble mais dans un embranchement distinct. Dans le cas des modèles développés à partir de la lignée TOV112D, on peut voir dans la même figure 10 en B) que la situation est quelque peu différente. Ainsi, le modèle sphéroïde se voit être complètement à part de tous les autres modèles en étant dans son propre embranchement. De plus, il semble que les lignées développées à partir des xénogreffes se rapprochent de celles-ci et donc que les échantillons sont possiblement reliés ensemble de façon temporelle. En effet, les lignées dérivées de xénogreffes sont au passage 5 donc temporellement très proches des tissus de départ. Finalement, dans la même figure en C) le modèle sphéroïde de la lignée TOV21G se retrouve dans le même embranchement que le modèle monocouche d'origine tandis que tous les autres modèles sont réunis sous un autre embranchement encore une fois séparant les

profils génétiques observés avant et après que la lignée ne soit cultivée *in vivo* dans la souris. Tous ces résultats confirment et précisent d'avantage les résultats obtenus par l'analyse de corrélation.

A)



B)



C)

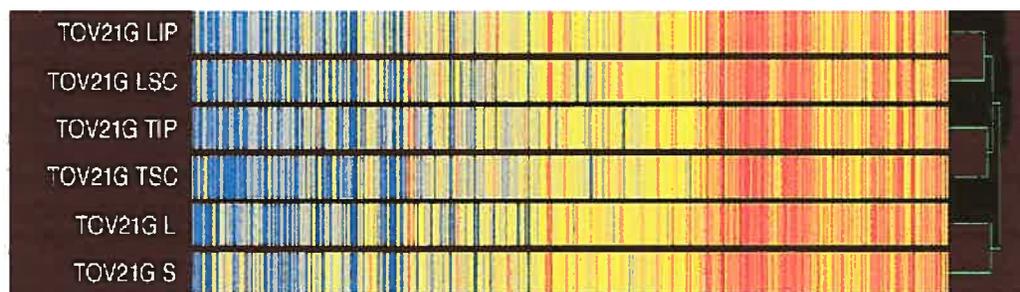


Figure 10

Figure 10 Représentation graphique de l'analyse par regroupement à l'aide du programme Genespring des échantillons regroupés selon les profils géniques similaires. En A) l'analyse par regroupement de données des modèles développés à partir de la lignée OV90. En B) l'analyse par regroupement de données des modèles développés à partir de la lignée TOV112D. En C) l'analyse par regroupement de données des modèles développés à partir de la lignée TOV21G.

3.2.2.3 Identification des patrons d'expression et des gènes candidats à l'aide de l'analyse supervisée de l'expression différentielle des gènes.

La prochaine étape de nos analyses des données de biopuces consistait à identifier des gènes dont l'expression varie de façon similaire entre les modèles sphéroïde et les modèles xénogreffe que l'on ne retrouve pas au niveau de la monocouche. Ce sont donc des gènes candidats qui rapprochent le modèle 3D sphéroïde *in vitro* du modèle xénogreffe *in vivo*. De plus, nous voulons identifier des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde de la monocouche pour identifier les gènes spécifiques aux modèles *ex vivo*. Finalement, nous voulons également identifier des gènes spécifiques au modèle 3D.

3.2.2.3.1 Analyse de l'expression différentielle des gènes pour la lignée OV90

Nous avons tout d'abord procédé à l'analyse des données des modèles dérivés de la lignée OV90. Cette lignée semble être la plus intéressante puisque même par des analyses peu stringentes comme la corrélation ou l'analyse par regroupement de Genespring, elle présente un profil où le sphéroïde semble être un modèle intermédiaire entre la monocouche et la xénogreffe. En effet, nous avons trouvé 92 gènes qui varient de façon similaire entre le modèle sphéroïde et les xénogreffes pour la lignée OV90. Ces gènes ont été trouvés en limitant les paramètres de sélection aux gènes quatre fois surexprimés et trois fois sous-exprimés. La figure 11 représente de façon visuelle le profil d'expression avec les valeurs numériques correspondant à l'intensité du signal d'hybridation sur la biopuce.

Symbol	LSC	LSC	LIP	LIP	L	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP	
---	369.60	P	249.70	P	227.95	P	50.00	A	50.00	A	50.00	A
---	423.41	P	455.40	P	457.36	P	50.00	P	169.07	P	53.76	P
---	188.69	P	260.42	P	183.68	P	50.00	P	50.00	P	50.00	P
ACLY	261.35	P	314.38	P	275.75	P	50.00	P	50.00	M	50.00	A
ARF1	329.80	P	288.61	P	326.99	P	50.00	P	50.00	P	50.00	P
C2orf30	317.26	P	290.10	P	262.77	P	55.92	P	96.45	P	50.00	P
C6orf62	567.33	P	484.59	P	590.55	P	50.00	P	54.92	P	50.00	P
CALU	261.98	P	267.91	P	256.98	P	53.01	P	51.97	A	50.00	A
CD44	230.21	P	318.35	P	393.25	P	73.41	P	59.03	A	82.55	P
CDC2	238.80	P	317.73	P	239.57	P	50.00	P	119.53	P	60.37	P
CDH6	392.27	P	239.47	P	429.08	P	50.00	P	50.60	P	59.14	P
CRKL	495.56	P	198.40	P	419.20	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
CSPG2	170.41	P	362.15	P	290.76	P	50.00	P	62.51	P	62.32	P
CSPG2	147.99	P	276.03	P	421.27	P	59.65	P	50.00	P	65.02	P
CXCL5	933.75	P	864.65	P	1020.67	P	50.00	P	50.00	P	50.00	A
CYR61	399.91	P	408.75	P	343.36	P	50.00	P	50.00	A	50.00	M
CYR61	213.39	P	348.90	P	198.03	P	50.00	A	50.00	A	50.00	A
ENO1	1274.44	P	1540.63	P	1273.23	P	148.18	P	50.00	P	224.09	P
F2RL1	254.66	P	149.20	P	182.74	P	50.00	P	50.00	A	50.00	A
FER1L3	542.62	P	431.36	P	337.43	P	50.00	P	70.62	P	50.00	P
FLJ11017	255.74	P	191.33	P	219.06	P	50.00	P	145.25	P	104.99	P
FLNA	398.26	P	421.82	P	384.76	P	222.62	P	50.00	P	250.44	P
FLNB	295.86	P	291.58	P	328.54	P	50.00	A	50.00	A	50.00	A
FN1	522.56	P	594.07	P	572.72	P	61.05	P	50.00	P	50.00	P
KYNU	203.14	P	259.49	P	206.21	P	50.00	P	87.07	P	50.00	P
LAMP1	389.41	P	286.81	P	439.95	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
M1S1	296.37	P	327.89	P	312.22	P	50.00	P	60.19	P	50.00	P
MAPRE1	314.77	P	315.93	P	348.35	P	50.00	P	52.60	P	58.82	P
MARCKS	268.35	P	259.49	P	305.30	P	55.01	P	50.00	M	50.00	P
MT1E	1022.39	P	858.08	P	899.99	P	50.00	P	451.14	P	112.41	P
MT1F	239.95	P	371.51	P	286.20	P	50.00	P	120.06	P	69.09	P
MT1F	381.57	P	454.41	P	405.09	P	50.00	P	168.23	P	72.11	P
MT1F	517.98	P	465.38	P	474.67	P	50.00	A	185.52	P	78.97	P
MT1G	624.45	P	645.37	P	594.27	P	50.00	P	334.88	P	81.25	P
MT1H	788.88	P	721.21	P	755.93	P	50.00	A	327.29	A	72.28	A
MT1X	757.93	P	417.86	P	450.87	P	50.00	P	299.67	P	84.68	P
MT1X	1205.48	P	1006.91	P	1242.60	P	60.62	P	383.05	P	166.25	P
MT2A	1859.10	P	1864.62	P	1614.52	P	108.50	P	876.99	P	212.26	P
na	1295.01	P	997.55	P	1223.83	P	50.00	A	458.63	P	69.34	A
NONO	281.47	P	257.44	P	373.80	P	63.70	P	69.89	P	90.22	P
OSMR	257.52	P	92.63	P	211.62	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
P4HB	1075.57	P	970.10	P	1096.79	P	457.49	P	79.37	P	400.70	P
PDAP1	165.70	P	446.48	P	223.57	P	51.71	P	50.00	A	72.36	P
PEG10	159.14	P	470.03	P	222.92	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
PEG10	258.35	P	552.87	P	324.73	P	72.06	P	96.76	P	120.98	P
PI3	283.19	P	373.99	P	182.17	P	53.55	P	100.24	P	111.68	P
PLAU	373.68	P	554.29	P	370.37	P	97.87	P	50.00	P	50.00	P
PRNP	287.07	P	348.90	P	224.09	P	50.00	P	52.81	P	50.00	P
PTBP1	199.96	P	270.08	P	281.54	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
PTP4A1	225.56	P	292.82	P	360.63	P	71.36	P	135.45	P	103.76	P
RAI3	286.18	P	193.93	P	316.73	P	50.00	M	86.33	A	120.90	P
RNP24	215.24	P	170.02	P	361.38	P	50.00	P	50.00	P	50.00	A
RNP24	472.70	P	379.81	P	493.77	P	59.33	P	56.39	P	50.00	P
SERPINH1	424.50	P	551.69	P	510.66	P	251.23	P	50.00	M	169.43	P
SFRS1	620.82	P	580.31	P	621.32	P	75.20	P	127.96	P	56.61	P
SLC7A8	244.05	P	154.28	P	268.84	P	50.00	A	50.00	A	50.00	A
SPTBN1	235.11	P	230.74	P	255.29	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
STIP1	244.28	P	320.48	P	322.80	P	50.00	A	50.00	A	50.00	A
STOM	245.49	P	260.60	P	424.89	P	76.22	P	117.32	P	77.82	P
THBS1	275.10	P	401.19	P	261.54	P	50.00	A	50.70	A	50.82	P
THBS1	362.41	P	362.53	P	317.44	P	50.00	P	50.00	P	50.00	P
TNFRSF12A	614.20	P	458.32	P	457.73	P	50.00	P	50.00	A	50.00	P
TNFRSF21	321.84	P	187.06	P	388.81	P	60.08	P	92.65	P	60.37	P
VAMP3	442.58	P	428.14	P	390.03	P	84.05	P	91.81	P	77.01	P
VIL2	350.12	P	384.40	P	361.05	P	50.00	A	50.00	A	61.18	A
VIL2	324.39	P	417.48	P	444.61	P	50.00	M	50.00	A	70.40	P
YWHAE	275.10	P	472.88	P	375.45	P	50.00	P	50.00	P	50.00	P
YWHAZ	959.67	P	900.03	P	977.53	P	134.90	P	194.58	P	116.33	P
---	104.82	P	50.00	P	50.00	P	274.44	P	844.11	P	794.11	P
ATP51	213.14	P	244.25	P	166.74	P	685.83	P	355.33	P	363.91	P
CP	77.69	P	143.93	P	139.22	P	351.74	P	492.99	P	290.41	P
E2IG5	304.27	P	298.03	P	267.94	P	1127.83	P	821.65	P	613.53	P
FBXO9	97.75	P	69.70	P	107.46	P	290.04	P	175.29	P	209.65	P
FGB	77.75	P	174.17	P	379.26	P	448.96	P	197.22	P	339.44	P
FGG	325.28	P	394.19	P	927.98	P	1336.09	P	771.48	P	739.00	P
GSN	232.82	P	154.22	P	292.74	P	745.21	P	565.83	P	748.54	P
HABP2	179.45	P	161.41	P	235.48	P	782.08	P	735.95	P	1095.40	P
ITIH2	58.90	P	119.09	P	259.61	P	438.11	P	725.41	P	770.73	P
KR18	89.73	P	50.00	P	53.54	P	201.40	P	120.38	P	158.42	P
KTN1	190.21	P	87.31	P	170.97	P	388.07	P	236.43	P	137.13	P
LOC90410	87.05	P	77.88	P	63.80	P	265.05	P	133.66	P	117.06	P
LUC7A	162.51	P	113.57	P	172.57	P	454.95	P	299.78	P	354.53	P
MSMB	50.00	P	105.27	P	52.55	P	909.15	P	2263.83	P	2203.04	P
MSMB	50.00	P	166.98	P	80.12	P	928.80	P	1900.60	P	1860.26	P
na	92.46	P	376.78	P	477.68	P	748.61	P	187.41	P	1014.56	P
NUCB2	87.12	P	50.00	P	103.18	P	208.91	P	127.23	P	99.69	P
PDE4C	167.61	P	34.49	P	115.83	P	405.72	P	375.36	P	556.43	P
PECAM1	50.00	P	50.00	P	50.00	P	450.90	P	112.47	P	160.30	P
S100A6	107.30	P	50.00	P	62.06	P	771.50	P	619.06	P	999.47	P
SSR1	438.89	P	230.49	P	408.10	P	925.34	P	620.43	P	781.58	P
TLOC1	181.49	P	149.69	P	106.80	P	505.16	P	211.24	P	397.68	P
ZNF183	418.26	P	466.31	P	507.56	P	1733.06	P	963.11	P	1061.79	P

Figure 11

Figure 11 Représentation du patron d'expression des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde de la lignée OV90 du modèle xéno greffe de la même lignée. Les gènes ont été sélectionnés par une analyse au niveau de la variation différentielle de leur expression. Ainsi, les signaux des gènes sélectionnés sont soit au moins quatre fois surexprimés par rapport au sphéroïde ou encore au moins trois fois sous-exprimés par rapport au sphéroïde. En rouge on observe les gènes qui sont surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons.

Le tableau II présente en détails les noms ainsi que la classification des gènes retrouvés dans ce profil. On y retrouve plusieurs gènes qui sont très intéressants pour l'étude de la tumorigenèse. Par exemple, les gènes qui jouent un rôle au niveau de la matrice extracellulaire comme l'ITIH2 (inter-alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 2), le CSPG2 (chondroïtin sulfate proteoglycan 2 ou versican) ou encore la HABP2 (hyaluronic acid-binding protein2). Il y a également plusieurs gènes impliqués au niveau de la structure cellulaire tels les MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate) et au niveau de l'adhésion cellulaire comme la cadhérine 6, la villin 2 ou encore la fibronectine 1. Parmi les gènes les plus intéressants, on retrouve des gènes impliqués dans les processus d'angiogenèse comme la thrombospondine ou la PECAM1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1). Enfin, ce profil met en évidence également des gènes marqueurs de la progression tumorale tels que MSMB (microseminoprotein beta), ENO1 (enolase 1) ou encore S100A6 (S100 calcium-binding protein A6). Ainsi, le modèle sphéroïde de la lignée OV90 semble avoir le potentiel d'être un modèle *ex vivo* qui pourrait nous permettre d'étudier plusieurs aspects de la tumorigenèse sans pour autant faire appel à un protocole complexe de passage tumoral *in vivo*.

A)

Symbol	Nom du gène	Classification

ACLY	ATP citrate lyase	binding
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	binding
C20orf30	chromosome 20 open reading frame 30	
C6orf62	chromosome 6 open reading frame 62	
CALU	calumenin	binding
CD44	CD44 antigen	
CDC2	cell division	catalytic activity
CDH6	cadherin 6	binding
	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene	
CRKL	homolog (avian)-like	signal transducer activity
	chondroitin sulfate proteoglycan 2	
CSPG2	(versican)	binding
	chondroitin sulfate proteoglycan 2	
CSPG2	(versican)	binding
CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	binding
		cell proliferation; embryogenesis and morphogenesis
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	cell proliferation; embryogenesis and morphogenesis
		binding
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	
ENO1	enolase 1, (alpha)	binding
	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	signal transducer activity
F2RL1		
FER1L3	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	
FLJ11017	hypothetical protein FLJ11017	
	filamin A, alpha (actin binding protein 280)	
FLNA		
FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278)	cell adhesion molecule activity
FN1	fibronectin 1	catalytic activity
KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	integral to plasma membrane; lysosome; membrane fraction
	lysosomal-associated membrane protein 1	
LAMP1		
	membrane component, chromosome 11,	
M11S1	surface marker 1	integral to plasma membrane
	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	
MAPRE1		binding
	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	
MARCKS		binding
		heavy metal ion transport; heavy metal ion transporter activity
MT1E	metallothionein 1E (functional)	binding
MT1F	metallothionein 1F (functional)	binding
MT1F	metallothionein 1F (functional)	binding
MT1F	metallothionein 1F (functional)	binding
MT1G	metallothionein 1G	binding
MT1H	metallothionein 1H	binding
MT1X	metallothionein 1X	binding
MT1X	metallothionein 1X	binding
MT2A	metallothionein 2A	binding
na		
	non-POU domain containing, octamer-binding	
NONO		
OSMR	oncostatin M receptor	signal transducer activity
	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase, beta polypeptide	
P4HB		
PDAP1	PDGFA associated protein 1	cell proliferation; signal transduction
PEG10	paternally expressed 10	binding
PEG10	paternally expressed 10	binding

Tableau II

B)

Symbol	Nom du gène	Classification
PI3	protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	enzyme regulator activity
PLAU	plasminogen activator, urokinase	catalytic activity
PRNP	prion protein (p27-30)	
PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1	
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	catalytic activity
RAI3	retinoic acid induced 3	signal transducer activity
RNP24	coated vesicle membrane protein	transporter activity
RNP24	coated vesicle membrane protein	transporter activity
SERPINH1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	heat shock response
SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1	binding
SLC7A8	solute carrier family 7, member 8	
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1	Golgi apparatus; nucleus; response to stress
STOM	stomatin	
THBS1	thrombospondin 1	structural molecule activity
THBS1	thrombospondin 1	structural molecule activity
TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	signal transducer activity
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	
VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	exocytosis; integral to membrane; membrane fusion; nonselective vesicle docking; nonselective vesicle transport; protein complex assembly; synapse; synaptosome
VIL2	villin 2 (ezrin)	cytoskeletal anchoring; microvillus
VIL2	villin 2 (ezrin)	cytoskeletal anchoring; microvillus
YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	binding
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	binding

ATP5I	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e	transporter activity
CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	transporter activity
E2IG5	growth and transformation-dependent protein	
FBXO9	F-box only protein 9	
FGB	fibrinogen, B beta polypeptide	blood coagulation; fibrinogen; fibrinogen beta chain; positive regulation of cell proliferation; regulation of blood pressure; soluble fraction
FGG	fibrinogen, gamma polypeptide	blood coagulation; fibrinogen; fibrinogen gamma chain; positive regulation of cell proliferation; regulation of blood pressure
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	binding
HABP2	hyaluronan binding protein 2	catalytic activity
ITIH2	inter-alpha (globulin) inhibitor, H2 polypeptide	enzyme regulator activity
KR18	KRAB zinc finger protein KR18	
KTN1	kinectin 1 (kinesin receptor)	endoplasmic reticulum; integral to membrane
LOC90410	intraflagellar transport protein IFT20	
LUC7A	cisplatin resistance-associated overexpressed protein	RNA splicing; nucleus
MSMB	microseminoprotein, beta-	molecular_function unknown
MSMB	microseminoprotein, beta-similar to PUTATIVE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR II ASSOCIATED PROTEIN	molecular_function unknown
na		
NUCB2	nucleobindin 2	binding
PDE4C	phosphodiesterase 4C, cAMP-specific	catalytic activity
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	
S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	signal transducer activity
SSR1	signal sequence receptor, alpha (translocation-associated protein alpha)	binding
TLOC1	translocation protein 1	transporter activity
ZNF183	zinc finger protein 183 (RING finger, C3HC4 type)	binding

Tableau II (suite)

Tableau II Tableau représentant les noms et la classification des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde de la lignée OV90 du modèle xénogreffe chez la souris. En A) la première partie de la liste de ces gènes et en B) la deuxième partie de la liste. Les noms en caractères gras représentent les gènes surexprimés au niveau des modèles monocouches et sous-exprimés au niveau des sphéroïdes et des xénogreffes. Les noms en caractères normaux représentent des gènes sous-exprimés au niveau des monocouches mais surexprimés au niveau des sphéroïdes et des xénogreffes. Les noms et la classification ont été identifiés à l'aide de l'outil DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

En analysant de plus près les gènes candidats qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle xéno greffé, nous avons pu observer également que certains gènes sont modulés de façon similaire non seulement à un niveau individuel mais aussi au niveau de différents membres d'une même famille de gènes. C'est le cas par exemple de chémokines ainsi que de certains gènes du choc thermique.

Les chémokines modulées ici font partie de la sous-famille de chémokines CXC qui contiennent un acide aminé entre le premier et le deuxième résidu cystéine de la protéine. Ces chémokines sont des molécules chimiotactiques pour les neutrophiles et jouent un rôle au niveau de l'inflammation. Les protéines du choc thermique quant à elles jouent un rôle important au niveau de la protection des cellules contre les différents stress que peuvent subir ces cellules. Nous avons également observé que certaines de ces protéines sont modulées de façon différente selon le modèle.

Symbole	LSC	LSC	LIP	LIP	L	L	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
CXCL1	892,80	P	833,79	P	888,32	P	384,94	P	378,62	P	292,37	P
CXCL2	500,72	P	365,38	P	372,15	P	110,55	P	94,76	P	77,42	P
CXCL3	247,21	P	97,40	P	135,17	P	51,17	P	50,00	P	65,51	P
CXCL5	970,11	P	709,25	P	926,48	P	568,15	P	687,15	P	349,88	P
CXCL5	933,75	P	864,65	P	1020,67	P	50,00	P	50,00	P	50,00	A
CXCL6	589,49	P	401,99	P	626,07	P	310,77	P	285,97	P	191,95	P

Figure 12

Figure 12 Représentation du profil d'expression des chémokines au niveau des modèles développés à partir de la lignée OV90. En rouge on voit les gènes surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons. Les chémokines sont donc surexprimées au niveau du modèle monocouche.

Symbole	L	L	LIP	LIP	LSC	LSC	S	S	TIP	TIP	TSC	TSC
HSPD1	1406,56	P	1531,95	P	1533,30	P	677,73	P	494,51	P	679,03	P
HSPA1A	333,71	P	253,97	P	435,58	P	196,11	P	173,19	P	99,93	P
HSPC111	88,07	P	86,25	P	79,41	P	69,42	P	50,00	P	59,98	P
HSPA8	2281,76	P	2488,30	P	2604,67	P	2008,53	P	1307,75	P	1505,85	P
HSPH1	192,90	P	210,73	P	186,78	P	71,85	P	50,00	P	50,00	A
HSPA8	2063,74	P	2160,04	P	2395,29	P	1489,45	P	902,31	P	1423,84	P
HSPA4	246,53	P	220,02	P	216,07	P	130,69	P	123,34	P	131,65	P
HSPA4	127,36	P	132,66	P	140,73	P	50,00	A	50,00	A	50,00	A
HSPCA	1204,39	P	1269,74	P	1293,67	P	856,84	P	542,81	P	618,43	P
HSPC111	204,85	P	193,93	P	208,24	P	156,22	P	133,05	P	129,23	P
HSPCB	868,23	P	1197,25	P	1072,64	P	328,74	P	372,80	P	336,78	P
HSP70-4	213,65	P	177,95	P	152,90	P	131,61	P	105,56	P	107,94	P
HSPCA	1670,32	P	1793,73	P	1897,69	P	2134,36	P	2421,42	P	2123,85	P
HSPC152	540,07	P	460,42	P	502,25	P	624,62	P	574,30	P	559,92	P
COMMD9	59,00	P	54,77	A	50,00	A	70,45	P	81,90	P	65,35	A
HSPA8	1424,82	P	1079,40	P	1358,56	P	1618,25	P	1489,33	P	1667,54	P

Figure 13

Figure 13 Représentation du profil d'expression des protéines du choc thermique au niveau des modèles développés à partir de la lignée OV90. En rouge on voit les gènes surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons.

Le modèle sphéroïde ayant le potentiel d'être un intermédiaire entre le modèle xénogreffe et le modèle monocouche, nous avons également identifié de gènes candidats dont le profil d'expression est similaire entre le sphéroïde et la monocouche. Ainsi, la figure 14 présente de façon visuelle le profil d'expression des gènes identifiés ainsi que les valeurs numériques correspondant à l'intensité du signal d'hybridation. Le tableau III présente quant à lui la liste des noms ainsi que la classification des gènes identifiés. Les gènes modulés semblent être surtout reliés aux fonctions telles que le métabolisme ou encore au niveau de la structure. Les cellules en monocouche se retrouvent dans un milieu auquel elles doivent s'adapter. Ainsi, comme elles poussent sur une surface plate en plastique leur morphologie est différente de celle que l'on retrouve dans un tissu. Les cellules deviennent plus aplaties et elles s'étendent sur la surface. De plus, les cellules libèrent dans le milieu dans lequel elles se trouvent différents facteurs ou déchets auxquels elles doivent également faire face. Donc, les gènes modulés comme par exemple la moesine ou encore ARHGAP6 (GTPase-activating protein, rho6) aident probablement la cellule à s'adapter à l'environnement dans lequel elle se trouve. Le sphéroïde, même s'il ne se retrouve plus en contact avec le pétri, provient de la même lignée et pourrait retenir certains des changements qu'a subit la lignée. De plus, les cellules *ex vivo* ne bénéficient plus de la diversité environnementale que l'on retrouve *in vivo* et leur métabolisme en est certainement affecté. Ainsi, les gènes intéressants à ce niveau dans la lignée en monocouche comme en sphéroïde sont des gènes comme la carboxypeptidase 1 qui est impliquée dans le détoxification, SLC3A1 (solute carrier family 3, member 1) qui joue un rôle au niveau de l'absorption des acides aminés ou

encore PPAP2B (phosphatidic acid phosphatase type 2b) qui est important pour le métabolisme des lipides.

Symbol	LSC	LSC	LIP	LIP	L	L	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
IGFBP4	191.30	P	231.23	P	179.96	P	403.89	P	50.00	A	50.00	P
ETR101	283.25	P	290.03	P	313.81	P	450.36	P	88.12	P	260.72	P
CYBA	584.97	P	527.15	P	541.25	P	595.52	P	81.37	A	301.91	P
APOE	568.67	P	760.00	P	614.41	P	780.51	P	50.00	A	242.93	P
EPHB6	154.62	P	178.44	P	213.79	P	281.51	P	50.00	P	113.06	P
PRSS2	1894.37	P	1848.88	P	2070.46	P	2766.48	P	893.01	P	527.23	P
ARHGAP6	139.84	P	129.81	P	272.41	P	290.47	P	71.68	P	75.54	P
PRSS3	209.96	P	155.02	P	303.18	P	390.99	P	94.76	P	55.06	P
CES1	329.17	P	392.64	P	392.43	P	539.22	P	266.58	P	109.56	P
PPAP2B	297.77	P	325.72	P	312.83	P	416.25	P	93.81	P	98.46	P
MICAL2	228.23	P	233.15	P	187.77	P	224.13	P	54.18	P	115.84	P
PRSS3	327.26	P	313.14	P	416.47	P	633.09	P	165.70	P	102.05	P
PDGFC	224.09	P	291.95	P	181.47	P	231.42	P	144.62	P	50.00	P
MSN	218.62	P	183.28	P	357.66	P	312.66	P	63.88	P	89.98	P
CD81	290.07	P	249.08	P	337.38	P	221.16	P	58.92	P	50.00	P
EMP3	440.29	P	308.37	P	675.33	P	479.51	P	118.79	P	236.98	P
PRSS1	379.98	P	243.75	P	442.49	P	258.03	P	116.79	P	50.00	P
TFPI2	150.41	P	190.53	P	235.57	P	221.16	P	50.00	A	50.00	A
TFPI2	335.09	P	353.60	P	480.08	P	321.84	P	50.00	A	50.00	A
PLAGL1	329.93	P	287.43	P	311.56	P	234.98	P	50.00	P	54.08	P
PHLDA1	400.36	P	246.85	P	430.40	P	318.97	P	87.28	P	50.00	P
NDRG1	78.71	P	76.64	P	111.79	P	98.46	P	941.18	P	1186.85	P
AK3	126.72	P	117.66	P	146.27	P	50.00	P	295.14	P	259.66	P
SCRG1	50.00	P	57.93	P	88.87	P	50.00	P	482.77	P	642.49	P
ASB9	50.00	P	67.29	P	50.00	P	50.00	P	111.63	P	315.54	P
SLC3A1	97.81	P	145.92	P	176.57	P	93.87	P	499.31	P	587.35	P
ADH1C	50.00	A	50.00	P	50.00	P	50.00	P	325.81	P	632.38	P
UPK1B	50.00	A	50.00	A	50.00	P	50.00	A	136.08	P	428.19	P
KIAA0802	98.58	P	87.05	P	62.57	P	58.25	P	313.17	P	347.76	P
MUC1	58.27	P	50.00	A	50.00	A	53.98	P	512.28	P	525.92	P
---	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	537.16	P	320.35	P
---	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	334.88	P	1198.76	P
HBE1	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	1309.37	P	2783.21	P

Figure 14

Figure 14 Représentation du patron d'expression des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche de la lignée OV90. Les gènes ont été sélectionnés par une analyse au niveau de la variation différentielle de leur expression. Les signaux des gènes sélectionnés sont soit au moins quatre fois surexprimés par rapport au sphéroïde ou encore au moins trois fois sous-exprimés par rapport au sphéroïde. En rouge on observe les gènes qui sont surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons.

Symbol	Nom du gène	Classification
IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	binding
ETR101	immediate early protein	
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide	
APOE	apolipoprotein E	transporter activity
EPHB6	EphB6	signal transducer activity
PRSS2	protease, serine, 2 (trypsin 2)	catalytic activity
ARHGAP6	Rho GTPase activating protein 6	signal transducer activity
PRSS3	protease, serine, 3 (mesotrypsin)	catalytic activity
	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	
CES1		catalytic activity
PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	catalytic activity
MICAL2	flavoprotein oxidoreductase MICAL2	catalytic activity
PRSS3	protease, serine, 3 (mesotrypsin)	catalytic activity
PDGFC	platelet derived growth factor C	
MSN	moesin	structural molecule activity
		cell proliferation; defense response;
CD81	CD81 antigen (target of antiproliferative antibody 1)	integral to plasma membrane; protein complex assembly
		cell death; cell growth; cell proliferation; development; integral to membrane; membrane fraction; negative regulation of cell proliferation
EMP3	epithelial membrane protein 3	
PRSS1	protease, serine, 1 (trypsin 1)	catalytic activity
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	structural molecule activity
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	structural molecule activity
		cell cycle arrest; induction of apoptosis; induction of apoptosis by p53; transcription activating factor; tumor suppressor
PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	
	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	
PHLDA1		nucleus
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	
AK3	adenylate kinase 3	catalytic activity
SCRG1	scrapie responsive protein 1	extracellular space; neurogenesis
ASB9	ankyrin repeat and SOCS box-containing 9 solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	intracellular signaling cascade
SLC3A1		transporter activity
	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	
ADH1C		catalytic activity
UPK1B	uroplakin 1B	structural molecule activity
KIAA0802	KIAA0802 protein	
MUC1	mucin 1, transmembrane	

HBE1	hemoglobin, epsilon 1	transporter activity

Tableau III

Tableau III Tableau représentant les noms et la classification des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche de la lignée OV90. Les gènes surexprimés au niveau des modèles monocouches et sphéroïdes et sous-exprimés au niveau des xénogreffes sont identifiés par des caractères gras. Les gènes en caractères normaux sont sous-exprimés au niveau des modèles monocouches et sphéroïdes mais surexprimés au niveau des modèles xénogreffes. Les noms et la classification ont été identifiés à l'aide de l'outil DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

Enfin, nous avons également identifié des gènes qui sont spécifiques au modèle sphéroïde. Encore une fois, on retrouve parmi les gènes modulés ceux impliqués au niveau de la structure et de liaison cellulaire. Ainsi, la cadhérine 1, la MMP1 (metalloprotéinase de la matrice), le COL3A1 (collagène) ou encore HEY1 (hairy/enhancer of split-related with YRPW motif 1) sont des gènes spécifiques au sphéroïde et importants pour sa structure.

Symbol	S	S	L	L	LSC	LSC	LIP	LIP	TSC	TSC	TIP	TIP
JWA	233.41	P	56.36	P	77.05	P	50.00	P	80.53	P	70.40	P
IL6ST	411.39	P	76.74	P	118.70	P	67.66	P	55.55	A	85.57	P
FGL1	1093.66	P	196.52	P	107.56	P	178.94	P	76.53	P	112.33	P
SERPINI1	483.08	P	111.50	P	92.85	P	100.56	P	50.00	P	50.00	A
PFC	302.89	P	58.53	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A
BIGM103	300.30	P	92.36	P	64.89	P	87.05	P	101.61	P	73.17	P
MAF	447.45	P	146.41	P	132.14	P	76.21	P	135.55	P	104.66	P
PDCC4	252.15	P	50.00	P	50.00	P	56.01	P	66.41	P	70.48	P
APOC4	883.78	P	288.17	P	299.75	P	335.70	P	204.38	P	268.06	P
COL3A1	265.86	P	54.01	P	50.00	P	50.00	P	67.36	P	50.00	P
RDHL	209.77	P	79.56	P	57.69	P	53.29	P	50.00	M	50.00	P
HEY1	365.24	P	83.51	P	50.00	P	77.57	P	74.10	P	65.59	P
PROS1	233.52	P	87.13	P	50.00	P	77.14	P	67.04	P	98.63	P
TNFSF10	251.50	P	82.01	P	84.12	P	50.00	P	50.00	P	50.00	P
MMP1	1576.57	P	491.84	P	553.77	P	377.46	P	214.08	P	491.82	P
SAT	973.49	P	238.63	P	336.81	P	234.52	P	368.72	P	213.97	P
TNFSF10	223.21	P	71.84	P	92.21	P	50.00	P	78.21	P	54.49	P
---	274.12	P	72.97	P	81.51	P	53.29	P	112.26	P	93.57	P
CDH1	109.58	P	486.48	P	687.18	P	434.40	P	588.59	P	532.61	P
CEACAM6	111.26	P	495.28	P	664.32	P	400.01	P	442.71	P	423.22	P
CEACAM5	143.48	P	265.64	P	708.51	P	421.76	P	796.67	P	784.68	P

Figure 15

Figure 15 Représentation du patron d'expression des gènes qui sont spécifiques au modèle sphéroïde de la lignée OV90. Les gènes ont été sélectionnés par une analyse au niveau de la variation différentielle de leur expression. Ainsi, les signaux des gènes sélectionnés sont soit au moins quatre fois surexprimés par rapport au sphéroïde ou encore au moins trois fois sous-exprimés par rapport au sphéroïde. En rouge on observe les gènes qui sont surexprimés et en vert les gènes sous- exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons.

Symbole	Nom du gène	Classification
JWA	cytoskeleton related vitamin A responsive protein	
IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	signal transducer activity
FGL1	fibrinogen-like 1	fibrinogen; fibrinogen complex
SERPINI1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	enzyme regulator activity
PFC	properdin P factor, complement	defense/immunity protein activity
BIGM103	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	transporter activity
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	transcription regulator activity
PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	apoptosis
APOC4	apolipoprotein C-IV	transporter activity
COL3A1	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	circulation; collagen; collagen type III; histogenesis and organogenesis
RDHL	NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase	
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	binding
PROS1	protein S (alpha)	enzyme regulator activity
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	signal transducer activity
MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	catalytic activity
SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	catalytic activity
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	binding

CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	
CEACAM5	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	

Tableau IV

Tableau IV Tableau représentant les noms et la classification des gènes qui sont spécifiques au modèle sphéroïde de la lignée OV90. Les caractères en gras représentent des gènes surexprimés et les caractères normaux des gènes sous-exprimés au niveau des sphéroïdes. Les noms et la classification ont été identifiés à l'aide de l'outil DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

3.2.2.3.2 Analyse de l'expression différentielle des gènes pour la lignée TOV21G

Nous avons également effectué le même type d'analyse de variation différentielle d'expression pour la lignée TOV21G afin de voir si nos résultats sont indépendants du type de lignée et donc si on retrouve les mêmes gènes candidats d'une lignée à l'autre. Dans le cas de la lignée TOV21G on retrouve, comme dans le cas de la lignée OV90, des profils d'expression qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle xénogreffe, ou du modèle monocouche ou encore qui sont spécifiques au modèle 3D. Cependant, seulement deux gènes sont retrouvés tant dans la lignée OV90 que dans la lignée TOV21G soit ApoE et HBE1. Il est important de noter que ces gènes sont modulés de façon similaire dans les deux lignées, c'est-à-dire que dans les deux cas ils font partie des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche. De plus, tant dans la lignée OV90 que dans la lignée TOV21G, ApoE est surexprimée dans les lignées et le sphéroïde et HBE1 est sous-exprimé dans ces deux types de modèles.

A)

Symbole	L	L	LSC	LSC	LIP	LIP	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
WARS	715.14	P	1578.01	P	827.61	P	287.16	P	197.73	P	195.72	P
WARS	715.14	P	1578.01	P	827.61	P	287.16	P	197.73	P	195.72	P
ASNS	496.43	P	314.20	P	236.46	P	108.48	P	69.05	P	50.00	P
PHGDH	209.93	P	143.73	P	117.43	P	60.43	P	61.81	P	50.00	A
DKK3	621.51	P	443.28	P	446.99	P	303.61	P	53.09	P	189.83	P
SLC7A5	850.65	P	1094.84	P	702.75	P	133.06	P	292.75	P	174.02	P
KIAA0446	128.94	P	246.36	P	135.14	P	67.11	P	50.00	P	50.00	P
TXNIP	50.00	P	50.00	P	50.00	P	272.87	P	238.70	P	306.76	P

B)

Symbole	L	L	LSC	LSC	LIP	LIP	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
DUSP6	206.88	P	204.55	P	202.53	P	338.59	P	112.99	P	68.38	P
DUSP6	206.88	P	204.55	P	202.53	P	338.59	P	112.99	P	68.38	P
GDF15	1814.40	P	1560.04	P	1166.88	P	1641.85	P	250.99	P	312.73	P
ANKRD3	138.35	P	160.71	P	157.07	P	229.87	P	50.00	A	50.00	A
SLC26A2	244.44	P	264.39	P	364.74	P	381.93	P	86.31	P	95.24	P
APOE	683.20	P	511.58	P	606.74	P	755.79	P	69.92	P	222.17	P
GPRC5C	248.51	P	234.68	P	207.10	P	276.00	P	66.87	A	149.27	P
ID4	325.55	P	276.23	P	376.91	P	338.41	P	50.00	P	165.56	P
STXBP1	136.85	P	166.68	P	177.12	P	209.30	P	50.00	P	79.03	P
HLA-F	128.61	P	188.81	P	210.70	P	151.37	P	378.80	P	730.04	P
HIG2	69.39	P	86.02	P	96.07	P	55.67	P	178.89	P	285.31	P
	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	845.74	P	1962.40	P
GNAS	205.92	P	136.50	P	131.37	P	247.24	P	733.19	P	890.68	P
HBE1	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	2020.58	P	3745.06	P
	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	A	734.93	P	897.86	P
SLC6A10	50.00	A	50.00	A	50.00	A	50.00	P	86.13	P	171.60	P
	50.00	A	60.25	P	50.00	A	50.00	A	136.09	P	217.73	P
MT1F	127.54	P	273.22	P	227.15	P	136.72	P	485.16	P	584.97	P
IGFBP3	73.78	P	50.00	P	50.00	P	50.00	A	428.06	P	552.07	P
IGFBP3	183.34	P	68.72	P	63.34	P	50.00	P	1757.82	P	1428.64	P
RPS14	233.21	P	256.80	P	162.95	P	116.85	P	585.24	P	461.35	P
HIST1H4C	72.01	P	62.59	P	57.29	P	55.26	P	188.75	P	91.29	P
NMB	50.00	A	70.95	P	51.80	P	50.00	P	136.96	P	213.38	P
HLA-F	93.73	P	189.28	P	199.16	P	134.57	P	324.22	P	625.29	P
RBP1	50.00	A	72.67	P	50.00	A	50.00	P	204.87	P	221.60	P
SOX9	50.00	P	85.45	P	55.86	P	50.00	P	214.73	P	181.04	P
SOX9	50.00	A	131.93	P	76.88	P	61.07	P	280.02	P	240.63	P
FABP5	124.44	P	50.00	P	110.23	P	50.00	P	295.37	P	135.80	P
EFNA1	50.00	P	50.00	P	50.00	P	50.00	P	199.90	P	98.87	P
KRT5	50.00	A	130.79	P	50.00	A	50.00	A	2199.56	P	774.80	P

C)

Symbole	L	L	LSC	LSC	LIP	LIP	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
SCAP2	78.97	P	62.90	P	85.85	P	294.54	P	50.00	P	98.38	P
ECEL1	50.00	A	55.63	A	50.00	A	281.82	P	81.08	A	50.00	A
CREM	68.11	P	52.77	P	60.66	P	267.46	P	50.00	P	57.90	P
FOS	101.06	P	50.00	A	50.00	A	308.60	P	50.00	A	57.17	P
GABARAPL1	50.00	P	52.77	P	58.54	P	342.83	P	50.00	P	50.00	P
GABARAPL1	74.95	P	61.29	P	50.00	P	205.58	P	50.00	P	50.00	P
GRB14	70.67	P	50.00	M	50.00	P	200.99	P	50.00	A	50.00	P
SLC16A6	54.78	P	50.00	P	75.22	P	402.62	P	50.00	A	50.00	P
EN2	52.91	P	50.00	A	50.00	A	443.64	P	50.00	A	50.00	P
ITPKB	89.08	P	61.66	P	50.00	P	340.74	P	50.00	A	50.00	A
HMOX1	102.77	P	132.61	P	88.7	P	374.67	P	50	A	50	P
MMD	120.7	P	136.19	P	144.79	P	331.96	P	139.23	P	78.71	P
PCP4	174.73	P	201.49	P	124.34	P	528.59	P	50.00	P	130.88	P
SFRP1	260.38	P	156.14	P	169.23	P	887.11	P	50.00	A	67.66	P
PDK4	75.27	P	245.69	P	188.71	P	871.48	P	50.00	P	185.72	P
RYR3	110.96	P	88.56	P	94.98	P	250.96	P	84.74	P	55.96	P
SALL1	59.44	P	104.56	P	104.35	P	287.22	P	50.00	P	103.95	P

Figure 16

Figure 16 Représentation des patrons d'expression de la lignée TOV21G. En A) les gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde *in vitro* du modèle xéno greffe *in vivo*. En B) les gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche. En C) les gènes spécifiques au modèle sphéroïde. Les gènes ont été sélectionnés par une analyse au niveau de la variation différentielle de leur expression. Les signaux des gènes sélectionnés sont soit au moins quatre fois surexprimés par rapport au sphéroïde ou encore au moins trois fois sous-exprimés par rapport au sphéroïde. En rouge on observe les gènes qui sont surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons.

A)

Symbole	Nom du gène	
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	binding, catalytic activity
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	binding, catalytic activity
ASNS	asparagine synthetase	catalytic activity
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	catalytic activity, transporter activity
DKK3	dickkopf homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>)	Wnt receptor signaling pathway;
	solute carrier family 7 (cationic amino acid	extracellular space; morphogenesis
	transporter, y+ system), member 5	
SLC7A5	KIAA0446 gene product	transporter activity
KIAA0446	thioredoxin interacting protein	transporter activity, binding
TXNIP		molecular_function unknown

B)

Symbole	Nome du gène	Classification
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	catalytic activity
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	
GDF15	prostate differentiation factor	
ANKRD3	ankyrin repeat domain 3	binding, catalytic activity
	solute carrier family 26 (sulfate	
	transporter), member 2	transporter activity
SLC26A2	apolipoprotein E	transporter activity
APOE	G protein-coupled receptor, family C, group	
	5, member C	signal transducer activity
GPCR5C	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative	
ID4	helix-loop-helix protein	binding
STXBP1	syntaxin binding protein 1	transporter activity
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	
HIG2	hypoxia-inducible protein 2	molecular_function unknown
GNAS	GNAS complex locus	binding, catalytic activity, signal
HBE1	hemoglobin, epsilon 1	transducer activity
SLC6A10		transporter activity
MT1F	metallothionein 1F (functional)	binding
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	binding
IGFBP3	ribosomal protein S14	binding, structural molecule activity
RPS14	histone 1, H4c	
HIST1H4C	neuromedin B	binding, signal transducer activity
NMB	major histocompatibility complex, class I, F	
HLA-F	retinol binding protein 1, cellular	
RBP1	SRY (sex determining region Y)-box 9	
	(campomelic dysplasia, autosomal sex-	
	reversal)	transcription regulator activity
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	
	(campomelic dysplasia, autosomal sex-	
	reversal)	transcription regulator activity
SOX9	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-	
	associated)	binding, transporter activity
FABP5	ephrin-A1	binding, signal transducer activity
EFNA1	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex,	
	Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne	
	types)	structural molecule activity
KRT5		

Tableau V

C)

Symbole	Nom du gène	Classification
SCAP2	src family associated phosphoprotein 2	transcription regulator activity
ECEL1	endothelin converting enzyme-like 1	signal transducer activity, binding
CREM	cAMP responsive element modulator v-fos FBJ murine osteosarcoma viral	transcription regulator activity, binding
FOS	oncogene homolog	
GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	transcription regulator activity
GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	transcription regulator activity
GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	catalytic activity
SLC16A6	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	binding
EN2	engrailed homolog 2	transporter activity, binding
ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	binding, catalytic activity
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	
MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	signal transducer activity
PCP4	Purkinje cell protein 4	
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	signal transducer activity
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	central nervous system development, binding
RYR3	ryanodine receptor 3	signal transducer activity, binding
SALL1	sal-like 1 (Drosophila)	transporter activity

Tableau V (suite)

Tableau V Tableau représentant les noms et la classification des gènes sélectionnés pour la lignée TOV21G. En A) les gènes correspondants au profil d'expression qui rapproche le modèle sphéroïde *in vitro* au modèle xéno greffe *in vivo*. Les gènes en caractères gras sont surexprimés au niveau des monocouches et sous-exprimés au niveau des sphéroïdes et des xéno greffes. En B) les gènes qui correspondent au profil d'expression qui rapproche le modèle sphéroïde au modèle monocouche. Les caractères gras représentent des gènes surexprimés dans les modèles monocouches et sphéroïdes et sous-exprimés au niveau des xéno greffes. En C) les gènes correspondants au profil d'expression spécifique au modèle sphéroïde. Les gènes en caractères gras sont surexprimés au niveau des sphéroïdes. Les noms et la classification ont été identifiés à l'aide de l'outil DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

3.2.2.3.3 Analyse de l'expression différentielle des gènes pour la lignée TOV112D

Enfin, la dernière lignée pour laquelle nous avons effectué l'analyse de la variation différentielle d'expression est la TOV112D. Comme on peut l'observer dans les figures 17 et 18, nous ne retrouvons plus les patrons d'expression que nous avons trouvés pour les lignées précédentes. En effet, même si les gènes sont modulés, on ne peut établir un profil spécifique.

Symbole	L	L	LSC	LSC	LIP	LIP	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
HMOX1	304.24	P	289.90	P	649.73	P	143.67	P	456.88	P	88.72	P
TUBB	1027.38	P	682.07	P	787.47	P	247.03	P	847.65	P	699.83	P
STK6	580.98	P	321.62	P	776.69	P	130.39	P	439.07	P	652.89	P
LIMS1	491.72	P	377.71	P	801.97	P	235.06	P	431.34	P	560.00	P
HARS	257.41	P	187.64	P	325.55	P	110.53	P	205.09	P	410.84	P
FN1	147.01	P	260.68	P	542.80	P	50.00	A	197.68	P	313.47	P
FN1	115.48	P	216.99	P	341.53	P	50.00	P	137.38	P	238.62	P
FN1	179.52	P	321.12	P	535.14	P	80.94	P	223.48	P	366.30	P
LGALS1	50.00	P	895.57	P	1581.18	P	102.18	P	636.11	P	1718.96	P
SAMD4	111.77	P	131.93	P	221.41	P	64.96	P	135.57	P	73.81	P
APLP2	148.45	P	296.57	P	535.41	P	122.23	P	273.81	P	121.98	P
APLP2	205.13	P	433.17	P	659.03	P	181.80	P	402.93	P	205.54	P
H.LA-B	141.55	P	399.64	P	425.31	P	84.36	A	388.80	P	151.92	P
TAGLN2	142.01	P	179.60	P	131.61	P	50.00	P	191.98	P	62.15	P
TACC3	517.86	P	358.58	P	370.31	P	152.35	P	374.73	P	237.57	P
ACTA2	72.67	P	450.00	P	231.26	P	50.00	A	623.00	P	111.55	P
TNFRSF6	53.42	P	105.63	P	66.87	P	50.00	P	170.01	P	67.80	P
NMU	92.37	P	220.11	P	50.24	P	50.00	P	259.84	P	50.00	A
SLC7A11	62.59	P	139.16	P	50.00	A	50.00	A	219.00	P	50.00	A
CTGF	50.00	A	230.89	P	67.15	P	50.00	A	303.66	P	50.00	P
PLAC8	76.38	P	186.02	P	50.00	P	50.00	P	263.63	P	57.06	P
FLJ23091	50.47	P	212.94	P	50.00	P	79.82	P	303.13	P	50.00	A
BMPR2	74.19	P	107.00	P	74.70	P	50.00	P	184.76	P	83.51	P
CYR61	281.44	P	380.82	P	160.50	P	50.00	P	478.31	P	74.79	P
CLTB	180.50	P	152.30	P	92.37	P	50.00	P	127.15	P	86.02	P
SLC7A11	404.80	P	346.11	P	50.00	P	131.96	P	605.41	P	50.00	P
ID1	932.13	P	1218.63	P	332.83	P	260.25	P	1005.67	P	472.44	P
ID3	880.45	P	972.35	P	284.78	P	245.98	P	967.61	P	132.96	P
ADM	282.42	P	224.16	P	148.41	P	50.00	P	237.72	P	95.96	P
CRIM1	185.12	P	103.26	P	50.00	P	50.00	P	128.48	P	50.00	P
PPIF	217.40	P	136.23	P	50.00	P	58.26	P	189.15	P	50.00	P
ID2	169.59	P	192.38	P	62.11	P	64.24	P	266.56	P	81.48	P
CYR61	495.81	P	583.48	P	286.37	P	64.63	P	656.85	P	190.94	P
S100A10	54.10	A	141.71	P	329.60	P	50.00	A	127.84	P	360.04	P
EMP1	103.59	P	118.90	P	1384.45	P	106.45	P	66.96	P	1420.28	P
EMP1	53.80	P	50.35	P	1147.50	P	80.35	P	50.00	P	932.56	P
COL6A3	50.00	A	50.00	A	541.65	P	50.00	A	50.00	A	262.67	P
TIMP1	50.00	A	101.33	P	234.33	P	50.00	A	57.20	P	250.64	P
SEMA3C	173.30	P	50.00	P	443.10	P	92.91	P	77.30	P	482.75	P
KCNN4	50.00	M	81.39	P	298.95	P	50.00	P	50.00	P	241.99	P
INA	50.00	A	97.22	P	187.87	P	50.00	A	99.85	P	200.08	P
ENO3	50.00	A	54.53	P	260.98	P	50.00	P	50.00	P	183.46	P
CRIP1	50.00	A	50.00	A	191.20	P	50.00	A	50.00	A	88.66	P
MT1H	50.00	A	50.00	A	181.35	P	50.00	A	50.00	A	125.29	A
MT1X	56.83	A	50.23	P	315.59	P	50.00	A	51.93	P	157.26	P
S100A10	54.11	A	141.71	P	329.60	P	50.00	A	127.84	P	360.04	P
PPARD	51.23	A	61.32	A	281.72	P	59.90	A	52.62	A	389.74	P
NELF	260.52	P	183.34	P	367.41	P	94.49	P	270.34	P	465.08	P
GSG1	50.00	A	50.00	A	200.01	P	50.00	A	50.00	A	87.80	P
MKNK2	171.18	P	138.53	P	366.37	P	98.10	P	129.65	P	220.88	P
CACNA1A	50.00	P	50.00	P	248.94	P	50.00	P	50.00	P	312.12	P
EMP1	50.00	A	50.00	A	306.56	P	50.00	A	50.00	A	253.22	P
MT2A	77.67	P	120.65	P	760.49	P	83.57	P	103.32	P	286.60	P
PLAUR	65.62	P	90.61	P	179.66	P	60.62	P	81.62	P	230.39	P
MGC4655	50.00	P	105.69	P	220.70	P	50.00	P	99.21	P	154.93	P

Figure 17

Symbole	L	L	LSC	LSC	LIP	LIP	S	S	TSC	TSC	TIP	TIP
RARB	51.60	A	153.86	P	194.76	P	256.17	P	207.06	P	162.23	P
PCM1	50.00	P	135.17	P	139.76	P	217.57	P	141.92	P	129.52	P
C14orf132	83.66	P	185.58	P	210.74	P	238.88	P	120.86	P	52.28	P
PSAT1	71.84	P	234.19	P	396.69	P	246.44	P	122.62	P	50.50	P
LUM	634.10	P	450.99	P	88.21	P	613.14	P	695.56	P	270.89	P
MSX1	584.54	P	295.14	P	190.98	P	425.09	P	371.42	P	80.56	P
MAT2A	72.52	P	195.74	P	147.15	P	405.30	P	168.78	P	127.62	P
SH3BGRL	51.23	P	121.58	P	91.66	P	217.97	P	102.14	P	108.72	P
GDAP1L1	176.48	P	223.72	P	50.00	P	619.85	P	154.55	P	50.00	P
FLJ20811	61.46	P	164.77	P	50.00	P	263.67	P	170.86	P	50.00	A
DCN	115.18	P	272.58	P	51.66	P	411.41	P	210.90	P	86.51	P
TM4SF6	50.00	P	154.92	P	89.20	P	205.34	P	164.04	P	117.99	P
EPHA7	55.92	P	160.03	P	50.00	P	298.38	P	181.47	P	50.00	P
EPHA3	79.87	P	296.26	P	189.95	P	448.30	P	269.44	P	224.93	P
PRKCH	112.98	P	213.63	P	50.00	A	336.06	P	183.55	P	50.00	A
DCN	258.32	P	407.75	P	90.13	P	556.59	P	298.86	P	111.12	P
TMSNB	149.96	P	342.94	P	175.72	P	342.04	P	378.78	P	63.99	P
MYO1B	70.17	P	89.92	P	50.00	P	238.22	P	137.44	P	50.00	P
PLK2	90.78	P	50.00	P	50.00	P	265.90	P	109.34	P	50.00	A
DNC1	50.00	P	94.60	P	58.28	P	247.10	P	100.49	P	50.68	P
CUL4B	50.00	P	99.52	P	91.11	P	207.65	P	156.26	P	91.61	P
DOC1	50.00	P	99.33	P	139.60	P	702.23	P	232.76	P	114.92	P
HIST3H2A	68.88	P	92.98	P	130.84	P	299.04	P	70.26	P	121.61	P
C6orf48	166.94	P	99.33	P	254.52	P	593.22	P	113.34	P	164.86	P
ITGA4	280.53	P	119.90	P	315.04	P	555.47	P	164.84	P	286.84	P
H2BFS	51.98	P	87.43	P	179.93	P	469.41	P	123.36	P	145.41	P
ITGA4	52.51	P	71.23	P	208.06	P	396.55	P	92.44	P	137.75	P
TRIP8	81.01	P	59.51	P	111.09	P	249.66	P	95.05	P	195.85	P
SMARCA1	50.00	P	91.30	P	93.25	P	254.92	P	103.53	P	128.23	P
HIST2H2A	50.00	P	61.13	P	71.25	P	212.91	P	50.00	P	127.50	P
HIST2H2A	56.61	P	85.44	P	178.67	P	439.49	P	60.78	P	273.77	P
SMARCA1	70.47	P	147.51	P	111.75	P	326.66	P	128.53	P	157.44	P
MARCKS	533.24	P	229.77	P	71.91	P	376.30	P	163.08	P	83.44	P
NR4A2	227.86	P	155.48	P	562.56	P	538.71	P	75.92	P	532.33	P
A2M	588.03	P	121.64	P	668.61	P	1667.48	P	50.00	A	772.60	P
DKK2	69.26	P	79.58	P	529.34	P	335.40	P	104.12	P	633.69	P
FGF20	55.01	P	50.00	P	297.64	P	333.76	P	50.00	P	347.46	P
MEF2C	120.11	P	66.49	P	388.97	P	300.82	P	50.00	P	375.42	P
NR4A2	159.36	P	121.71	P	362.43	P	435.87	P	53.68	P	284.08	P
NR4A2	172.32	P	135.42	P	479.49	P	520.30	P	67.71	P	428.21	P
ITGA4	50.00	P	58.64	P	175.99	P	331.79	P	88.66	P	157.50	P
RPL31	51.30	P	82.13	P	131.45	P	280.70	P	62.80	P	171.92	P
COL11A1	1080.81	P	758.03	P	108.02	P	1179.99	P	735.17	P	107.13	P
FLJ23191	333.12	P	273.20	P	50.00	P	221.06	P	349.03	P	50.00	P
RGC32	260.75	P	336.02	P	50.00	P	283.66	P	294.60	P	50.00	P
PRKCH	383.43	P	320.94	P	57.62	P	442.25	P	343.43	P	50.00	P
HOXA9	341.98	P	205.46	P	68.62	P	249.20	P	232.28	P	50.00	P
HOXA9	341.98	P	205.46	P	68.62	P	249.20	P	232.28	P	50.00	P
LOC16129	810.13	P	567.59	P	50.00	P	1081.76	P	555.40	P	50.00	P
TCF4	405.79	P	341.44	P	50.00	P	644.50	P	392.27	P	58.04	P
TCF4	194.59	P	154.42	P	50.00	A	295.29	P	151.46	P	50.00	A
DCN	157.92	P	187.14	P	50.00	P	237.50	P	146.98	P	76.76	P
VEGFC	245.06	P	279.87	P	50.00	P	308.44	P	275.41	P	50.00	P
COL11A1	963.96	P	898.12	P	92.98	P	1196.10	P	802.29	P	99.27	P
TCF4	186.41	P	138.59	P	50.00	P	227.57	P	159.56	P	50.00	P
MAB21L1	223.92	P	204.96	P	50.00	A	217.44	P	115.63	P	50.00	M
SLC23A2	185.43	P	193.75	P	121.27	P	274.65	P	161.53	P	50.00	P

Figure 17 (suite)

Figure 17 La représentation du patron d'expression des gènes de modèles développés à partir de la lignée TOV112D. Les gènes ont été sélectionnés par une analyse au niveau de la variation différentielle de leur expression. Les signaux des gènes sélectionnés sont soit au moins quatre fois surexprimés par rapport au sphéroïde ou encore au moins trois fois sous-exprimés par rapport au sphéroïde. En rouge on observe les gènes qui sont surexprimés et en vert les gènes sous-exprimés par rapport à l'expression moyenne du même gène dans tous les échantillons.

3.3 Les coupes histologiques

Parallèlement à nos études sur les profils d'expression des différents modèles dérivés des trois lignées cellulaires, nous avons également effectué des coupes histologiques de nos modèles sphéroïdes. Les coupes histologiques ont été effectuées pour les sphéroïdes développés à partir des lignées OV90 et TOV112D puisque c'est seulement avec ces deux lignées que nous étions en mesure de générer des sphéroïdes assez solides et compacts pour qu'ils retiennent leur structure lors du protocole de la mise en paraffine. La première observation des coupes histologiques de sphéroïdes nous a permis de constater que même s'ils semblent avoir une apparence externe identique leurs structures sont quelque peu différentes à l'intérieur. Nous avons donc comparé les coupes histologiques de sphéroïdes colorés à l'hématoxyline-éosine avec les coupes histologiques de tissus correspondants. En effet, la structure interne des sphéroïdes ressemble à celle des tissus correspondants. Ainsi, dans le cas de la lignée OV90 [(figure 19 A) et B)], on peut voir que comme dans le cas du tissu les cellules sont un peu plus grosses et moins compactes que dans le cas de la lignée TOV112D. De plus, nous avons également pu observer qu'à l'intérieur du sphéroïde les cellules ne sont pas toutes identiques. En effet, les cellules en périphérie du sphéroïde semblent plus petites et compactes que dans les régions centrales de ce modèle.

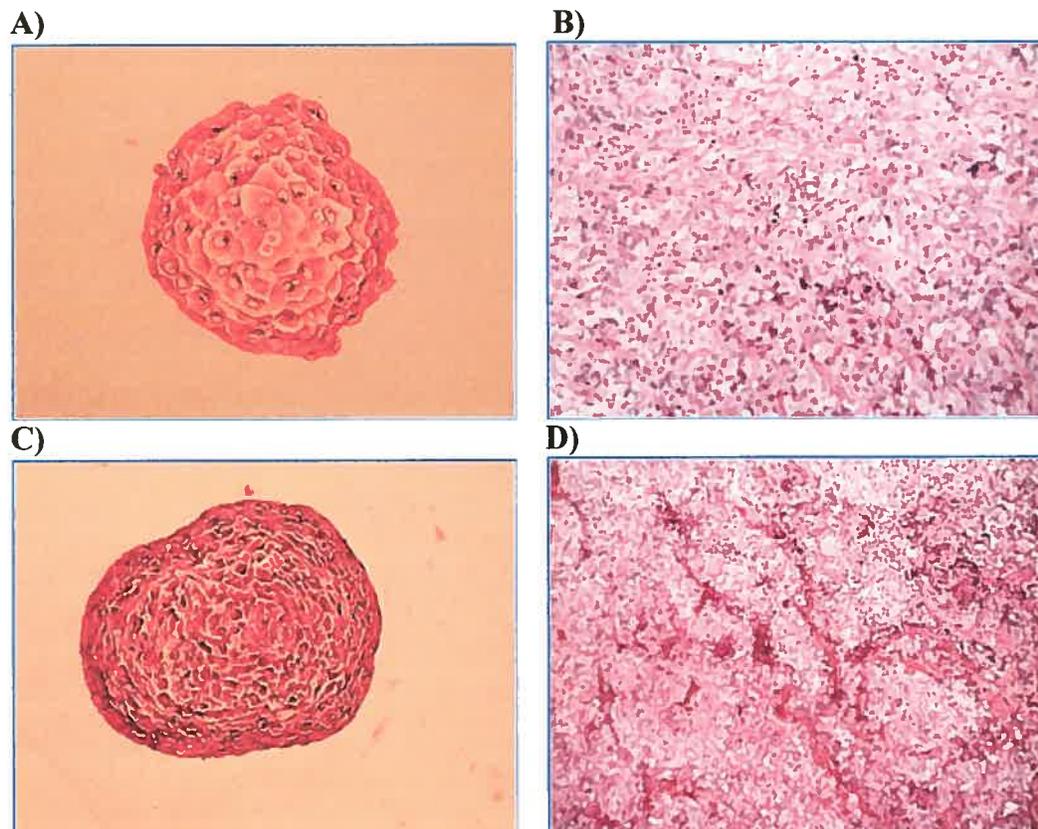


Figure 18

Figure 18 Comparaison morphologique des coupes histologiques du modèle sphéroïde et du modèle xéno greffe chez la souris. En A) et B) coupes histologiques du sphéroïde de la lignée OV90 ainsi que de la xéno greffe chez la souris Nu respectivement, colorées à l'hématoxyline éosine. En C) et D) coupes histologiques du sphéroïde de la lignée TOV112D et de la xéno greffe chez la souris Nu respectivement, colorées également à l'hématoxyline-éosine.

Suite à une première observation de coupes histologiques des sphéroïdes, nous avons procédé aux études d'immunohistochimie en commençant par la lignée TOV112D. Nous avons tout d'abord utilisé l'anticorps dirigé contre le PCNA (prolifération cell nuclear antigen). Cet anticorps devait nous servir de contrôle en plus de nous permettre d'observer les cellules en prolifération à l'intérieur du sphéroïde. Nous avons pu observer pour les sphéroïdes de la lignée TOV112D, que les cellules en prolifération sont un peu moins nombreuses au centre du sphéroïde qu'en périphérie.

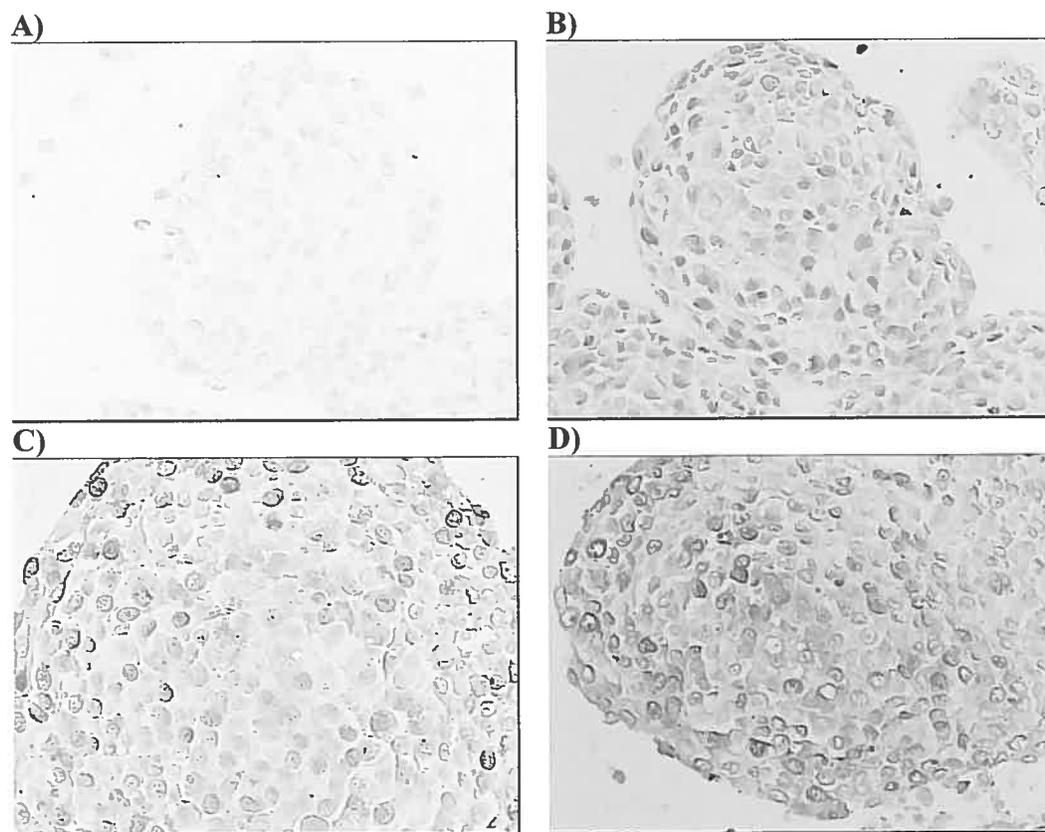


Figure 19

Figure 19 Coupes histologiques des sphéroïdes de la lignée TOV112D. En A) contrôle coloré seulement à l'hématoxyline. En B), C), D) sphéroïdes au jour 5, 11 et 13 respectivement où la coloration brune est le résultat d'une détection de l'antigène PCNA (prolifération cell nuclear antigen). La coloration est bien nucléaire ce qui indique qu'il y a réplication d'ADN et donc prolifération à l'intérieur des sphéroïdes. Au jours 11 et 13 (en C) et D)), la coloration semble moins intense au centre du sphéroïde qu'en périphérie.

3.4 Les transfections avec des protéines fluorescentes

Nous avons également transfecté nos trois lignées avec des protéines fluorescentes soit la GFP (green fluorescent protein) et la pHcRED (protéine fluorescente rouge). Les transfections ont été réussies seulement dans le cas des lignées TOV112D et OV90. De plus, les cellules transfectées provenant de populations mixtes ont été capables de former des sphéroïdes ce qui ne fut pas toujours le cas pour certains clones des transfections effectuées avec la GFP. Les transfections à l'aide de protéines fluorescentes ont été effectuées dans le but d'éventuelles études de co-cultures de cellules tumorales avec des cellules normales du stroma ou encore épithéliales sous forme de sphéroïdes.

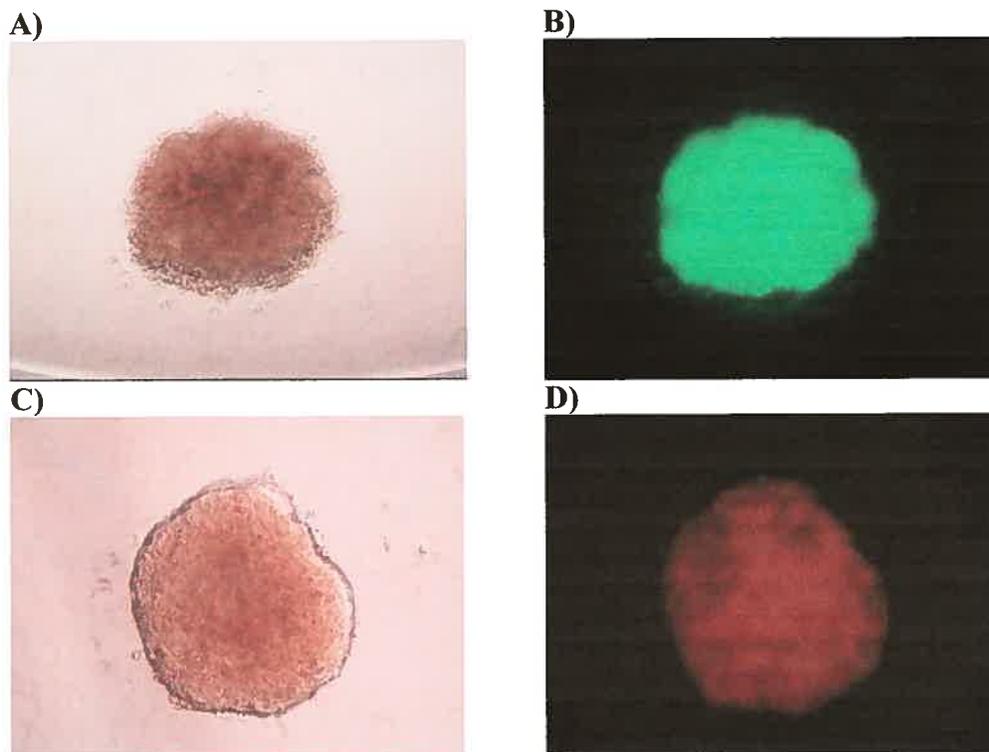


Figure 20

Figure 20 Sphéroïdes de la lignée TOV112D transfectés avec une protéine fluorescente verte soit la GFP ainsi qu'avec une protéine fluorescente rouge soit la pHcRED. En A) sphéroïde observé à la lumière blanche et en B) le même sphéroïde observé sous une longueur d'onde 500nm. En C) sphéroïde observé sous une lumière blanche et en D) le même sphéroïde observé sous une longueur d'ondes 580nm. Le grossissement est de 100x dans tous les cas.

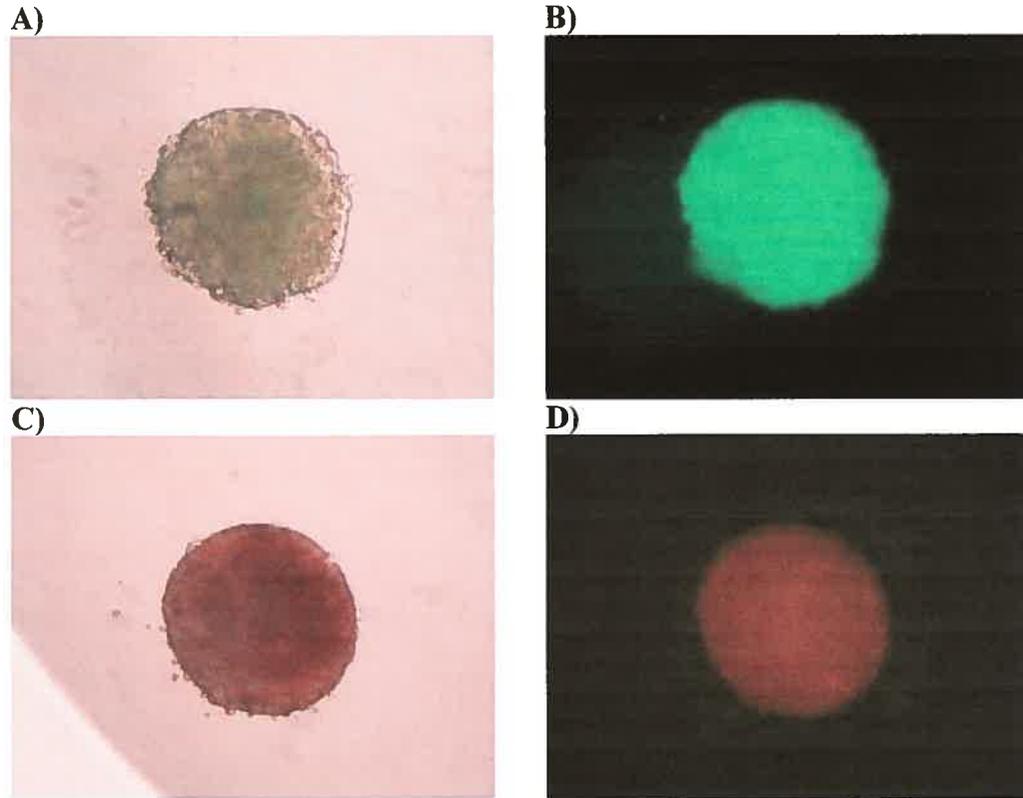


Figure 21

Figure 21 Sphéroïdes de la lignée OV90 transfectés avec une protéine fluorescente verte soit la GFP ainsi qu'avec une protéine fluorescente rouge soit la pHcRED. En A) sphéroïde observé à la lumière blanche et en B) le même sphéroïde observé sous une longueur d'onde 500nm. En C) sphéroïde observé sous une lumière blanche et en D) le même sphéroïde observé sous une longueur d'ondes 580nm. Le grossissement est de 100x dans tous les cas.

3.5 Étude préliminaire de l'impact des sérums et ascites sur le sphéroïde

Finally, nous avons également utilisé notre modèle sphéroïde dans une étude préliminaire sur l'influence du sérum ainsi que d'ascite sur la formation du sphéroïde. Nous savons que le sérum bovin possède plusieurs facteurs de croissance qui sont essentiels aux cellules en culture. Nous avons donc voulu vérifier l'impact de l'absence de sérum sur la formation des sphéroïdes. De plus, comme l'ascite est un liquide inflammatoire volumineux qui se forme dans certains cas du cancer de l'ovaire et que dans ce liquide on retrouve entre autres des facteurs de croissance et des protéines, nous avons voulu vérifier comment l'ascite peut influencer la formation des sphéroïdes lorsqu'il remplace le sérum bovin. Nous avons pu observer que le sphéroïde ne peut se compacter en absence de sérum cependant, la portion non cellulaire d'un ascite que nous avons utilisé semble être en mesure de remplacer la nécessité du sérum pour la formation du sphéroïde. Dans le cas de la lignée TOV21G, l'ascite semble même aider à la formation d'un sphéroïde plus compact et gros qu'avec le sérum.

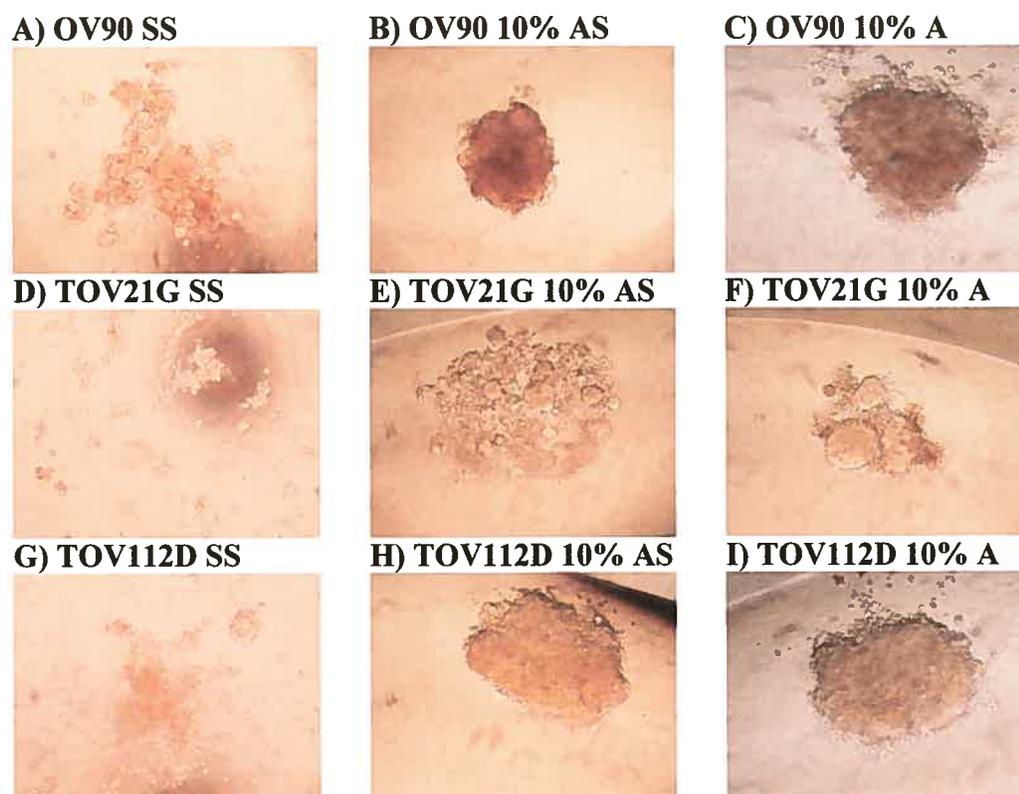


Figure 22

Figure 22 Représentation de l'effet du sérum et de l'ascite sur la formation des sphéroïdes. En A), D) et G) les lignées OV90, TOV21G et TOV112D respectivement misent en culture sous forme de gouttelettes inversées en absence de sérum. En B), E) et H) les lignées OV90, TOV21G et TOV112D respectivement misent en culture sous forme de gouttelettes inversées en présence de 10% de sérum. En C), F) et I) les lignées OV90, TOV21G et TOV112D respectivement misent en culture sous forme de gouttelettes inversées en présence de 10% d'ascite. (SS= sans sérum, AS= avec sérum, A= avec ascite).

4.0 DISCUSSION

4.0 Discussion

Les lignées cellulaires de cancer épithélial de l'ovaire sont un outil pratique pour la recherche en biologie moléculaire et cellulaire. Cependant, les variations affectant l'expression des gènes de cellules en culture, par comparaison aux cellules de la tumeur d'origine, ne sont pas encore bien élucidées. Nous avons donc développé un nouveau modèle tridimensionnel (3D) de culture *in vitro* afin d'évaluer si nous pouvions reproduire ainsi, par certains aspects, les conditions de croissance des tumeurs humaines *in vivo*. Ainsi, nous espérons contribuer à une meilleure compréhension des événements moléculaires associés à l'initiation et/ou la progression du cancer épithélial de l'ovaire.

4.1 Les modèles

Nous avons choisi comme matériel de départ pour notre étude trois lignées de cancer épithélial de l'ovaire développées antérieurement au laboratoire. Ces lignées ont des avantages importants par rapport aux lignées commerciales, le plus important étant le fait qu'elles proviennent de patientes qui n'ont subi aucune chimiothérapie ni radiothérapie avant les prélèvements d'échantillons. Ceci est un point capital pour nous, étant donné que nous voulions étudier les profils d'expression génique de différents modèles, puisque les lignées cellulaires utilisées n'ont pas subi de changements génétiques qui pouvaient être induits dans le cas où la lignée proviendrait de patiente ayant subi des traitements potentiellement mutagéniques. Un autre avantage important de nos lignées de cancer épithélial de l'ovaire est le fait que nous possédons toutes les données cliniques sur les patientes dont elles proviennent. En effet, cela nous permet de

mieux caractériser nos lignées que les lignées commerciales où souvent on ne connaît même pas le type de cancer duquel elles proviennent. En connaissant les origines de nos lignées cellulaires, on peut donc mieux interpréter nos résultats. Par exemple, nous savons que la lignée OV90 provient des cellules tumorales retrouvées dans l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome et que les cellules tumorales de l'ascite s'y retrouve souvent sous forme de sphéroïdes [51, 52]. Ainsi, nous pouvons supposer que c'est possiblement la raison pour laquelle cette lignée est parmi celles qui ont le plus de facilité à former des sphéroïdes. La lignée TOV112D quant à elle provient d'un carcinome endométriode. Cette lignée représente donc un modèle intéressant puisque ce type de cancer est le deuxième le plus commun parmi les cancers ovariens [16]. De plus, la lignée TOV112D provient d'une patiente atteinte d'un cancer très agressif auquel elle n'a pu survivre que trois mois et comme les caractéristiques des cellules en culture reflètent souvent le pronostic de la patiente, cette lignée est une source d'informations sur cette maladie agressive. La lignée TOV21G provient d'un carcinome de cellules claires qui est une forme plus rare de cancer ovarien qui représente de 4 à 6% de toutes les tumeurs ovariennes [16]. De plus, par l'analyse du caryotype, nous avons pu observer que cette lignée contrairement aux deux autres ne présente pas un caryotype profondément altéré. En effet, la seule anomalie remarquée a été une trisomie au niveau du chromosome 10 [52]. Cette lignée est donc un exemple de cancer qui possède, au niveau moléculaire, certaines caractéristiques qui la rapprochent des cellules normales. Ces lignées sont donc un modèle très intéressant pour les études au niveau du cancer ovarien.

En plus de l'information clinique au sujet de ces lignées et de leur caractérisation moléculaire, des études de tumorigenicité ont également été effectuées au laboratoire sur les trois lignées cellulaires [52]. Les modèles xénogreffes ont donc été établis chez la souris Nu pour fin de comparaison. Nous avons développé tant le modèle xénogreffe sous-cutanée qu'intrapéritonéale dans le but de trouver des différences ou des ressemblances entre les modèles reliés surtout aux conditions *in vivo* versus *in vitro* sans biaiser nos résultats vers un modèle spécifique au site d'injection.

Pour le développement du modèle tridimensionnel, nous avons tout d'abord essayé un protocole auparavant décrit dans la littérature qui est la culture sur agarose. Cependant, ce type de culture ne convenait pas tout à fait au type d'étude que nous envisagions. Tout d'abord, en introduisant des conditions de culture *in vivo* différentes de celles de la monocouche nous introduisions également des facteurs qui pouvaient changer les profils d'expression génique et donc biaiser nos résultats. Ainsi, même si les cellules ne s'attachaient pas sur l'agarose, elles s'y déposaient et poussaient en contact avec celle-ci. Nos modèles étant dérivés d'une même lignée, nous supposons que les différences observées seraient subtiles et un facteur tel que la croissance en contact avec l'agarose pouvait introduire des différences géniques qui à ce moment là ne seraient qu'artefact. De plus, la croissance sur l'agarose pose plusieurs problèmes d'ordre technique. Tout d'abord, il y a la difficulté de prélever les sphéroïdes sans pour autant prélever l'agarose qui se trouve dans le fond du puits et qui peut ultérieurement affecter les extractions d'ARN. Ce facteur est très important puisque pour faire des études de profil d'expression génique nous avons besoin de

l'ARN de bonne qualité et en quantité suffisante. De plus, même si les cellules dans ces conditions de croissance semblaient faire des liens entre elles, les sphéroïdes ainsi formés ne sont jamais devenus très compacts ni sphériques. Ces sphéroïdes formaient plutôt une sorte de colonie qui poussait par dessus l'agarose et qui était de forme aplatie. Nous avons essayé de remédier à ce problème par l'utilisation d'agitateurs tridimensionnels qui aideraient les cellules à rester en suspension et créer des cultures réellement sphériques. Cependant, l'utilisation de tels agitateurs nous a mené à faire face à des problèmes de surchauffage des incubateurs et donc cette méthode exigerait des investissements très importants comme l'achat d'incubateurs adaptés pour ce genre de culture. Donc, pour s'affranchir de l'utilisation de l'agarose et des agitateurs tridimensionnels dans notre méthode de culture, nous avons développé une technique de culture de sphéroïdes dans les gouttelettes inversées. Cette méthode de culture présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes de culture de sphéroïdes. Tout d'abord, les cellules poussent dans le même milieu de culture que la lignée cellulaire d'origine, il n'y a donc pas d'introduction de facteurs autres qui pourraient influencer et biaiser le profil d'expression génique. De plus, les sphéroïdes obtenus ont bien une forme sphérique et une structure plus compacte que les sphéroïdes en culture sur l'agarose. La structure compacte des sphéroïdes peut jouer un rôle important dans notre étude puisqu'elle reproduit possiblement certaines caractéristiques des tissus *in vivo* comme par exemple un apport différentiel en nutriments et en oxygène au niveau des cellules au centre de la tumeur par rapport aux cellules en périphérie. Enfin, une fois formés les sphéroïdes sont facilement recueillis par un simple lavage et séparés du milieu par

centrifugation comme dans le cas des cellules cultivées en monocouches ce qui rend les extractions d'ARN plus faciles et efficaces. Nous avons également démontré que l'ARN obtenu à partir de ces sphéroïdes est de bonne qualité. Finalement, c'est une méthode rapide, économique et qui ne requièrent pas d'infrastructures complexes. Il faut souligner que cette méthode fut développée en parallèle dans un autre laboratoire et qu'elle semble également être applicable non seulement à nos trois lignées du cancer épithélial de l'ovaire mais également à un éventail plus large de types cellulaires [49].

4.2 Les analyses des profils géniques d'expression

Afin de vérifier notre hypothèse que de par sa structure un modèle tridimensionnel peut ressembler d'avantage à un modèle *in vivo* que le modèle monocouche, nous avons procédé à la validation de notre modèle par l'analyse des profils d'expression génique. Il est cependant important de souligner que les résultats obtenus servent surtout à tracer une tendance puisque le nombre d'échantillons que nous avons utilisés est inférieur au nombre d'échantillons nécessaires pour que nos résultats soient statistiquement fiables. Cependant, l'identification des gènes intéressants nous permettra de procéder à leur validation par des méthodes plus conventionnelles comme par exemple l'analyse de buvardage Northern ou le PCR en temps réel. Nous pourrions également opter pour l'augmentation de l'échantillonnage cependant, il est évident que cette option devient rapidement très coûteuse.

Nous avons donc tout d'abord comparé les profils géniques de nos différents modèles par deux analyses de types globales c'est-à-dire qui comparent

simultanément tous les gènes présents sur la biopuce. Nous avons donc utilisé la méthode de corrélation (qui mesure le degré d'association entre deux variables) et la méthode de regroupement de GeneSpring (qui associe ensemble des profils d'expression qui varient de façon similaire). Ces méthodes nous ont permis d'avoir une idée générale sur la variation au niveau des profils géniques. Ainsi, nous avons tout de suite pu constater que la lignée OV90 donnait les meilleurs résultats quant au modèle sphéroïde, au point de vue de similarité d'expression génique, entre le modèle monocouche et le modèle xénogreffe. De plus, par la méthode de regroupement de GeneSpring, on a pu observer que le sphéroïde de la lignée OV90 se rapproche d'avantage du modèle xénogreffe que du modèle monocouche. Comme nous l'avons mentionné auparavant, la lignée OV90 provient des cellules tumorales trouvées dans l'ascite. De plus, les cellules en suspension dans les ascites sont souvent trouvées sous forme de sphéroïdes plutôt que sous forme de cellules dispersées [51]. Ainsi, le fait de remettre les cellules de la lignée OV90 en sphéroïdes dans les gouttelettes inversées permet possiblement aux cellules de retrouver un état qui leur est plus familier. Nous avons donc ensuite procédé à une analyse plus poussée des profils géniques des modèles développés à partir de la lignée OV90 afin d'identifier des gènes que nous pourrions considérer comme des gènes candidats c'est-à-dire, surtout des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle xénogreffe mais, aussi des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche ou encore qui sont spécifiques au modèle 3D. Les gènes exprimés de façon similaire dans le sphéroïde ainsi que dans la xénogreffe sont les plus intéressants puisqu'en trouvant de tels gènes, nous aurons des candidats qui désormais pourront être

étudiés dans un système *in vitro* sans devoir faire appel à un système *in vivo* complexe. Nous avons donc utilisé la méthode de comparaison de l'expression différentielle («fold change») des gènes afin de trouver les candidats. Nous avons décidé de nous limiter aux gènes dont le signal d'expression est quatre fois surexprimé et trois fois sous-exprimé par rapport au signal d'expression du modèle sphéroïde. Nous avons opté pour ces paramètres afin d'obtenir un nombre relativement raisonnable de gènes en plus de sélectionner des gènes plus significatifs (la méthode étant plus stringente). Plusieurs dizaines de gènes ont été ainsi identifiés et ensuite triés pour déterminer la façon dont ils varient au niveau des différents modèles. Nous nous sommes servis de l'outil DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) afin d'identifier les noms ainsi que les fonctions générales des gènes candidats. Une lecture plus approfondie des publications disponibles nous a permis de cerner et identifier de façon plus poussée les fonctions des gènes les plus intéressants. De plus, il est important de souligner que DAVID nous donne un aperçu général de la fonction des gènes et qu'en étudiant plus attentivement ces gènes on réalise très rapidement que la plupart des gènes jouent plusieurs fonctions et sont souvent pléiotropiques. Il sera donc intéressant ultérieurement d'étudier ces gènes au niveau des voies de signalisation ainsi qu'au niveau des différents partenaires d'interactions qu'ils peuvent avoir.

Parmi les gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle xénogreffe, nous avons identifié plusieurs gènes d'intérêt. Nous avons trouvé entre autres des gènes qui jouent un rôle au niveau de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire de la plupart des cellules épithéliales est composée

principalement de laminines et de collagènes (surtout de type IV). Cependant, cette matrice peut être également composée de molécules telles que BSP (bone sialoprotein), ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcin, fibronectine, vitronectine et thrombospondine [53]. La matrice extracellulaire sert surtout de support aux cellules mais, 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. De plus, la matrice extracellulaire influence la fonction cellulaire par la présence de facteurs de croissance, des cytokines et des protéases qui interagissent avec des molécules à la surface des cellules. Ainsi les protéines de la matrice extracellulaire jouent un rôle important au niveau de la tumorigenèse en régulant la croissance et la fonction cellulaire [54].

Parmi les gènes de la matrice extracellulaire les plus intéressants que nous avons identifiés dans les profils d'expression génique qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle xéno greffe, on retrouve la thrombospondine, le CSPG2 (versican), ITIH2 (inter-alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 2) et HABP2 (hyaluronic acid-binding protein2). Alors que les deux premiers gènes sont sous-exprimés dans le sphéroïde et les xéno greffes, les deux derniers sont surexprimés.

Les gènes ITIH2 et HABP2 jouent un rôle au niveau de la stabilisation de la matrice extracellulaire. De plus, ils font partie des gènes qui codent pour une protéine qui lie l'acide hyaluronique qui lui promouvoit la motilité, l'adhésion et la prolifération cellulaire [55]. La thrombospondine possède entre autre l'habilité d'inhiber l'angiogenèse. Ainsi, on pourrait croire qu'en étant inhibée au niveau des tumeurs elle peut contribuer à cette dernière. De plus, la thrombospondine,

contrairement aux autres molécules de la matrice extracellulaire, promouvoit une de-adhésion cellulaire ce qui peut représenter une autre raison pourquoi les cellules tumorales pourraient la maintenir dans un état sous-exprimé [56]. Le versican quant à lui régule l'adhésion et la survie cellulaire, la prolifération, la migration cellulaire ainsi que l'assemblage de la matrice extracellulaire [57]. Certaines études démontrent que le versican a des propriétés anti-adhésive et donc un peu comme la thrombospondine en étant sous-exprimé il pourrait promouvoir l'adhésion [58-61]. De nombreux rôles que jouent le versican au niveau du comportement cellulaire font de ce gène un candidat intéressant mais à la fois complexe à analyser puisque ses nombreux rôles suggèrent de nombreuses interactions.

En plus de ces gènes de la matrice extracellulaire sous-exprimés au niveau de nos modèles sphéroïdes et xénogreffes, nous avons observé que plusieurs gènes impliqués au niveau de la structure et de l'adhésion cellulaire sont également sous-exprimés dans ces modèles. Parmi ces gènes on retrouve la fibronectine 1, la cadhérine 6, la villine et les MARCKS. La perte de l'expression de ces gènes peut être une indication que les cellules de nos modèles sphéroïdes et xénogreffes sont devenues possiblement plus agressives et invasives puisqu'il a été démontré que la perte de fonctions adhésives trouvées au niveau de cellules normales engendre ce type de comportement cellulaire [17].

Un autre gène d'intérêt que nous avons identifié est la PECAM1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1). Ce gène est particulièrement intéressant puisqu'il est surexprimé dans nos modèles sphéroïde et xénogreffes et que son expression est normalement restreinte aux cellules du système vasculaire [62].

Bien que nous ne puissions pas observer la formation de vaisseaux sanguins au niveau de nos modèles sphéroïde et xénogreffes, l'expression de ce gène peut indiquer qu'ils commencent à produire des signaux d'angiogenèse. Ces signaux pourraient possiblement être induits du aux phénomènes d'hypoxie et de manque de nutriments qui pourraient avoir lieu au centre des sphéroïdes et des xénogreffes. Nous espérons investiguer d'avantage la possibilité de formation de vaisseaux ou des structures leur ressemblant au niveau des sphéroïdes par des études de co-culture avec des cellules endothéliales.

Finalement, nous avons également trouvé intéressants les gènes codant pour la S100A6 (S100 calcium-binding protein A6), la MSMB (microseminoprotein beta) et ENO1 (enolase 1). Ces gènes jouent différents rôles au niveau de l'adhésion [63-65]. Mais, les produits de ces gènes sont également souvent considérés comme des marqueurs de la progression tumorale [65-67]. Leur surexpression est associée avec des maladies plus avancées et agressives. Comme nos modèles sont tous développés à partir d'une lignée cellulaire, une surexpression des marqueurs de progression tumorale signifierait que la lignée en monocouche est moins agressive qu'en sphéroïde ou encore en xénogrefe. Nous croyons que la surexpression de ces marqueurs peut possiblement être une réflexion d'un micro environnement qui promouvoit une progression tumorale et permet aux cellules de devenir plus agressives. Des études de tumorigenicité dans les souris en parallèle entre les lignées cellulaires et les mêmes lignées mais injectées sous forme de sphéroïdes seraient donc très intéressantes.

En analysant attentivement le profil d'expression qui rapproche le modèle sphéroïde du modèle xénogrefe, nous avons observé que ce type de profil peut

être retrouvé également auprès de certaines familles de gènes telles que certaines chémokines ainsi que certains gènes codant pour des protéines du choc thermique. Ainsi, les chémokines sont une famille de cytokines pro-inflammatoires qui lient les récepteurs couplés aux protéines G. De plus, leur fonction première est d'attirer et activer certains leucocytes dans les réponses immuno-inflammatoires. Cependant, il faut souligner que les chémokines sont aussi impliquées dans toutes les étapes du développement tumoral soit l'initiation, la croissance et la progression. Elles sont également impliquées au niveau du cancer dans la transformation cellulaire et de l'angiogenèse. Dans le cas de notre étude, les chémokines modulées sont de la famille des chémokines CXC qui ont un résidu acide aminé entre les deux premiers résidus cystéines. De plus, c'est cette famille de chémokines qui est le plus souvent retrouvée modulée au niveau des différents cancers dont le cancer de l'ovaire. Les chémokines CXCL1-2-3 sont également considérées comme des oncogènes reliés à la croissance [68]. En plus des chémokines, certaines protéines du choc thermique sont également modulées de façon à rapprocher le modèle sphéroïde du modèle xéno greffe. Les protéines du choc thermique sont des protéines de stress qui sont un mécanisme de défense des cellules. Elles sont nécessaires pour éviter l'accumulation de protéines endommagées et pour aider leur repliement suite au stress [69]. Les protéines du choc thermique agissent également comme chaperonnes dans le transport de molécules entre différents compartiments cellulaires. La modulation des protéines telles que les protéines du choc thermique peut être une indication que les cellules du modèle sphéroïde ainsi que du modèle xéno greffe subissent un plus grand stress que celles en monocouche. Il est en effet possible que les cellules à

l'intérieur des modèles tridimensionnels font face aux certains stress comme l'hypoxie, le manque de facteurs de croissance ou de nutriments nécessaires à leur survie ce qui n'est pas le cas des cellules en monocouche qui ont toutes un accès égale à ces éléments.

Ainsi, nous pouvons voir que les gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle xéno greffe sont surtout des gènes reliés à la structure et à l'adhésion cellulaire mais également des gènes codant pour les protéines du stress. Cependant, plusieurs des gènes candidats intéressants possèdent des fonctions pléiotropiques et leur étude pourrait nous permettre d'aborder différents aspects de la tumorigenèse. Mais le résultat le plus intéressant de cette étude est le fait que nous retrouvons dans un système entièrement *in vitro* une expression similaire au système *in vivo*. Ainsi, le simple fait de placer les cellules dans un environnement permettant aux cellules de former des structures tridimensionnelles peut par certains aspects reproduire potentiellement ce qui se passe *in vivo*.

Évidemment, il ne faut pas oublier que notre modèle sphéroïde provenant de la lignée cellulaire va avoir certaines similarités avec celle-ci. Le modèle sphéroïde reste un modèle *in vitro* et il ne peut certainement pas reproduire toutes les caractéristiques de la situation *in vivo*. Ainsi, nous avons également trouvé des gènes qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche pour la lignée OV90. Ces gènes semblent être surtout reliés au métabolisme et à la structure cellulaire. Ce rapprochement est probablement dû au fait que les cellules de ces deux modèles se retrouvent dans un même milieu de culture (ce qui n'est pas le cas des cellules *in vivo*) et que leur environnement est beaucoup moins diversifié que celui des cellules injectées dans les souris. Ainsi, nous ne sommes pas surpris

de voir parmi les gènes modulés des gènes impliqués dans la détoxification telle la carboxypeptidase 1, l'absorption des acides aminés comme le SLC3A1 (solute carrier family 3) et le métabolisme des lipides comme la PPAP2B (phosphatidic acid phosphatase type 2b) [70-72]. Parmi les gènes candidats nous avons également trouvé des gènes ayant une fonction, entre autres, structurale soit la MSN (moesin) et l'ARHGAP6 (GTPase-activating protein, rho, 6) [73, 74] ce qui est tout à fait attendu puisque la structure des cellules en monocouche est différente de cellules des modèles tridimensionnels.

Finalement, nous avons également trouvé des gènes qui sont spécifiques au modèle sphéroïde de la lignée OV90. Parmi ces gènes on en retrouve certains qui encore un fois possèdent des fonctions au niveau de l'adhésion cellulaire mais également des gènes impliqués au niveau de la structure (CDH1, MMP1, COL3A1) [75-77]. Tous ces gènes sont surexprimés dans le modèle sphéroïde par rapport à tous les autres modèles.

Enfin, on peut voir de façon générale que les gènes modulés font surtout référence aux gènes impliqués au niveau structural c'est-à-dire, au niveau de la matrice extracellulaire où les facteurs qui interagissent avec elle ou encore au niveau structural de la cellule même et de l'adhésion cellulaire. Cependant, il est intéressant de souligner que pour la lignée OV90 nous sommes capables de trouver un profil d'expression génique qui rapproche le modèle sphéroïde du modèle xéno greffe et qu'en plus, plusieurs gènes impliqués dans la tumorigenèse font parti des gènes candidats identifiés.

Parallèlement à l'analyse des profils géniques de la lignée OV90, nous avons également effectué l'analyse des profils géniques des lignées TOV21G et

TOV112D. Les analyses de corrélation et de regroupement par GeneSpring, contrairement à la lignée OV90, n'ont pas démontré que le modèle sphéroïde se situait au point de vue de similarité entre le modèle monocouche et le modèle xénogreffe. Cependant, l'analyse des profils géniques des ces deux lignées nous a permis de les analyser plus en profondeur. Ainsi, nous étions capables dans le cas de la lignée TOV21G de ressortir des profils d'expression génique qui comme dans le cas de la lignée OV90 soit rapprochaient le modèle sphéroïde du modèle xénogreffe, soit rapprochaient le modèle sphéroïde du modèle monocouche ou étaient spécifiques au modèle sphéroïde. Le nombre de gènes identifiés au niveau de ces profils n'est pas aussi important que pour la lignée OV90 et les gènes candidats sont surtout reliés à l'activité catalytique et au transport cellulaire. De plus, aucun gène candidat retrouvé dans le profil d'expression génique qui rapproche le modèle sphéroïde du modèle xénogreffe de la lignée TOV21G n'est retrouvé dans le profil équivalent de la lignée OV90. Cependant, deux gènes des profils qui rapprochent le modèle sphéroïde du modèle monocouche sont retrouvés tant dans la lignée OV90 que dans la lignée TOV21G. Ces gènes sont ApoE (apolipoprotein E) et HBE1 (hemoglobin epsilon locus). Les deux gènes ont une fonction entre autres au niveau du transport et du métabolisme cellulaire. L'apolipoprotéine E possède plusieurs fonctions incluant le métabolisme des lipides, le transport du cholestérol, la réparation de tissus, la réponse immunitaire, la régulation, la croissance et la différenciation [78]. Cette protéine est surtout connue pour être impliquée dans la maladie d'Alzheimer [79] mais, elle a été également associée aux différents cancers comme entre autres le cancer du colon [80] et le cancer du sein [78]. De plus, l'apolipoprotéine E a été trouvée

surexprimée dans le cancer épithélial de l'ovaire [81] et peut donc être potentiellement un candidat intéressant surtout si on souligne le fait qu'on la retrouve modulée de façon similaire dans deux lignées. Le HBE1 quant à lui est un des locus qui codent pour l'hémoglobine et il a surtout été étudié au niveau de son implication dans la maladie de Sickle cell anemia [82]. L'hémoglobine est responsable du transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans l'organisme. On ne connaît pas son implication au niveau du cancer épithélial de l'ovaire. Les autres gènes identifiés dans différents profils de la lignée TOV21G semblent surtout avoir des fonctions au niveau de l'activité catalytique et du transport cellulaire.

Dans le cas de la lignée TOV112D, nous n'avons pas réussi à identifier des profils d'expression génique qui pourraient être spécifiques à l'un ou l'autre des modèles ou groupes de modèles. En fait, plusieurs gènes sont modulés mais, nous n'avons pas réussi à identifier un patron logique dans les profils d'expression de ces gènes. Par l'analyse de regroupement de GeneSpring, on peut observer que les échantillons semblent être reliés ensemble de façon temporelle. Les lignées dérivées des xénogreffes sont au passage 5 et donc temporellement très proches de ces dernières. Elles sont reliées ensemble avec leur xénogreffes respectives. La lignée de départ ainsi que le sphéroïde sont à part. La lignée TOV112D semble être très prompte à subir des changements plus importants selon les conditions dans lesquelles elle se trouve.

Nous avons également cherché des gènes communs modulés dans les trois lignées cellulaires. Ainsi, nous avons trouvé sept gènes qui sont modulés dans la lignée TOV112D et qui sont également modulés dans l'une ou l'autre des deux

lignées précédentes. Ces gènes sont CYR61 (cysteine-rich, angiotensine inducer 61), FN1 (fibronectin 1), MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase c substrate), HMOX1 (heme oxygenase 1) et trois MT (metallothionein) différentes.

TOV112D	OV90	TOV21G
	APOE	APOE
CYR61	CYR61	
CYR61	CYR61	
FN1	FN1	
MARCKS	MARCKS	
	HBE1	HBE1
HMOX1		HMOX1
MT1H	MT1H	MT1F
MT1X	MT1X	
MT2A	MT2A	

Tableau VI

Tableau VI récapitulant les gènes candidats retrouvés en commun au moins dans deux lignées différentes. En rouge, gènes communs à la lignée TOV112D et la lignées OV90. En bleu gènes communs à la lignée OV90 et la lignée TOV21G. En mauve les gènes communs à la lignée TOV112D et la lignée TOV21G. En vert gène de la lignée TOV21G de la même famille que les gènes communs pour la lignée TOV112D et OV90.

Nous pouvons observer qu'il y a plus de gènes communs entre la lignée TOV112D et la lignée OV90 qu'entre la lignée TOV112D et la lignée TOV21G. Ceci peut être dû au fait que la lignée TOV21G est dérivée d'un cancer de cellules claires qui est une maladie ovarienne assez rare et qui au niveau moléculaire est très différente des autres lignées. De plus, l'apparence morphologique des

sphéroïdes dérivés des lignées TOV112D et OV90 est très semblable présentant des sphéroïdes très compacts et arrondis contrairement aux sphéroïdes dérivés de la lignée TOV21G où on peut parler davantage d'apparence morphologique sous forme d'agrégats de cellules. Parmi les sept gènes identifiés dans au moins deux des trois lignées, cinq sont probablement plus intéressants puisqu'ils sont modulés de façon similaire d'une lignée à l'autre. Ainsi, les gènes CYR61, FN1 et les trois MT sont tous des gènes qui font partie du profil qui rapproche le modèle sphéroïde du modèle xéno greffe et qui sont sous-exprimés dans ces modèles dans le cas des lignées OV90 et TOV112D. Ces gènes sont également très intéressants au niveau de leurs fonctions. Ainsi, le gène CYR61 code pour une protéine de signalisation sécrétée et associée à la matrice extracellulaire. De plus, CYR61 promouvait la prolifération cellulaire, la migration et l'adhésion [83] en plus d'être un facteur angiogénique [84]. La FN1 comme discuté plutôt dans la discussion, est un candidat intéressant dû à son implication au niveau de la matrice extracellulaire ainsi qu'au niveau de la structure et l'adhésion cellulaire. La FN1 est un gène qui code pour une protéine dont les fonctions affectent plusieurs aspects cellulaires comme entre autres la prolifération cellulaire et ce gène peut être également intéressant au niveau de ses partenaires d'interactions [85, 86]. La perte ou la sous-expression de ce gène peut être intéressante surtout au niveau du rôle que joue la fibronectine dans l'adhésion cellulaire. La perte ou la diminution de cette dernière peut possiblement influencer le comportement cellulaire en rendant les cellules plus agressives ou invasives.

Finalement, les candidats les plus intéressants sont certainement les gènes codant pour les métallothionéines. La famille des métallothionéines est une

famille de protéines qui ont une grande affinité pour les ions de métaux. Ces protéines sont impliquées au niveau de plusieurs processus pathophysiologiques incluant l'homéostasie des ions de métaux, la détoxification, la protection contre les dommages oxydatifs, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la résistance aux drogues et à la radiothérapie et plusieurs autres aspects de la carcinogénèse. L'expression des méthallothionéines est souvent modulée au niveau des différents types de cancer épithélial de l'ovaire suggérant un rôle possible dans la tumorigénèse ovarienne [87]. Les métallothionéines semblent également jouer un rôle au niveau de la résistance des cancers ovariens aux traitements de chimiothérapie. En effet, elles codent pour des protéines thiols qui pourraient être impliquées au niveau de la résistance des cellules cancéreuses aux agents alkylants et le cisplatine [88]. Certaines études démontrent également une corrélation entre l'expression des métallothionéines et la progression tumorale ovarienne suggérant une implication de ces molécules dans la progression de la malignité tumorale ovarienne [47, 48]. Enfin, les métallothionéines sont également régulées par l'oxygène [89] et la présence possible de cellules hypoxiques au centre des modèles tridimensionnels et surtout sphéroïde peut influencer l'expression de ces métallothionéines. Ces dernières semblent donc être impliquée à plusieurs niveaux dans la tumorigénèse ovarienne ce qui en fait un candidat des plus intéressants. De plus, il est important de souligner que les gènes codant pour les différentes métallothionéines ont été retrouvés modulés au niveau de toutes les trois lignées cellulaires.

Il est évident que plusieurs autres études doivent être effectuées afin de valider la pertinence de nos résultats. Cependant, la tendance observée est

encourageante. Un des principaux défauts de notre étude est le petit échantillonnage que nous avons utilisé pour l'étude des profils géniques. Afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables au niveau des gènes candidats, nous pourrions augmenter le nombre d'échantillons pour chaque catégorie de modèles. Nous essayons également de valider les gènes candidats les plus intéressants par la méthode de PCR en temps réel. De plus, comme plusieurs gènes possèdent de nombreuses fonctions et que souvent ces gènes peuvent interagir entre eux au niveau des différentes voies de signalisation, il sera intéressant d'étudier ces dernières et ainsi de créer des liens entre les gènes. Nous pourrions ainsi mieux comprendre leurs fonctions spécifiques dans la tumorigenèse ovarienne.

Un autre moyen de valider et étudier le comportement des gènes candidats et des différents phénomènes impliqués dans la tumorigenèse ovarienne au niveau du nouveau modèle sphéroïde du cancer épithélial de l'ovaire est l'étude d'immunohistochimie. Il est important de souligner que les études de génomique doivent souvent être accompagnés des études au niveau des protéines. Des changements au niveau de l'ARN ne sont pas toujours évidents ou présents au niveau de l'expression de ces dernières. Comme le modèle sphéroïde du cancer épithélial de l'ovaire généré par la méthode de culture en gouttelettes inversées est un modèle sans précédent, le protocole de fixation et de mise en blocs de paraffine exige une certaine mise au point. Ainsi, nous avons rencontré plusieurs difficultés lors de ces processus et nous nous concentrons donc à mettre au point un protocole optimal. Nous avons cependant réussi dans le cas de la lignée OV90 et TOV112D à obtenir quelques fois des coupes de sphéroïdes en paraffine d'assez bonne qualité pour effectuer certaines études d'immunohistochimie. De

plus, bien que la lignée OV90 provienne des cellules retrouvées dans un ascite, elle est capable de former des tumeurs solides dans les souris Nu. Ceci nous a permis de comparer la morphologie au niveau des coupes histologiques des sphéroïdes et des xénogreffes de cette lignée. Ainsi, nous avons tout d'abord coloré les sphéroïdes en coupes et les coupes des tissus xénogreffes correspondants à l'aide de l'hématoxyline-éosine. Nous avons pu observer que même si de l'extérieur les sphéroïdes de la lignée OV90 et TOV112D ont une morphologie très semblable, à l'intérieur l'aspect morphologique n'est pas similaire. Ainsi, les sphéroïdes de la lignée OV90 présentent des cellules plus grosses et moins compactes que celles du sphéroïde développé à partir de la lignée TOV112D. De plus, nous avons observé que cette tendance correspondait à la morphologie retrouvée au niveau des tissus respectifs. Ce résultat nous laisse croire encore une fois, que le sphéroïde peut potentiellement représenter un modèle qui reflète mieux par certains aspects ce qui se passe *in vivo* que le modèle monocouche. Nous avons également observé que les cellules à l'intérieur des sphéroïdes même n'ont pas toutes la même morphologie. Ainsi, les cellules semblent plus compactes et petites en périphérie du sphéroïde et moins denses et plus grosses au centre de celui-ci. Dans certains cas, nous avons également pu observer des espaces vides au centre des sphéroïdes (données non montrées) ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'à l'intérieur des sphéroïdes, comme dans le cas des tumeurs *in vivo*, il peut y avoir formation de noyaux hypoxiques et éventuellement nécrotiques. La mise en évidence de ces phénomènes à l'intérieur du modèle sphéroïde pourrait représenter un résultat important pour l'étude de la résistance tumorale aux certaines chimiothérapies et à la radiothérapie [90]. En

effet, en mettant en évidence la présence d'hypoxie à l'intérieur des sphéroïdes, nous pourrions éventuellement considérer ces derniers comme des modèles potentiels pour l'étude d'hypoxie au niveau du cancer épithélial de l'ovaire.

4.3 Immunohistochimie

Nous avons donc procédé aux études d'immunohistochimie sur les quelques échantillons des sphéroïdes de la lignée TOV112D que nous avons réussi à mettre en paraffine jusqu'à maintenant. Nous avons tout d'abord utilisé l'anticorps PCNA qui nous a servi de contrôle en plus de vérifier la prolifération à l'intérieur du sphéroïde. La coloration brune due à la détection de PCNA semblait être moins intense au centre du sphéroïde ce qui a renforcé notre hypothèse de noyaux hypoxiques. Nous avons donc essayé de détecter l'hypoxie à l'intérieur des sphéroïdes à l'aide de l'anticorps HIF1 α . Des résultats préliminaires nous indiquent la présence de quelques cellules au centre des sphéroïdes dont les noyaux ont été colorés à l'aide de cet anticorps et qui signifierait qu'il y a en effet un phénomène d'hypoxie (données non montrées). Cependant, nous faisons encore face à des difficultés de l'ordre technique qui ne nous ont pas permis de confirmer ce résultat avec certitude. Cette hypothèse reste donc à vérifier une fois que le protocole de mise en paraffine sera au point.

4.4 Transfections avec des protéines fluorescentes

Parallèlement à ces études, nous avons procédé aux transfections de nos trois lignées cellulaires avec des protéines fluorescentes. Le sphéroïde est composé uniquement d'un seul type de cellules. Il ne reproduit pas l'hétérogénéité

cellulaire que l'on retrouve *in vivo*. De plus, nous avons observé dans les profils d'expression génique que plusieurs gènes modulés sont des gènes impliqués au niveau de l'angiogenèse ainsi qu'au niveau de la matrice extracellulaire. Nous voulons donc ultérieurement 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. Ainsi, des co-cultures de ces cellules avec des cellules tumorales fluorescentes sous forme de sphéroïdes sont prévues dans nos objectifs ultérieurs.

4.5 Étude préliminaire (FBS et Ascite)

Finalement, nous avons également effectué une étude préliminaire sur l'influence de la concentration de sérum (FBS) ainsi que d'un ascite sur la formation des sphéroïdes. Nous avons tout d'abord cultivé des cellules en gouttelettes inversées dans les milieux OSE contenant différentes concentrations de sérum bovin (FBS). Nous avons observé qu'en absence de sérum il y avait absence de formation de sphéroïdes. De plus, dans certains cas comme pour la lignée OV90 seulement 1% de sérum fut suffisant pour compacter les cellules sous forme de sphéroïdes (données non montrées). Nous savons également que l'ascite est un liquide inflammatoire dont la portion non cellulaire peut contenir des facteurs de croissance. Cependant, on ne connaît pas sa composition exacte ou encore les facteurs présents au niveau des ascites et qui peuvent influencer le comportement cellulaire. Nous avons donc tenté la même expérience en utilisant différentes concentrations cette fois-ci de l'ascite. Nous avons observé que l'ascite même en absence de sérum peut induire la formation de sphéroïdes. De

plus, dans le cas de la lignée TOV21G l'ascite a même donné des sphéroïdes plus compacts qu'en présence de sérum. Les ascites provenant des femmes atteintes par une tumeur ovarienne peuvent être cependant très hétérogènes. Dans notre étude nous avons utilisé deux ascites qui influencent de façon opposée le comportement invasif des cellules d'une même lignée soit dans un cas stimulant l'invasion et dans l'autre l'inhibant. Nous avons observé que même si l'effet de ces deux ascites semblent être différents, ils ont le même effet sur la formation des sphéroïdes en gouttelettes inversées (données non montrées). Il semble donc que la portion non cellulaire des ascites peut combler certains des besoins des cellules et peut être même éventuellement remplacer l'utilisation du sérum bovin dans les milieux de culture. Cependant, la composition plus exacte et l'impact de l'ascite sur les cellules en culture doit être étudiée plus en profondeur.

4.6 Conclusion et perspectives

La disponibilité de modèles adéquats et adaptés au type de recherche que l'on veut mener est à la base de la majorité des études qui peuvent nous aider à mieux comprendre la tumorigenèse. L'importance donc de développer des modèles *in vitro* qui seront de plus en plus représentatifs de la situation *in vivo* ne peut être assez soulignée. Les lignées cellulaires sont un outil important dans les études sur le cancer cependant, elles font défaut au niveau de plusieurs aspects capitaux impliqués dans la tumorigenèse. Entre autres, elles ne tiennent pas compte de la croissance tridimensionnelle des tumeurs *in vivo* et de toutes les interactions cellulaires et processus que cela implique. Nous croyons que la méthode de culture de cellules tumorales sous forme de sphéroïdes en gouttelettes

inversées ainsi que certaines des caractérisations au niveau des modèles que nous avons effectuées, serviront de tremplin pour des études sur des modèles tridimensionnels de plus en plus poussées et sophistiquées. De plus, en validant ultérieurement les gènes candidats que nous avons identifiés au niveau du modèle sphéroïde, nous espérons mettre en évidence que le modèle sphéroïde peut réellement devenir un modèle *in vitro* fiable et représentatif de certains aspects du cancer épithélial de l'ovaire qu'autrement on ne pouvait étudié qu'*in vivo*. Nous espérons également par des études de co-culture introduire au niveau du sphéroïde une certaine hétérogénéité cellulaire que l'on retrouve souvent *in vivo*. Nous croyons que le potentiel de la culture tridimensionnel *in vivo* est important au niveau des études sur la tumorigenèse et que la méthode de culture que nous avons développée, en parallèle avec le groupe de Lars K. Nielsen et al, incitera d'autre 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 que l'on ne peut étudier dans le modèle monocouche. Nous croyons donc que le modèle sphéroïde représente un modèle *in vitro* qui a un grand potentiel surtout dans les études de développement et de prédiction du comportement tumoral en réponse à des nouvelles stratégies thérapeuthiques.

5.0 BIBLIOGRAPHIE

1. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 331-41.
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. Osborne, C., P. Wilson, and D. Tripathy, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. Oncologist, 2004. **9**(4): p. 361-77.
4. Knudson, A.G., *Antioncogenes and human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10914-21.
5. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, *Control of the cell cycle and apoptosis*. Eur J Cancer, 1999. **35**(14): p. 1886-94.
6. Motoyama, N. and K. Naka, *DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 11-6.
7. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 39-85.
8. 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.
9. Artandi, S.E., et al., *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 641-5.
10. Shannon, M., *An empathetic look at overweight*. CCL Family Found, 1993. **20**(3): p. 3, 5.
11. 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.
12. 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.
13. Shields, P.G., *Tobacco smoking, harm reduction, and biomarkers*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(19): p. 1435-44.
14. Chow, V.T., *Cancer and viruses*. Ann Acad Med Singapore, 1993. **22**(2): p. 163-9.

15. Cvetkovic, D., *Early events in ovarian oncogenesis*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**(1): p. 68.
16. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. *Cancer*, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
17. 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.
18. 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.
19. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 255-88.
20. Choi, K.C. and N. Auersperg, *The ovarian surface epithelium: simple source of a complex disease*. *Minerva Ginecol*, 2003. **55**(4): p. 297-314.
21. 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.
22. 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.
23. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* *Lancet*, 1971. **2**(7716): p. 163.
24. Fredrickson, T.N., *Ovarian tumors of the hen*. *Environ Health Perspect*, 1987. **73**: p. 35-51.
25. Preston-Martin, S., et al., *Increased cell division as a cause of human cancer*. *Cancer Res*, 1990. **50**(23): p. 7415-21.
26. 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.
27. Craven, R.A. and R.E. Banks, *Laser capture microdissection and proteomics: possibilities and limitation*. *Proteomics*, 2001. **1**(10): p. 1200-4.
28. Simone, N.L., et al., *Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis*. *Trends Genet*, 1998. **14**(7): p. 272-6.

29. Simone, N.L., et al., *Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics*. Mol Diagn, 2000. **5**(4): p. 301-7.
30. Fend, F. and M. Raffeld, *Laser capture microdissection in pathology*. J Clin Pathol, 2000. **53**(9): p. 666-72.
31. Curran, S., et al., *Laser capture microscopy*. Mol Pathol, 2000. **53**(2): p. 64-8.
32. 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.
33. Walsh, K.M. and J. Poteracki, *Spontaneous neoplasms in control Wistar rats*. Fundam Appl Toxicol, 1994. **22**(1): p. 65-72.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
38. 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.
39. 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.
40. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
41. 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.

42. Mueller-Klieser, W., *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. C1109-23.
43. Thiery, J.P. and D. Chopin, *Epithelial cell plasticity in development and tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 1999. **18**(1): p. 31-42.
44. Heppner, G.H. and F.R. Miller, *The cellular basis of tumor progression*. Int Rev Cytol, 1998. **177**: p. 1-56.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Augenlicht, L.H., et al., *Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro*. Cancer Res, 1987. **47**(22): p. 6017-21.
51. Burlison, K.M., et al., *Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(1): p. 170-81.
52. 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.
53. 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.
54. 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.

55. 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.
56. Bornstein, P. and E.H. Sage, *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 608-16.
57. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 617-23.
58. 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.
59. Yamagata, M., et al., *Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion*. J Cell Sci, 1993. **106** (Pt 1): p. 55-65.
60. Yamagata, M., et al., *Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 8012-8.
61. 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.
62. Ilan, N. and J.A. Madri, *PECAM-1: old friend, new partners*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 515-24.
63. Helfman, D.M., et al., *Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(10): p. 3097-112.
64. Kamada, M., et al., *beta-Microseminoprotein/prostatic secretory protein is a member of immunoglobulin binding factor family*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1388**(1): p. 101-10.
65. Pancholi, V., *Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(7): p. 902-20.
66. Weiber, H., et al., *Beta-microseminoprotein in gastric carcinoids: a marker of tumour progression*. Digestion, 1999. **60**(5): p. 440-8.
67. 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.

68. Arya, M., H.R. Patel, and M. Williamson, *Chemokines: key players in cancer*. *Curr Med Res Opin*, 2003. **19**(6): p. 557-64.
69. Falkowska-Podstawka, M. and A. Wernicki, *Choc termique proteins in health and disease*. *Pol J Vet Sci*, 2003. **6**(1): p. 61-70.
70. Satoh, T. and M. Hosokawa, *The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. **38**: p. 257-88.
71. Pras, E., et al., *Genomic organization of SLC3A1, a transporter gene mutated in cystinuria*. *Genomics*, 1996. **36**(1): p. 163-7.
72. Kai, M., et al., *Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): p. 24572-8.
73. Miller, K.G., *A role for moesin in polarity*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(4): p. 165-8.
74. Prakash, S.K., et al., *Functional analysis of ARHGAP6, a novel GTPase-activating protein for RhoA*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(4): p. 477-88.
75. Seiki, M., *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion*. *Cancer Lett*, 2003. **194**(1): p. 1-11.
76. Tapper, J., et al., *Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001. **128**(1): p. 1-6.
77. Berx, G., et al., *Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene*. *Hum Mutat*, 1998. **12**(4): p. 226-37.
78. Moore, R.J., R.M. Chamberlain, and F.R. Khuri, *Apolipoprotein E and the risk of breast cancer in African-American and non-Hispanic white women. A review*. *Oncology*, 2004. **66**(2): p. 79-93.
79. Smalheiser, N.R., *Proteins in unexpected locations*. *Mol Biol Cell*, 1996. **7**(7): p. 1003-14.
80. Davidson, N.O., *Apolipoprotein E polymorphism: another player in the genetics of colon cancer susceptibility?* *Gastroenterology*, 1996. **110**(6): p. 2006-9.
81. Hough, C.D., et al., *Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 3869-76.

82. Harju, S., K.J. McQueen, and K.R. Peterson, *Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(9): p. 683-700.
83. Kireeva, M.L., et al., *Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development*. Exp Cell Res, 1997. **233**(1): p. 63-77.
84. Tsai, M.S., et al., *Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression*. Oncogene, 2002. **21**(53): p. 8178-85.
85. Danen, E.H. and K.M. Yamada, *Fibronectin, integrins, and growth control*. J Cell Physiol, 2001. **189**(1): p. 1-13.
86. Nakata, K., et al., *Association study between the fibronectin gene and schizophrenia*. Am J Med Genet, 2003. **116B**(1): p. 41-4.
87. Theocharis, S.E., et al., *Metallothionein expression in human neoplasia*. Histopathology, 2004. **45**(2): p. 103-18.
88. Vandier, D., et al., *Transactivation of the metallothionein promoter in cisplatin-resistant cancer cells: a specific gene therapy strategy*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(8): p. 642-7.
89. Raleigh, J.A., et al., *A clinical study of hypoxia and metallothionein protein expression in squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 855-62.
90. Greco, O., et al., *How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy*. J Cell Physiol, 2003. **197**(3): p. 312-25.

Pages web et autres documents:

91. <http://www.mlahanas.de/Greeks/Hippocrates.htm>
92. www.cancer.org (Cancer facts and figures 2003 de American Cancer Society)
93. document du cours DCEM3 du Pr. Baillet, Université Paris-VI Pierre et Marie Curie, 2004.
94. http://www.cancer.ca/ccs/internet/standard/0,3182,3172_375308__langId-fr,00.html
95. <http://www.oncologychannel.com/ovariancancer/>
96. http://pathology.mc.duke.edu/research/histo_course/ovarygermepith.jpg

97. R.H.F Hunter. *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation*. Cambridge University Press, 2003.
98. Elaine N.Marieb. *Anatomie et physiologie humaines*. Éditions du renouveau pédagogique 1992.
99. Rubin, MA. *Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays and tissu microarrays in advancing our undertsanding of prostate cancer*. J Pathol 2001; 195: 80-86
100. Snell, G. D. (ed) (1941) *Biology of the laboratory mouse, in The Jackson Laboratory*, first edition, Dover Publications, Inc., New York, NY.
101. DePinho, R.A et al. *Introduction*. Seminars in Cancer Biology, Vol 11, 2001: pp.175-76.
102. http://www.nlm.nih.gov/exhibition/dreamanatomy/da_g_II-B-1.html
103. http://www.arctur.com/research_portal/resources/image_library/index.htm
104. Alama, A; Barbieri, F; Favre, A et al. *Establishment and characterization of three new cell lines derived from ascites of human ovarian carcinomas*. Gynecol. Oncol. 62:82-88; 1996.
105. Buller, R. E; Niemann, T; Connor, J. P et al. *Isolation and preliminary characterization of an ovarian carcinoma cell line from a patient with familial ovarian cancer*. Gynecol. Oncol. 56;39-44; 1995
106. Golombick, T; Dansey, R; Bezwoda, W. R 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 : groth characteristics, biochemical and cytogenic studies*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 26:447-454; 1990
107. Grunt, T. W, Oeller, H; Somay C et al. *Different propensity for spontaneous differentiation of cell clones isolated from the human ovarian surface epithelial cell line HOC-7*. Differentiation 53;45-50; 1993.
108. Hamilton, T. C; Young, R. C; McKoy, W. M et al. *Charactérisation of a human ovarian carcinoma cell line (NIH;OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors*. Cancer Res. 43;5379-5389; 1983
109. Wong, W. S, Wong, Y. F, Ng, Y. T et al. *Establishment and characterization of a new human cell line derived from ovarian clear cell carcinoma*. Gynecol. Oncol. 38:37-45; 1990

110. Yamada, T; Ueda, M; Otsuki, Y et al. *Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary*. Gynecol. Oncol. 40:118-128; 1991.
111. Langdon, S. P; Lawrie, S. S; Hay, F. G et al. *Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines*. Cencer Res. 48:6166-6172; 1988
112. Hirte, H. W; Kaiser, J. S; Bacchetti, S. *Establishment and characterization of four human epithelial ovarian carcinoma cell lines*. Cancer 74:9000-9006; 1994
113. 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 Aug 19;52(1):76-84.
114. 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 Dec;23(6):1679-86.
115. Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D. *Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment*. Cancer Metastasis Rev. 1994 Jun;13(2):209-22. Review.
116. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. *Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice*. Cancer Metastasis Rev. 1998-99;17(3):279-84. Review.
117. Fidler IJ. *The organ microenvironment and cancer metastasis differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):498-505. Review

