

Université de Montréal

Caractérisation de Cks1, régulateur du cycle cellulaire, dans le cancer épithélial de l'ovaire

Par
Julie Desgagnés

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc
en Biologie Moléculaire
décembre, 2009

©, Julie Desgagnés, 2009

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation de Cks1, régulateur du cycle cellulaire, dans le cancer épithélial de l'ovaire

présenté par :
Julie Desgagnés

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Estelle Schmitt
président-rapporteur

Dr Anne-Marie Mes-Masson
directrice de recherche

Dr Diane Provencher
codirectrice

Dr Elliot Drobetsky
membre du jury

RÉSUMÉ

Le cancer épithélial de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus létal. La survie à 5 ans est de 30-40% chez les patientes atteintes d'une tumeur invasive (TOV), comparativement à 95% chez les patientes diagnostiquées pour une tumeur à faible potentiel de malignité (LMP). Au laboratoire, l'analyse de l'expression des gènes de la micropuce à ADN HuFL d'Affymetrix a révélé que Cks1 est un gène dont l'expression varie entre les tumeurs LMP et TOV. En effet, ce régulateur du cycle cellulaire est surexprimé dans les tumeurs TOV par rapport aux tumeurs LMP. Nous avons donc déplété Cks1 dans des lignées cellulaires tumorales invasives du cancer de l'ovaire dérivées au laboratoire, soit la TOV112D et la TOV1946, en utilisant des shRNAs sous le contrôle d'un répresseur inductible à la tétracycline. Puis, nous avons dérivé des clones stables inductibles à la tétracycline. Les résultats obtenus nous indiquent que la déplétion de Cks1 n'a pas d'effet sur la prolifération et la migration cellulaires, ni sur la formation de structures tridimensionnelles *in vitro*. Ainsi, nous pouvons conclure que Cks1 ne joue pas un rôle clé dans la progression tumorale par rapport aux paramètres testés. Or, des études supplémentaires seraient nécessaires pour expliquer les différences biologiques observées entre les deux types de tumeurs étudiées, et justifier cette variation observée de l'expression de Cks1.

Mots clés

Cancer épithélial de l'ovaire

Expression différentielle

Tumeur à faible potentiel de malignité (LMP)

Tumeur invasive (TOV)

Cks1

Cycle cellulaire

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer with a five-year survival rate of only 30-40% in patients diagnosed with high-grade invasive disease (TOV). This contrasts with the 95% five-year survival in patients diagnosed with the low malignant potential (LMP) disease. Previously, we have identified differential expression of Cks1 between serous LMP and TOV tumors through gene expression analysis using Affymetrix HuFL DNA microarrays. Overexpression of this cell cycle regulator was observed in the TOV tumors, but not in the LMP samples. To study its role on the invasive potential of ovarian cancer cell lines, Cks1 was depleted in two tumoral invasive ovarian cancer cell lines established in our laboratory, TOV112D and TOV1946, using an inducible shRNA strategy. Then, tetracycline-inducible stable clones were derived and studied further. Comparisons between clones and controls have shown no Cks1-dependent effect on cellular growth, neither in migration capacity nor spheroid formation. Thus, we can conclude that Cks1 does not play a crucial role in the tested parameters for cancer progression, but further experiments could elucidate the biological differences observed between the two kinds of tumors studied.

Keywords

Epithelial ovarian cancer

Differential expression

Low malignant potential tumor (LMP)

Invasive tumor (TOV)

Cks1

Cell cycle

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xiii
AVANT-PROPOS.....	xv
INTRODUCTION.....	1
1.1 L’ovaire normal.....	1
1.1.1 Origine embryonnaire.....	1
1.1.2 Anatomie.....	2
1.1.3 Histologie.....	3
1.1.4 Physiologie.....	5
1.2 Le cancer de l’ovaire.....	8
1.2.1 Les trois types de tumeurs ovariennes.....	9
1.2.1.1 Les tumeurs germinales.....	9
1.2.1.2 Les tumeurs stromales.....	9
1.2.1.3 Les tumeurs épithéliales.....	9
1.2.2 Classification.....	9
1.2.2.1 Les classes tumorales.....	10
1.2.2.1.1 Les tumeurs bénignes (BOV).....	10
1.2.2.1.2 Les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP).....	11
1.2.2.1.3 Les tumeurs invasives (TOV).....	12

1.2.2.2	Les histotypes.....	12
1.2.2.2.1	Séreux	13
1.2.2.2.2	Endométrioïde	13
1.2.2.2.3	Mucineux	14
1.2.2.2.4	Cellules claires.....	14
1.2.2.2.5	Autres histopathologies.....	14
1.2.2.3	Le grade.....	15
1.2.2.4	Le stade	15
1.2.3	Le cancer épithélial de l’ovaire et ses origines	18
1.2.3.1	L’OSE et les kystes d’inclusions	18
1.2.3.2	Hypothèse d’un continuum dans le développement du CÉO.....	19
1.2.3.3	Le CÉO et les trompes de Fallope.....	20
1.2.3.4	Le CÉO et l’endométriose.....	20
1.2.4	Épidémiologie/statistiques	21
1.2.5	Facteurs de risque.....	22
1.2.5.1	L’hérédité et les facteurs génétiques.....	22
1.2.5.2	L’âge	23
1.2.5.3	Les habitudes de vie et l’alimentation	23
1.2.5.4	L’ovulation.....	24
1.2.5.5	Les hormones de remplacement et la ménopause	24
1.2.5.6	Les gonadotrophines.....	25
1.2.6	Caractéristiques cliniques de la maladie.....	25
1.2.6.1	Prévention.....	25
1.2.6.2	Symptômes	26
1.2.6.3	Dépistage et diagnostic.....	26
1.2.6.4	Traitements.....	28

1.2.6.5	Suivi des patientes	30
1.2.6.6	Pronostic	31
1.3	Modèles d'étude dans le CÉO	33
1.4	Projet de maîtrise.....	35
1.4.1	Étude antérieure	35
1.4.2	Cks1	35
1.4.2.1	Introduction sur la famille Cks et structure	35
1.4.2.2	Rôles physiologiques.....	36
1.4.2.2.1	Rôle de Cks1 dans la progression du cycle cellulaire.....	37
1.4.2.2.2	Effets de la surexpression de Cks1 dans le cancer.....	40
1.4.3	Les objectifs du projet de maîtrise.....	42
CHAPITRE II MATÉRIEL & MÉTHODES		43
2.1	Culture cellulaire	43
2.2	Clonage	43
2.3	Transfection	45
2.4	Extraction de protéines.....	46
2.5	Immunobuvardage de type Western.....	46
2.6	Prolifération	47
2.7	Essais de migration : Recouvrement suite à une blessure.....	47
2.8	Essai de migration : Méthode de quantification des stries	48
2.9	Formation de sphéroïdes.....	48
2.10	Statistiques.....	48
CHAPITRE III RÉSULTATS		49
3.1	Implantation du système de répresseur à la tétracycline dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire.....	49

3.2	Déplétion de Cks1 par un système de shRNA inductible dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire.....	50
3.3	Effets in vitro de la déplétion de Cks1 dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire	53
3.3.1	Effet de la déplétion de Cks1 sur la prolifération cellulaire.....	53
3.3.2	Effet de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire	57
3.3.3	Effet de la déplétion de Cks1 sur la formation de sphéroïdes.....	60
	CHAPITRE IV DISCUSSION	63
4.1	Implantation du système de répresseur à la tétracycline dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire.....	63
4.2	Déplétion de Cks1 par un système de shRNA inductible dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire.....	65
4.3	Effets de la déplétion de Cks1 sur la croissance cellulaire.....	66
4.4	Effets de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire.....	67
4.5	Habilité de nos différents clones à former des structures tridimensionnelles.....	68
4.6	Synthèse.....	69
	PERSPECTIVES	71
	CONCLUSIONS.....	72
	CHAPITRE V RÉFÉRENCES.....	lxxiii

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I. Stadification du cancer épithélial de l'ovaire	17
---	----

CHAPITRE II

Tableau II. Séquences de shRNAs dirigés contre Cks1 et testés dans les lignées cellulaires TOV112D et TOV1946	44
--	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1. Anatomie du système reproducteur féminin	3
Figure 2. Coupe histologique d'un ovaire normal.....	4
Figure 3. Représentation des divers stades folliculaires	6
Figure 4. Cycles menstruel et ovarien.....	7
Figure 5. Classes tumorales.....	10
Figure 6. Histotypes	13
Figure 7. Patron de dissémination des cellules du cancer épithélial de l'ovaire	16
Figure 8. Statistiques relatives au cancer de l'ovaire au Canada.....	21
Figure 9. Incidence et mortalité relatives au cancer de l'ovaire à travers les années au Canada.....	22
Figure 10. Structure cristalline des protéines de la famille Cks	36
Figure 11. Illustration du cycle cellulaire	38
Figure 12. Mécanisme de dégradation de p27	39
Figure 13. Carte de plasmide du pcDNA6/TR	44
Figure 14. Carte de plasmide du vecteur 694.6	45
Figure 15. Caractérisation de l'expression du répresseur à la tétracycline dans les lignées cellulaires TOV112D et TOV1946.....	49
Figure 16. Déplétion de Cks1 dans les lignées cellulaires TOV112D et TOV1946.....	51
Figure 17. Observation de l'expression de Cks1 chez des clones contrôles isolés issus des lignées cellulaires TOV112D et TOV1946.....	52
Figure 18. Observation de l'expression de Cks1 dans des clones isolés déplétés en Cks1 issus des lignées cellulaires TOV112D et TOV1946	53
Figure 19. Taux de croissance des populations mixtes et des clones déplétés en Cks1 dans la lignée cellulaire TOV112D.....	55
Figure 20. Taux de croissance des populations mixtes et des clones déplétés en Cks1 dans la lignée cellulaire TOV1946	56

Figure 21. Capacité de migration des différents clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée cellulaire TOV112D	58
Figure 22. Représentations graphiques de la capacité de migration des différents clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée cellulaire TOV112D	59
Figure 23. Formation de structures tridimensionnelles par les clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée TOV112D.....	61
Figure 24. Formation de structures tridimensionnelles par les clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée TOV1946	62

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AKT	oncogène viral v-akt du thymome murin (v-akt murine thymoma viral oncogene)
AMH	hormone anti-müllérienne (anti-mullerian hormone)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BOV	tumeur ovarienne bénigne (benign ovarian tumor)
BRCA1	gène du cancer du sein 1 (breast cancer gene 1)
BRCA2	gène du cancer du sein 2 (breast cancer gene 2)
BrdU	bromodéoxyuridine
CA125	antigène de cancer 125 (cancer antigen 125)
CDC20	protéine du cycle de division cellulaire 20 (cell division cycle protein 20)
CDC25	protéine du cycle de division cellulaire 25 (cell division cycle protein 25)
CDC28	protéine du cycle de division cellulaire 28 (cell division cycle protein 28)
CDK	kinase dépendante de cycline (cyclin-dependant kinase)
CDK1	kinase dépendante de cycline 1 (cyclin-dependant kinase 1)
CÉO	cancer épithélial de l'ovaire
CKS1	sous-unité de la kinase CDC28 1 (CDC28 kinase subunit 1)
CKS2	sous-unité de la kinase CDC28 2 (CDC28 kinase subunit 2)
ECL	détection améliorée de la chimiluminescence (enhanced chemiluminescence)
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique (ethylene diaminetetraacetate)
FACS	triage cellulaire activé par fluorescence (fluorescence-activated cell sorting)
FBS	sérum de veau foetal (fetal bovine serum)
FIGO	fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FSH	hormone folliculo-stimulante (follicule-stimulating hormone)
G	grade tumoral
HER2	homologue 2 de l'oncogène viral v-erb-b2 de la leucémie érythroblastique (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)
HNPCC	cancer colorectal héréditaire sans polypose (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
HRP	peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)
LB	milieu de culture bactérien (luria broth)
LH	hormone lutéinisante (luteinizing hormone)
LHRH	gonadolibérine (luteinizing hormone-releasing hormone)
LMP	tumeur à faible potentiel de malignité (low malignant potential tumor)
MAPK	protéine kinase activée par des agents mitogènes (mitogen-activated protein kinase)
MDA-MB-231	adénocarcinome de la glande mammaire
MPSC	carcinome micropapillaire séreux (micropapillary serous carcinoma)

NSCLC	cancer du poumon à cellules non petites (non-small cell lung cancer)
OSCC	carcinome des cellules orales squameuses (oral squamous cell carcinoma)
OSE	épithélium de surface ovarien (ovarian surface epithelium)
P27	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
RT-PCR	réaction en chaîne par polymérase-transcription inverse (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
SCF	Skp-Cullin-F-box
SCID	immunodéficience sévère combine (severe combined immunodeficiency)
shRNA	petit ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA)
siRNA	petit ARN interférent (small interfering RNA)
SKP2	protéine associée aux kinases de la phase S 2 (S-phase kinase-associated protein 2)
SRY	gène de détermination du sexe de la région Y (sex determining region of the chromosome Y)
TET	tétracycline
TOV	tumeur ovarienne invasive (invasive ovarian tumor)
TR	répresseur à la tetracycline (tetracycline repressor)
WT	type sauvage (wild-type)

*- À mes deux Michel et à ma Carole,
Pour m'avoir soutenu et donné le sourire au quotidien,
Mais surtout pour avoir cru en moi
Tout au long de ce projet*

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier deux femmes extraordinaires, ma directrice, le Dre Anne-Marie Mes-Masson et ma codirectrice, le Dre Diane Provencher, pour leur soutien, leurs conseils et leur générosité. Anne-Marie, merci de m'avoir donné ma chance. Tu m'as donné tous les outils nécessaires pour amorcer une belle carrière.

Qu'aurait été ma maîtrise sans ma « famille » du labo, mes amis et collègues qui m'ont toujours donné le sourire, même par temps plus difficiles... Je tiens donc à remercier l'équipe ovaire, l'équipe prostate et l'unité polyôme pour leur collaboration, leur aide et tous les fous rires qu'on a eu au quotidien. Merci à Julie Lafontaine pour les infections de lentivirus et pour son savoir! Special thanks to Jason Madore who taught me the basics of lab work and helped me to improve my english!

Quelques personnes se sont distinguées par un apport spécial dans mon cheminement. J'aimerais remercier le Dr Benjamin Péant, pour ses conseils scientifiques, son humour français parfois incompréhensible mais tout de même charmant. Ben, tu as eu du courage de me « coacher » et je t'en remercie! J'aimerais aussi souligner l'aide précieuse du Dre Isabelle Létourneau, qui a été là pour m'aider à traverser les moments les plus difficiles comme les plus joyeux, qu'ils soient d'ordre professionnel ou personnel. Isa, j'ai gagné une belle amie et je ne saurais mieux exprimer ma gratitude qu'en te disant un gros « MERCI » (et « c'est vendredi »?!?). Merci d'avoir pris le temps de corriger ce manuscrit, qui d'ailleurs t'a sûrement beaucoup diverti dans l'autobus!

J'aimerais aussi remercier deux filles en or, soit Véronique Barrès et Karine Normandin, qui ont fait leur maîtrise avec moi dans le laboratoire. Je vais toujours me souvenir du « fun » qu'on a eu toutes les trois lors des congrès et des diverses activités au labo. Karine, ce fût bien agréable d'aller aux cours ensemble et de placoter, j'ai eu beaucoup de plaisir avec toi! Et Véro... comment résumer ces trois années ensemble? « UnbelieveBELLE » est le mot! Je t'adore ma chouette, et grâce à toi je suis maintenant en meilleure forme physique que jamais, tellement tu m'as fait danser!

Une mention spéciale à mes « chicks », soit Manon de Ladurantaye, Liliane Meunier, Kim Leclerc-Désaulniers, Katia Caceres, Ingrid Labouba, Magdalena Zietarska et Lise Portelance. Vous m'avez tellement fait rire, et vous m'avez toutes été d'une aide précieuse à un moment ou à un autre dans mon cheminement. Je vous aime fort les filles! J'aimerais aussi remercier Louis Cyr, pour tous les moments hilarants qu'on a partagé. Je pense encore à toi, Chantale Auger, qui m'a beaucoup manqué durant son congé de maternité... mais ne t'inquiète pas Chantale, j'applique tes conseils de zénitude et je m'en porte bien! Merci aussi à Louise Champoux pour son soutien administratif et pour les petites gâteries sucrées qui m'ont régalaré!

Comment passer sous silence le soutien éternel des autres membres de l'ICM, spécialement le laboratoire du Dr Réjean Lapointe et ses étudiants qui m'ont fait bien rire et dont la présence aux diverses activités était toujours appréciée. Une mention spéciale à Alexandre Reuben, dont l'écoute a été d'un grand réconfort. De plus, je tiens à souligner le soutien de Maral Tersakian et de Nathalie Tapp, le duo électrique de l'administration de l'ICM. Travailler avec vous est un plaisir les filles!

J'aimerais souligner la générosité de mon comité de thèse d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit et de l'évaluer. J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires, soit Canderel et les programmes de biologie moléculaire pour le soutien financier offert lors de mes études.

J'ai eu quelques moments plus difficiles durant ma maîtrise. Heureusement, j'ai pu me tourner vers une jeune femme remarquable, Ariane Fontaine. Merci pour ton écoute, tes conseils et ton aide, qui m'ont permis de continuer et d'achever mes études. Merci à tous mes amis, qui m'ont donné la motivation de continuer. Il y a ceux qui comprenaient parfaitement ce que je vivais (mes amis du bacc), spécialement Douce Michaud et Thu Ngan Trinh, et ceux qui comprenaient un peu moins mais qui m'ont soutenu quand même, notamment Nicolas Ky.

Merci maman Carole et papa Michel de m'avoir donné tous les outils nécessaires à mon épanouissement, autant personnel que professionnel. Vous avez été pour moi de beaux modèles d'intégrité, de réussite et d'amour. J'espère que vous êtes fiers de votre pitoune! Chose certaine, je vous aime « apachouie » de tout mon cœur et je ne serai jamais assez reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci aussi à mon frère Jean-Michel pour sa présence et ses encouragements. J'aimerais souligner le courage et la force d'une femme extraordinaire, Madame Alice Ida Thériault, qui s'est battu durant de longues années, pour finalement perdre le combat contre le cancer en mai 2008. Mamie, je sais que tu veilles sur moi et c'est en toi que j'ai trouvé la motivation pour travailler toujours plus fort. Merci pour ton amour et ta générosité. Je t'aime et je pense beaucoup à toi.

Et le dernier, mais non le moindre, mon amoureux Michel Billard, qui a été au cœur de tout mon cheminement académique. Ces dernières onze années à te côtoyer ont été magiques. Tu as vécu avec moi les hauts, mais surtout les bas de mon parcours aux études graduées, mais cette épreuve nous a fait grandir ensemble et me prouve que nous serons capables de surmonter n'importe quel obstacle. Merci pour ta patience, ta contribution en tant que co-auteur (!), ton amour sans bornes et tes câlins, qui sont les meilleurs au monde! J'ai déjà hâte que nos projets futurs se concrétisent...

AVANT-PROPOS

Comment ne pas être fasciné par la complexité et la beauté de cette machine qu'est le corps humain? Comment deux êtres humains, de sexe opposé, parviennent-ils à propager leur matériel génétique, à travers le temps, afin d'assurer la survie de l'espèce humaine? L'homme et la femme ont tous deux leur rôle à jouer dans le processus, mais le rôle central de la femme dans le port et le développement du fœtus est captivant. Tout débute au cœur de l'ovaire, qui renferme quelques centaines d'ovules à féconder. Cet organe a un rôle central sur la sécrétion de diverses hormones, menant à la puberté et à la reproduction. Or, l'ovaire n'est pas à l'abri des nombreuses modifications génétiques et épigénétiques qui peuvent mener au développement de tumeurs ovariennes, parmi les plus complexes chez l'humain. L'intérêt de mon travail est donc de mieux comprendre les mécanismes moléculaires menant au développement du cancer épithélial de l'ovaire. À cet effet, la première section de ce mémoire sera consacrée à la description de l'ovaire, de son embryologie, son anatomie et sa physiologie. Par la suite, nous entrerons dans le vif du sujet en abordant la question du cancer de l'ovaire, qui mènera aux résultats des recherches faites lors de mon projet de maîtrise.

INTRODUCTION

1.1 L'ovaire normal

1.1.1 Origine embryonnaire

L'histoire débute par la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde. Dès cet instant, les jeux sont faits; le sexe de l'embryon est déjà déterminé au niveau génétique, soit XX, soit XY. Or, le développement d'un embryon, qu'il soit mâle ou femelle, est le même. Dans le cas du développement des gonades, deux phases bien précises ont été caractérisées, soit la formation de la crête génitale et l'expression du gène SRY (*sex-determining region Y*) (revu dans [1]).

Les gonades se forment à partir de la crête génitale, que ce soit chez un embryon mâle ou femelle humain, et ce renflement prend forme suite à la prolifération de l'épithélium coelomique et de l'épaississement du mésenchyme sous-jacent, durant la cinquième semaine de gestation. Afin de permettre une différenciation sexuelle, les deux crêtes génitales doivent être colonisées par les cellules germinales primordiales, provenant de l'endoderme bordant le sac vitellin. Ces cellules diploïdes sont entourées par les cellules de l'épithélium coelomique ayant proliféré dans le mésenchyme et ce, à compter de la sixième semaine. Il y a donc formation des cordons sexuels, de même que la formation du canal de Müller et du canal de Wolff. L'épithélium coelomique poursuivra sa prolifération afin d'évoluer pour donner la gonade indifférenciée [2].

C'est lors de la deuxième phase du développement, soit au moment de l'expression du gène SRY, contenu sur le chromosome Y, que le destin gonadique est connu. Le rôle de SRY est connu comme étant un activateur ou un répresseur de l'expression génique [3]. Le produit de ce gène est déterminant pour la transformation de la gonade vers le testicule. Son expression, par les cellules de Sertoli et Leydig favorise la sécrétion du peptide AMH (hormone anti-mullérienne) (revu dans [1]). Dans le cas contraire, c'est-à-dire si SRY est absent, ou si sa fonction est altérée, la gonade se transforme plutôt en ovaire et ce, à la dixième semaine de gestation. L'absence de l'AMH transforme les canaux de Müller en plusieurs structures composant l'appareil reproducteur féminin, soit l'utérus, les trompes de Fallope et la partie supérieure du vagin. Pour leur part, les canaux de Wolff vont régresser, étant donné l'absence marquée de testostérone [1, 3]. Dans des cas plus rares, il peut arriver des désordres au niveau

de l'expression ou de la fonction de SRY expliquant les troubles de différenciation sexuelle rapportés chez l'humain.

Au troisième mois de gestation, les deux zones de l'ovaire vont se distinguer, soit la zone corticale, contenant les gonocytes en prolifération, et la zone médullaire. Au quatrième mois du développement embryonnaire, il est possible d'observer les follicules primordiaux et, un peu plus tard, les thèques interne et externe se forment, suivies de la transformation du mésenchyme en stroma cortical [4]. Au cours de la trentième semaine de grossesse, le nombre d'ovocytes chutera drastiquement, passant de près de six millions à seulement 400 000, et ce sont eux qui seront présents dans les ovaires de la naissance à la puberté. À ce moment, les hormones sexuelles sécrétées par les ovaires permettront la maturation des organes sexuels et des follicules qui, ultimement, donneront les ovules [5]. Vers la cinquantaine, les changements hormonaux importants accompagnant la ménopause mettront fin, de façon progressive, aux fonctions reproductrices de la femme.

1.1.2 Anatomie

Le système reproducteur féminin constitue le berceau du fœtus en développement. Contrairement au système reproducteur masculin, il est interne dans son ensemble. L'ovaire trouve sa place au cœur de ce système, étant bordé par la trompe de Fallope et situé de part et d'autre de l'utérus dans la cavité pelvienne (Figure 1) [6]. L'ovaire est maintenu en place par trois points; d'une part, par le ligament tubo-ovarien le reliant à l'utérus, ensuite par le ligament lombo-ovarien suspendant l'ovaire dans la cavité péritonéale, finalement par le mésovarium qui le relie à la paroi du bassin. L'apport en oxygène et en nutriments est opéré par les artères utérines et ovariennes, et un système lymphatique complexe est déployé pour le drainage des ovaires.

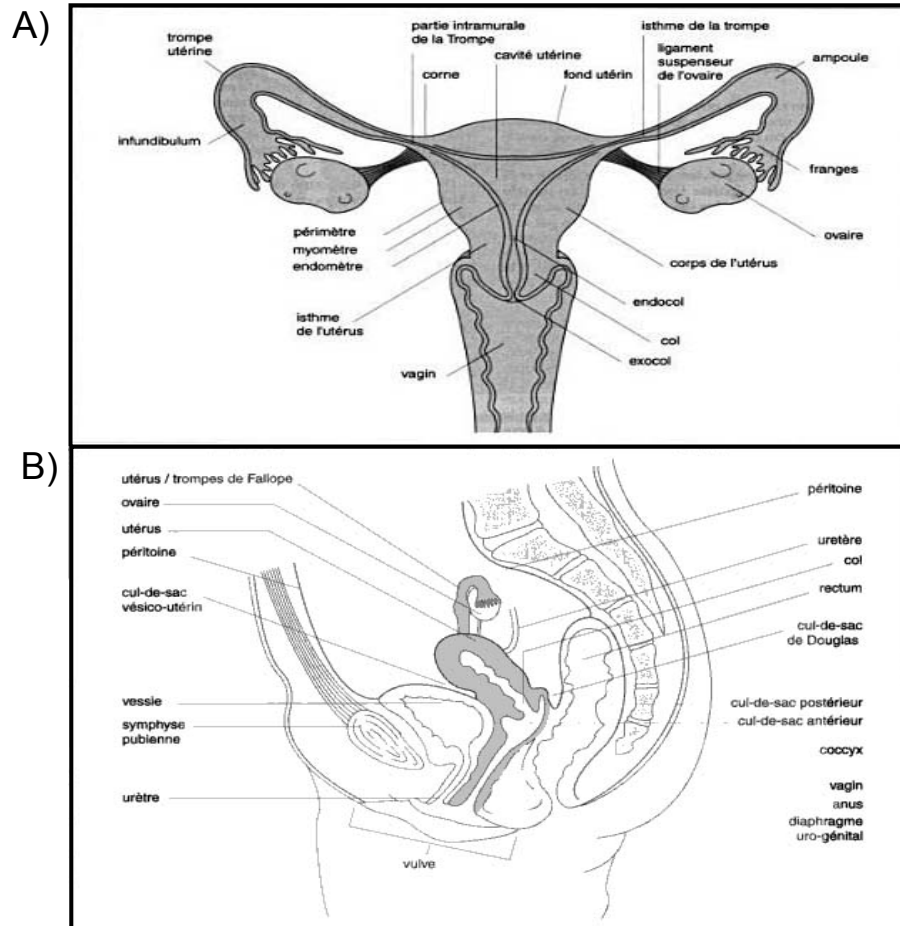


Figure 1. Anatomie du système reproducteur féminin [6]

A) Vue Frontale

B) Vue sagittale

La forme ovoïde caractéristique de l'ovaire rappelle une amande et sa taille est d'environ 3 à 5 centimètres [6]. L'ovaire est enveloppé d'une capsule protectrice albuginée renfermant un grand nombre de follicules. Au cours de la vie d'une femme, l'aspect macroscopique de l'ovaire viendra à se modifier. Alors qu'il est lisse chez la jeune fille, il est cratérisé chez la femme encore fertile, et prend un aspect atrophié chez la femme plus âgée lorsque la ménopause est entamée.

1.1.3 Histologie

L'ovaire normal, lors d'une coupe histologique, révèle trois zones bien distinctes, soit l'épithélium, la zone périphérique (ou corticale) et la zone centrale (ou médullaire) (Figure 2)

[7]. Ces trois zones se présentent en couches successives et chacune d'entre elles assure une fonction bien précise.

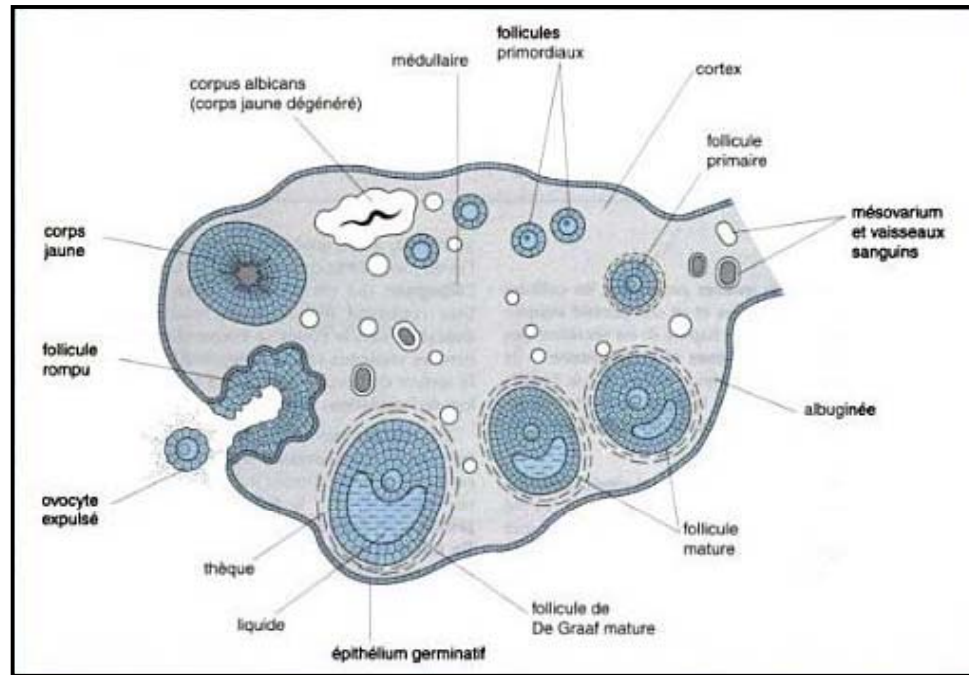


Figure 2. Coupe histologique d'un ovaire normal [6]

L'épithélium de surface ovarien (OSE) est une mince couche de cellules cuboïdes dérivant de l'épithélium coelomique recouvrant la surface entière de l'ovaire, lui conférant une certaine protection (Figure 2) [8]. L'OSE est classifié comme étant un épithélium simple, car il exprime les kératines 7, 8, 18 et 19, caractéristiques de ce type d'épithélium. Ses rôles au sein de l'ovaire sont multiples; d'une part, il est un acteur crucial du transport de molécules entre l'ovaire et la cavité péritonéale. Ce rôle est expliqué morphologiquement par la présence de microvillosités à sa surface. Il entre d'autre part en jeu dans le processus de l'ovulation, puisque les lysosomes présents dans ses inclusions permettent sa dégradation enzymatique, essentielle à la libération de l'ovule. Suite à cette rupture, il sera en mesure de se réparer grâce à la capacité des cellules épithéliales à proliférer.

L'OSE est attaché à une membrane basale qui le sépare du stroma ovarien, mais de façon très faible, contrairement aux autres épithéliums. Sous la membrane basale se trouve la tunique albuginée, qui est en quelque sorte une couche de tissu conjonctif, et celle-ci donne à l'ovaire sa couleur blanchâtre caractéristique (Figure 2) [7]. Elle fait partie intégrante de la zone

périphérique (ou corticale) et son rôle est de filtrer partiellement des molécules entre l'OSE, assez perméable, et le stroma de l'ovaire, autre composante de la zone périphérique. Le stroma contient plusieurs éléments, dont principalement les follicules.

En dernier lieu, au cœur de l'ovaire se trouve la zone centrale (ou médullaire) (Figure 2) [7]. Cette zone, caractérisée par un aspect spongieux, est composée de tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins, permettant l'irrigation de l'ovaire et les échanges moléculaires avec le reste du corps.

1.1.4 Physiologie

L'ovaire est à la fois une glande synthétisant des hormones sexuelles stéroïdiennes, soit la progestérone et les œstrogènes, et un organe renfermant les cellules reproductrices appelées ovocytes. Ses deux rôles bien distincts sont toutefois très intimement reliés; le but de l'ovaire étant bien sûr de relâcher de façon mensuelle l'ovule, une manœuvre qui est hautement régulée [5-7].

Dans un premier temps, le phénomène d'ovogénèse, soit la formation des ovocytes, prend place dans la zone corticale de l'ovaire et s'amorce dans la vie embryonnaire (Figure 2) [7]. À ce stade, l'ovaire contient environ sept millions de cellules germinales, aussi appelées ovogonies. Ce nombre passe à 400 000 à l'atteinte de la puberté, et seulement 400 d'entre eux deviendront follicules de deuxième ordre pouvant se développer lors de la vie fertile d'une femme pour former un ovule fécondable.

Lors de la naissance, les follicules primordiaux se présentent sous forme d'un follicule recouvert d'une couche de cellules épithéliales pré-granulosa, et ils sont délimités par un stroma et une lame basale [7]. Le follicule évoluera en développant des couches supplémentaires de cellules cuboïdes, caractéristiques du follicule primaire (Figure 3). C'est lors de l'accumulation des cellules de l'interstitium ovarien formant la thèque que le follicule secondaire verra le jour. Finalement, le follicule De Graaf, constituant le follicule tertiaire, est pour sa part composé de la thèque interne, responsable de la sécrétion des hormones sexuelles stéroïdiennes, et de la thèque externe, formant une capsule fortement vascularisée (Figure 3). Ce follicule détient en son centre une cavité remplie de liquide folliculaire formant l'antrum. Un réseau vasculaire bien développé dans la thèque interne est essentiel pour une croissance folliculaire efficace. Une vingtaine de ces follicules matures sont présents à la fin d'un cycle; toutefois, un seul

follicule pourra se développer chaque mois, inhibant le développement des autres et frayant son chemin jusqu'à la surface de l'ovaire où il sera expulsé.

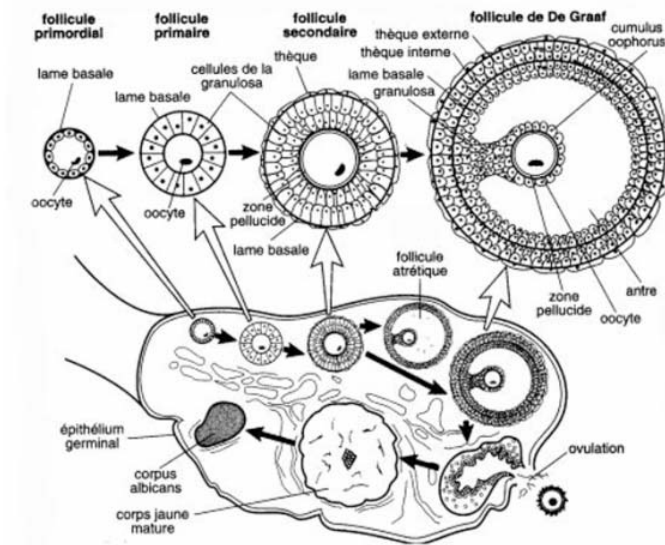


Figure 3. Représentation des divers stades folliculaires [Tiré de <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/f0312baf-5678-44d0-acfc9539cf49538d/ch01.html>]

Pour permettre l'ovulation, le rôle de l'ovaire dans la sécrétion des hormones sexuelles stéroïdiennes est primordial. En effet, ce sont ces hormones qui assurent la régulation des cycles menstruels et ovariens permettant ainsi de mettre au diapason l'ovulation et la préparation de l'endomètre en vue d'une éventuelle fécondation [5, 6].

Le cycle menstruel réfère aux modifications survenant dans l'utérus [5]. Celui-ci est divisé en trois phases bien distinctes (Figure 4). D'office, la phase menstruelle commence au premier jour de menstruation et dure entre un et cinq jours durant lesquels il y aura saignement. Après viendra la phase proliférative, durant une à deux semaines, où la paroi de l'endomètre viendra à s'épaissir. Suivra finalement la phase sécrétoire durant généralement deux semaines où l'endomètre poursuivra son épaississement et deviendra plus vascularisé. Il sécrète aussi un liquide riche en glycogène. Au terme de cette phase, si aucun embryon ne s'est implanté, la menstruation débutera et un nouveau cycle menstruel se déclenchera.

Pour sa part, le cycle ovarien, se déroulant parallèlement au cycle menstruel, réfère à l'ovulation [5]. Il est orchestré par un cocktail de cinq hormones, soit la gonadolibérine (LHRH)

produite par l'hypothalamus, l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), toutes deux produites par l'adénohypophyse, et deux hormones stéroïdiennes élaborées par l'ovaire, soit la progestérone et les œstrogènes. La concentration de ces hormones sera la clé de la régulation du cycle ovarien.

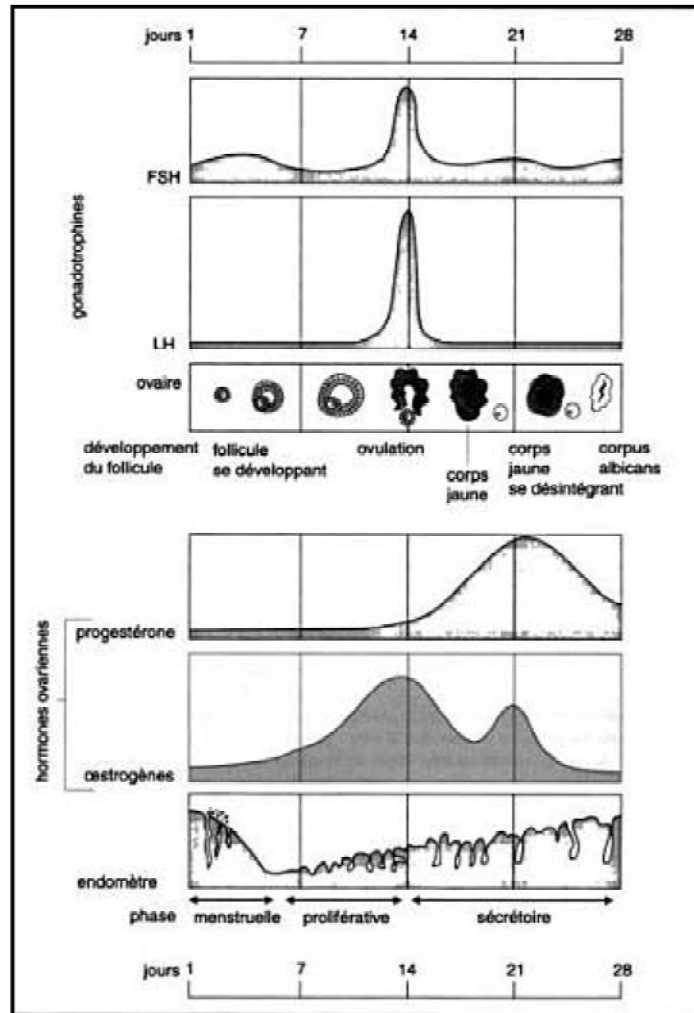


Figure 4. Cycles menstruel et ovarien [6]

Durant la première phase du cycle ovarien, appelée phase folliculaire, plusieurs follicules amorcent leur croissance, stimulés par la FSH (Figure 4). Globalement, les concentrations de LH et de FSH sécrétées par l'adénohypophyse sont plutôt faibles, dû au contrôle exercé par la LHRH. Pendant leur maturation, les follicules débutent la sécrétion d'œstrogènes, mais en faible quantité. Il faut noter que les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la LH et la FSH. Puis, la sécrétion d'œstrogènes par les follicules en croissance

augmente drastiquement, ce qui a pour effet de perturber les ratios hormonaux, stimulant ainsi l'hypothalamus qui intensifie sa production de LHRH. Ceci activera la sécrétion de gonadotrophines. Cette augmentation marquée de LH et de FSH entraîne le début de la phase ovulatoire. Au cours de cette phase, les follicules ayant mûri sont prêts pour l'ovulation. Tel que mentionné précédemment, un seul de ces follicules, soit le follicule dominant, réussira à se frayer un chemin hors de l'ovaire, alors que les autres dégènereront. Ce phénomène aura lieu un à deux jours après les pics de LH et de FSH.

La phase lutéale est amorcée lorsque le tissu folliculaire résiduel, resté dans l'ovaire, subit une transformation stimulée par la LH et devient le corps jaune (Figure 4). Ce tissu endocrine sécrète des hormones pendant toute la durée de cette phase, soit la progestérone et les œstrogènes. Au fur et à mesure que la concentration de ces hormones augmente, leur action combinée exerce une rétro-inhibition sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse, ce qui a pour effet de faire chuter les concentrations de LH et de FSH. La chute de la concentration de LH accélère la dégénérescence du corps jaune, freinant ainsi la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Cette diminution libère l'hypothalamus et l'adénohypophyse de l'inhibition exercée par ces hormones, ce qui permettra à nouveau la sécrétion de gonadotrophines pour stimuler la croissance de nouveaux follicules et ainsi entamer un nouveau cycle ovarien.

1.2 Le cancer de l'ovaire

Comme nous venons de le voir, la complexité et la composition de l'ovaire font de cette gonade un sujet d'étude intéressant. Les pathologies qui en sont dérivées ne font pas exception; la section suivante vise à explorer une de ses pathologies les plus sévères : le cancer de l'ovaire.

Nul besoin de décrire ce qu'est le cancer; considéré comme la maladie du siècle, il touche des millions de personnes chaque année. Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Bien que cette maladie soit traitable dans une certaine proportion des cas, elle n'est malheureusement pas toujours guérie, ce qui mène au décès d'un bon nombre de personnes atteintes. Le cancer de l'ovaire ne fait pas exception à la règle, étant considéré comme le cancer gynécologique le plus meurtrier.

1.2.1 Les trois types de tumeurs ovariennes

1.2.1.1 Les tumeurs germinales

Les tumeurs germinales, comptant pour 15 à 25% des tumeurs de l'ovaire et environ 3-7% des tumeurs malignes, sont fréquemment diagnostiquées chez les jeunes filles et les adolescentes [9]. Or, chez l'adulte, il est rare de retrouver ce type de tumeurs, et si c'est le cas, elles sont généralement bénignes. Ce type de tumeurs est classifié selon l'origine des cellules qui la composent. À titre d'exemple, le tératome est généralement bénin, et il n'est pas rare d'y retrouver des dents ou des cheveux, puisque la tumeur dérive de plus d'un type de tissus embryonnaires. Il est aussi possible de retrouver d'autres types de tumeurs germinales, tel que le carcinome embryonnaire, le dysgerminome, la tumeur du sac vitellin, et finalement le choriocarcinome, mais ces pathologies sont plus rares.

1.2.1.2 Les tumeurs stromales

Pour leur part, les tumeurs stromales, aussi appelées tumeurs des cordons sexuels, représentent une faible proportion des tumeurs de l'ovaire, avec seulement 5 à 10% des cas et comptent pour 2 à 7% des tumeurs malignes [9]. Ce type de tumeur est souvent associé à la production des hormones endocriniennes. Les tumeurs proviennent surtout des cellules de la granulosa, mais peuvent aussi émerger des cellules de la thèque, des cellules stromales et finalement des cellules de Sertoli et de Leydig. Ces tumeurs sont généralement indolores et sont associées avec un bon pronostic à long terme pour les patientes.

1.2.1.3 Les tumeurs épithéliales

Les tumeurs épithéliales comptent pour environ 60-70% des tumeurs de l'ovaire et 90% des cas de cancer de l'ovaire [9]. Elles dérivent principalement de l'OSE (*ovarian surface epithelium*), cette mince couche de cellules épithéliales qui recouvre la surface de l'ovaire. Comme le projet de recherche abordé dans cette thèse porte sur ce type de tumeur, les sections suivantes serviront à mieux la décrire.

1.2.2 Classification

Afin de mieux comprendre la complexité de cette maladie, plusieurs critères ont été établis, permettant de mieux la décortiquer. Ces critères sont les classes tumorales, les histotypes, le grade et le stade.

1.2.2.1 Les classes tumorales

Les tumeurs se déclinent en trois classes tumorales majeures : les tumeurs bénignes (BOV), à faible potentiel de malignité (LMP) et invasives (TOV). Selon le type de tumeur rencontré, plusieurs caractéristiques vont varier.

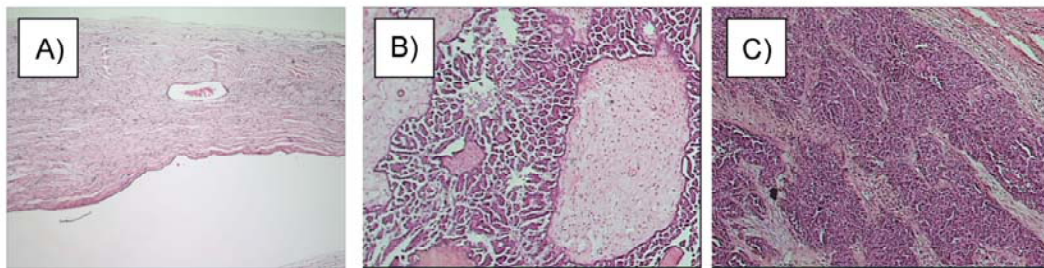


Figure 5. Classes tumorales [Tiré de www.uic.edu/depts/mcpt/anatomic/index.htm]

- A) Tumeur bénigne (BOV)
- B) Tumeur à faible potentiel de malignité (LMP)
- C) Tumeur invasive (TOV)

1.2.2.1.1 Les tumeurs bénignes (BOV)

Les tumeurs BOV sont diagnostiquées dans 50% des cas de tumeurs ovariennes et présentent une prolifération de l'OSE sans stratification au niveau histologique [10]. Elles ne présentent toutefois pas de cellules atypiques. Elles forment généralement des kystes bordés d'un épithélium simple (Figure 5A). Généralement inoffensives, ces tumeurs sont diagnostiquées chez les femmes jeunes et présentent pas de risque réel pour la survie de la patiente, bien qu'elles puissent parfois causer un inconfort dû à leur volume imposant. Les seuls risques encourus apparaissent lors de leur résection, où le contenu kystique pourrait s'échapper et causer une inflammation du péritoine.

1.2.2.1.2 Les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP)

Les LMP composent environ 15% des cas de tumeurs ovariennes. Elles sont souvent confinées aux ovaires, diagnostiquées chez les femmes jeunes, et sont associées à un meilleur pronostic que les tumeurs invasives [10, 11]. À titre d'exemple, la survie à 5 ans pour les femmes atteintes d'une LMP séreuse est de 90-95%. La tumeur LMP, aussi qualifiée de « borderline » ou « semi-maligne », se distingue des BOV par plusieurs caractéristiques. En effet, la FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) a proposé de créer une classe distincte pour regrouper ces tumeurs qui ne sont ni bénignes, ni malignes, mais possédant certaines caractéristiques propres à la malignité. D'abord, elles peuvent présenter une bilatéralité dans 25 à 50% des cas, ce qui se situe entre les tumeurs bénignes et malignes en proportion. Elles présentent aussi une prolifération épithéliale avec stratification, mais leurs atypies cellulaires sont limitées, leur index mitotique est faible et, principalement, il y a absence d'invasion stromale ou d'envahissement du tissu conjonctif adjacent (Figure 5B).

Les LMP se distinguent aussi des autres classes tumorales par la nomenclature de leurs lésions à distance, qui ne sont pas des métastases, mais plutôt des implants péritonéaux [11]. Ceux-ci ont été classés comme étant majoritairement non-invasifs et n'influencent pas le pronostic des patientes. Toutefois, une faible proportion des patientes LMP peuvent récidiver et présenter un index mitotique élevé, de l'aneuploïdie et/ou de la microinvasion. Ce dernier terme désigne un foyer invasif composé de cellules épithéliales seules ou d'un petit groupe de cellules au niveau du stroma, et de volume inférieur à 10 mm^3 , tout en ayant moins de 3 mm dans sa plus longue dimension. Ces foyers sont retrouvés dans environ 10% des tumeurs séreuses, mais encore une fois n'influencent en aucun cas le pronostic des patientes de façon directe.

En 1996, un nouveau sous-ensemble de tumeurs LMP a été décrit. En effet, les carcinomes micropapillaires séreux, ou MPSC, représentent 5-12% des tumeurs LMP séreuses typiques [12]. Quelques caractéristiques propres aux MPSC ont forcé la création de ce groupe par une équipe de chercheurs. Tout d'abord, les patientes diagnostiquées avec un MPSC sont généralement plus jeunes que les patientes ayant une LMP classique. De plus, une bilatéralité est observée, en plus d'une chute dans la survie à long terme de ces patientes, expliquée en partie par le fait que les MPSC sont associés à des stades avancés de la maladie. Selon les diverses études faites à ce jour, il semblerait que les MPSC sont plus souvent associés aux

implants péritonéaux invasifs, ce qui, tel que décrit précédemment, pourrait aussi justifier le moins bon pronostic de ces patientes, mais le débat sur la question est loin d'être achevé.

1.2.2.1.3 Les tumeurs invasives (TOV)

Cette dernière classe tumorale regroupe les tumeurs présentant une invasion stromale nette et destructive, ce qui les distingue des LMP [10]. Les TOV sont généralement diagnostiquées chez les femmes âgées, et très rarement chez les femmes de moins de 40 ans. Elles présentent à l'intérieur d'une masse tumorale solide, de nombreuses zones nécrotiques et hémorragiques, en plus d'une prolifération épithéliale stratifiée, d'un index mitotique élevé et d'un grand nombre d'atypies cellulaires (Figure 5C). Généralement bilatérales et détectées à un stade avancé, elles laissent présager un très mauvais pronostic; en effet, les femmes diagnostiquées avec une tumeur TOV séreuse de stade III voient leur survie à 5 ans chuter à environ 15-30%.

1.2.2.2 Les histotypes

Tel que décrit précédemment, une grande majorité des cancers de l'ovaire (90%) dérivent de l'épithélium de surface de l'ovaire. Étant donné que cet épithélium est considéré comme multipotent, il peut donner naissance à plusieurs types d'épithéliums différents. Cette observation explique pourquoi les tumeurs cancéreuses dérivant de cet épithélium peuvent prendre la forme de divers types cellulaires, et leur morphologie dicte le type histopathologique des cellules composant la tumeur.

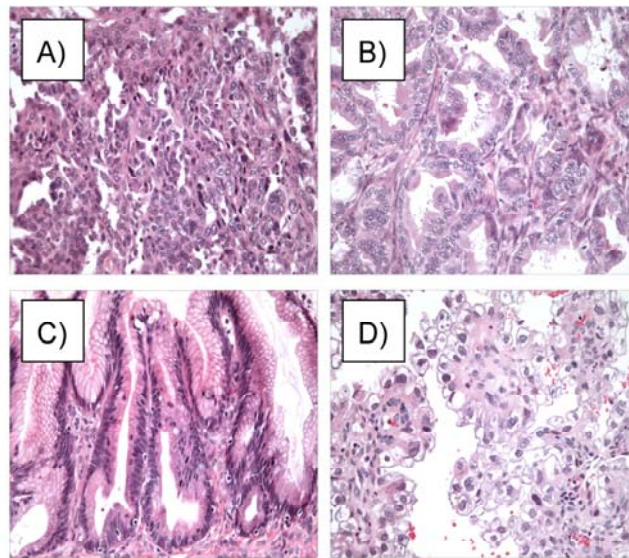


Figure 6. Histotypes

- A) Séreux
- B) Endométriöide
- C) Mucineux
- D) À cellules claires

1.2.2.2.1 Séreux

L'histotype séreux est l'histopathologie la plus souvent diagnostiquée lorsqu'une patiente présente un cancer épithélial de l'ovaire, avec plus de 50% des tumeurs épithéliales [13, 14]. Ces tumeurs doivent leur nom à la similitude des cellules à celles qui tapissent la paroi interne des trompes de Fallope (Figure 6A). Leur présentation est souvent bilatérale. Dans la plupart des cas (70% des cas), les tumeurs séreuses sont bénignes et se présentent sous forme de kystes. Elles peuvent toutefois être à faible potentiel de malignité (10%) ou malignes (20%). Les patientes ayant une tumeur LMP ont d'excellentes chances de survie, soit 90%, 5 ans après leur diagnostic. Par contre, seulement 30% des patientes touchées par une TOV séreuse vont survivre plus de 5 ans après leur diagnostic; c'est donc dire que ce type de tumeur est extrêmement agressif.

1.2.2.2.2 Endométriöide

L'histotype endométriöide, quant à lui, présente les caractéristiques morphologiques de l'épithélium de l'endomètre (Figure 6B). Il représente environ 10% des cas de cancers épithéliaux de l'ovaire, mais étant donné leur nature invasive, il compte pour 20% des tumeurs malignes de l'ovaire [13, 14]. Ce type de tumeur se présente parfois de façon bilatérale et est

souvent diagnostiqué chez des femmes âgées. Le pronostic des femmes ayant une tumeur endométrioïde est meilleur que celles ayant une tumeur séreuse, car 50% des femmes vont survivre plus 5 ans après leur diagnostic.

1.2.2.2.3 Mucineux

D'un point de vue histologique, les cellules mucineuses s'apparentent à l'épithélium de l'endocol de l'utérus, et rappellent même l'épithélium intestinal (Figure 6C). Or, leur appellation provient principalement du fait que ces cellules sécrètent de la mucine. En proportion, les tumeurs mucineuses représentent environ 10% des tumeurs de l'ovaire, mais la plupart sont bénignes [13, 14]. Ces tumeurs sont caractérisées par un volume plus important, et la bilatéralité est plutôt rare. La survie à cinq ans de ces patientes est équivalent à l'histotype endométrioïde, soit 50%.

1.2.2.2.4 Cellules claires

Dans une petite proportion, les patientes peuvent aussi présenter une tumeur d'histotype à cellules claires, soit environ 5% des cas [13, 14]. Ces cellules, d'aspect large et remplies de glycogène, s'apparentent aux cellules de l'endomètre lors de la grossesse (Figure 6D). La majorité de ces tumeurs sont malignes, et bien que celles-ci sont souvent diagnostiquées à un stade précoce de la maladie, la survie après 5 ans chez les patientes présentant une maladie avancée est assez faible, soit de 15% environ. Ceci peut être expliqué par le fait que les tumeurs à cellules claires répondent très mal à la chimiothérapie, ce qui fait que les patientes atteintes de cet histotype ont un pronostic plus sombre que tous les autres histotypes.

1.2.2.2.5 Autres histopathologies

De façon plus exceptionnelle, soit dans moins de 2% des cas, les patientes peuvent aussi présenter une tumeur à cellules transitionnelles, ou de Brenner [13, 14]. Son aspect morphologique rappelle les cellules épithéliales du système excréto-urinaire. Ces tumeurs sont généralement bénignes.

Lorsque plusieurs histotypes sont identifiés dans une même tumeur, et que chacun des histotype représente au moins 10% de la tumeur, elle est identifiée comme mixte [13, 14]. Ce type histopathologique se présente dans environ 3% des cas, et le pronostic associé à ce type de tumeur reflète ceux des histotypes présents.

En dernier lieu, lorsque la tumeur ne présente aucune morphologie précise, un diagnostic de tumeur indifférenciée est prononcé. Ce type de tumeur est présent dans 20% des cas de cancers de l'ovaire, et malheureusement mène à un pronostic plutôt sombre, puisque seulement 15% des femmes survivent plus de 5 ans après avoir eu un tel diagnostic [13, 14].

1.2.2.3 Le grade

Le grade est un critère primordial pour décrire la maladie, puisqu'il représente le degré de différenciation cellulaire de la tumeur. Une échelle universelle pour établir le grade a été adoptée par la FIGO [10]. Celui-ci est attribué selon trois variables, soit l'indice mitotique (variant de 1 à 3, du plus faible au plus élevé), le nombre d'atypies cellulaires (dont le score donné varie de 1 à 3) et finalement, l'architecture histologique dominante (variant de 1 à 3, où 1= morphologie glandulaire prédominante, 2= papillaire, 3= solide). Le grade varie sur une échelle de 0 à 3; Une tumeur de grade 0 (G0), soit de type LMP, est bien différenciée, c'est-à-dire que les cellules qui la composent ont les caractéristiques morphologiques des cellules normales de l'ovaire. Or, une tumeur invasive ayant un grade 1, 2 et 3 (G1, G2 et 3) est, dans l'ordre, bien, modérément ou pauvrement différenciée; dans ce dernier cas, les cellules composant la tumeur sont méconnaissables lorsqu'elles sont comparées aux cellules normales de l'ovaire, puisqu'elles ont perdu toute caractéristique morphologique.

1.2.2.4 Le stade

Le stade est un critère important lorsqu'il est temps d'établir le pronostic de la patiente. En effet, ce dernier permet de déterminer l'étendue de la maladie [10].

Le cancer de l'ovaire est une maladie insidieuse qui bénéficie d'un emplacement idéal pour s'étendre : la cavité péritonéale. Selon l'hypothèse la plus populaire (voir la section 1.2.3.1.), les cellules tumorales vont tout d'abord prendre place dans les kystes d'inclusion de l'ovaire, encapsulés dans le stroma ovarien. Peu à peu, la tumeur viendra à atteindre la surface de l'ovaire et à rompre cette capsule, permettant aux cellules tumorales de se disperser dans la cavité péritonéale (Figure 7). Grâce à l'irrigation présente dans cette cavité par la circulation du liquide péritonéal, les cellules pourront se disséminer rapidement pour se loger dans la gouttière para-aortique, puis sous la surface de l'hémi-diaphragme droit. Elles pourront ensuite se loger sur la surface du petit et du gros intestin par le biais de l'épiploon recouvrant les

organes de la cavité abdominale, se frayant aussi un chemin par la voie lymphatique rétro-péritonéale. Cette voie, drainant l'ovaire, mène à l'envahissement des ganglions lymphatiques rétro-péritonéaux par les cellules malignes, signe que le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO) est dans un stade avancé. Finalement, les cellules tumorales peuvent emprunter la voie hématogène, ce qui leur permet de se propager à distance, soit vers les poumons, le cerveau et le foie. Un système de stadification rigoureux est donc essentiel pour bien établir le diagnostic de la patiente et évaluer son pronostic. Un tel système a été élaboré par la FIGO, donnant un score de stade variant de I à IV selon l'étendue de la maladie (Tableau I) [10]. Brièvement, un stade I est établi lorsque la tumeur est confinée aux ovaires (Figure 7). Un stade II est annoncé lorsque la tumeur s'étend aux trompes de Fallope et/ou à l'utérus. Lorsque la présence d'ascite, contenant des cellules tumorales, est détectée et que des implants tumoraux sont observés dans la cavité péritonéale, un stade III est attribué. Finalement, lorsque la patiente présente des métastases à distance, au foie, aux poumons ou au cerveau, un stade IV est établi.

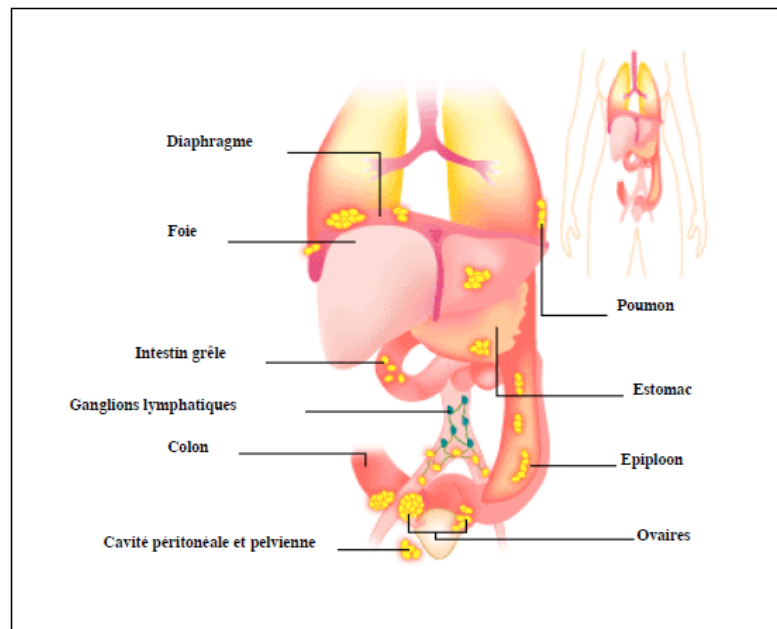


Figure 7. Patron de dissémination des cellules du cancer épithélial de l'ovaire (adapté de [http://www.cancerfacts.com/GeneralContent/Ovarian/Gen_Diagnosis.asp?CB=9])

Pour effectuer la stadification de façon efficace, le médecin traitant devra débuter en effectuant une inspection et une palpation rigoureuses de toutes les surfaces péritonéales, et cela sera fait au moment de la chirurgie. Suivront un lavage péritonéal, une hystérectomie totale, une salpingo-ovariectomie bilatérale, une épiploectomie, la prise de biopsies

péritonéales de toutes les lésions ou métastases suspectées et la prise de biopsies péritonéales aléatoires en absence de lésion macroscopique. La FIGO recommande aussi la prise d'une radiographie des poumons et du foie, permettant de révéler de possibles métastases hépatiques ou d'épanchement pleural [10].

Stade	Description et caractéristiques
I	Tumeur limitée aux ovaires (un ou les deux)
A	Tumeur limitée à un seul ovaire, capsule intacte, absence de tumeur à la surface de l'ovaire, absence de cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
B	Tumeur limitée aux deux ovaires, capsules intactes, absence de tumeur à la surface des ovaires, aucune cellule maligne dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
C	Tumeur limitée à un ovaire ou aux deux ovaires en plus de présenter une des caractéristiques suivantes: capsule rompue, présence de tumeur à la surface de l'ovaire, présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
II	Tumeur sur un ou les deux ovaires avec des extensions tumorales dans la cavité pelvienne
A	Extensions et/ou implants à l'utérus et/ou aux trompes de Fallope, absence de cellule maligne dans l'ascite et le lavement péritonéal
B	Extensions et/ou implants sur d'autres tissus pelviens, absence de cellule maligne dans l'ascite et le lavement péritonéal
C	Extensions et/ou implants présents sur des tissus pelviens, en plus de la présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavement péritonéal
III	Tumeur présente sur un ou les deux ovaires avec métastases péritonéales microscopiques confirmées à l'extérieur de la région pelvienne et/ou métastases aux ganglions proximaux
A	Métastases péritonéales microscopiques à l'extérieur de la région pelvienne
B	Métastases péritonéales macroscopiques à l'extérieur de la région pelvienne mesurant 2 cm ou moins
C	Métastases péritonéales à l'extérieur de la région pelvienne mesurant plus de 2 cm et/ou présence de métastases sur les ganglions lymphatiques proximaux
IV	Métastases à distance, soit à l'extérieur de la cavité péritonéale (foie, poumons)

Tableau I. Stadification du cancer épithélial de l'ovaire (adapté de [10])

1.2.3 Le cancer épithélial de l'ovaire et ses origines

Le CÉO et ses origines soulèvent encore plusieurs questions au sein de la communauté scientifique. Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer comment cette maladie se développe, mais aucune n'a été confirmée avec certitude. Pourrait-il s'agir d'une transformation de l'OSE, de ses invaginations et kystes d'inclusion, ou tout simplement de la transition des tumeurs BOV ou LMP? Pourrait-il aussi se développer à un site externe de l'ovaire, soit au sein des trompes de Fallope ou à partir de lésions de l'endomètre? La section suivante visera à faire la lumière sur ces différentes hypothèses.

1.2.3.1 L'OSE et les kystes d'inclusions

L'hypothèse classique pour expliquer l'origine du CÉO est sans contredit la transformation et la prolifération des cellules de l'OSE, qu'elles proviennent de la surface de l'ovaire, ou des invaginations ou kystes d'inclusion formés par cette couche de cellules épithéliales dans le stroma de l'ovaire [8, 15, 16]. En effet, comme il l'a été mentionné précédemment, à chaque cycle d'ovulation, l'OSE va se rompre et se réparer afin de permettre la sortie de l'ovule, créant ainsi des lésions à la surface de l'ovaire. Ces divers cycles de ruptures et de réparations pourraient possiblement causer des aberrations génétiques, pouvant être à l'origine de la formation d'une tumeur. Plusieurs groupes ont tenté de vérifier cette hypothèse.

Dans certains cas, des atypies cellulaires ont été remarquées à proximité des lésions tumorales visibles microscopiquement, ce qui abonde dans le sens de cette hypothèse. Les équipes de recherche tentent de récupérer l'épithélium de surface de l'ovaire de patientes ayant une histoire familiale de CÉO lors d'une ovariectomie prophylactique afin d'en retirer de possibles lésions. Cet épithélium peut aussi être récupéré sur l'ovaire controlatéral dans le cas où une patiente présenterait une tumeur épithéliale ovarienne invasive (TOV). Il peut aussi être prélevé à proximité d'une tumeur TOV sur l'OSE ou les kystes d'inclusion. Cependant, comme l'OSE n'est que faiblement attaché à la surface de l'ovaire, il est difficilement récupérable lors de la chirurgie, qu'elle soit prophylactique ou curative. Donc, les précieux fragments récupérés devront être manipulés avec soin pour poursuivre une analyse microscopique.

La création des invaginations et des kystes d'inclusion est explicable par des cellules de l'OSE qui restent prisonnières à l'intérieur du stroma suite à l'ovulation [17]. Or, plusieurs femmes multipares (ayant eu une ou plusieurs grossesses) présentent un taux plus élevé de kystes

d'inclusion que la plupart des femmes nullipares (n'ayant jamais eu de grossesse), ce qui vient à l'encontre de l'hypothèse établie. Une des raisons expliquant ce phénomène est que ces kystes proviennent plutôt de parties de l'OSE adhérees aux sites d'invagination, combinées à une prolifération localisée des cellules stromales. Peu importe leur origine, il n'en demeure pas moins que les cellules de l'OSE présentes dans les kystes d'inclusion ou les invaginations montrent des modifications au niveau morphologique pouvant mener à une transformation néoplasique. En effet, à l'instar des cellules épithéliales de l'OSE, les cellules contenues dans les kystes d'inclusion expriment plusieurs facteurs tels que l'E-cadhérine (une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire), et de façon plus importante, sécrètent du CA-125 (un marqueur sérique tumoral important). Une des raisons expliquant leur comportement pourrait être la création d'un microenvironnement favorable dans ces kystes. Ce microenvironnement, dépourvu de membrane basale, laisserait filtrer les divers facteurs de croissance, cytokines et autres molécules généralement bloquées par celle-ci. Ces éléments stimuleraient donc la prolifération des cellules de l'OSE, ce qui engendrerait la formation d'une tumeur épithéliale de l'ovaire.

1.2.3.2 Hypothèse d'un continuum dans le développement du CÉO

Une hypothèse moins classique, ne faisant pas l'unanimité dans le domaine du cancer de l'ovaire, est la possibilité d'un continuum entre les tumeurs BOV (bénigne), LMP (à faible potentiel de malignité) et TOV (invasive) [15]. À l'opposé, plusieurs chercheurs croient que ces classes tumorales sont des entités à part entière évoluant de façon tout à fait distincte. Afin de faire la lumière sur la progression tumorale, des analyses moléculaires ont été effectuées, suggérant deux pathogénèses différentes pour les tumeurs séreuses. Les tumeurs malignes de haut grade se développeraieent selon des mécanismes encore inconnus, alors que les tumeurs de bas grade se développeraieent suite à des lésions bénignes évoluant ensuite en tumeurs de type LMP.

Certains groupes ont pu démontrer par des analyses génétiques qu'il existe des différences majeures entre les tumeurs de haut et bas grade. À titre de d'exemple, des mutations KRAS et BRAF, membres de la voie de signalisation des MAP kinases, ont été détectées dans les lésions bénignes et LMP séreuses en plus grande proportion que dans les tumeurs séreuses de haut grade, où elles sont plutôt rares [18]. Les gènes HER2 (codant pour un récepteur de facteurs de

croissance épidermique) et AKT (codant pour une famille de molécules essentielles à la signalisation cellulaire), tous deux actifs dans la prolifération et la survie cellulaires, sont souvent surexprimés dans les tumeurs invasives de haut grade alors qu'ils le sont moins fréquemment dans les tumeurs de bas grade [15]. Aussi, les chercheurs ont pu observer que le gène p53, un suppresseur de tumeur, est muté dans environ 80% des tumeurs invasives de haut grade, alors qu'il ne l'est que rarement dans les tumeurs LMP. Un des facteurs génétiques importants dans la progression des cancers de l'ovaire est la présence d'une mutation des gènes BRCA 1/2. À cet effet, il a été démontré que les tumeurs LMP sont associées à une fréquence plus faible de ce type de mutation, contrairement aux tumeurs TOV [15]. Bref, ces évidences suggèrent une origine moléculaire différente, propre à chaque classe tumorale. La seule histopathologie montrant clairement un continuum dans son développement est la tumeur mucineuse. Celle-ci émerge à partir d'une tumeur bénigne, se transformant ensuite en tumeur LMP, pour finalement évoluer en tumeur mucineuse TOV [19].

1.2.3.3 Le CÉO et les trompes de Fallope

Des études récentes ont proposé une hypothèse alternative à l'hypothèse classique, soit que le CÉO dériverait des trompes de Fallope. Cette observation, faite principalement chez des femmes porteuses de mutations BRCA1 ayant subi une ovariectomie prophylactique, montre la présence de lésions atypiques ou de carcinomes *in situ* à même les trompes de Fallope des patientes [20]. Cela porte donc à croire que BRCA1 aurait un rôle à jouer dans la formation de ces tumeurs, et les résultats futurs pourraient, quant à eux, valider cette hypothèse.

1.2.3.4 Le CÉO et l'endométriose

L'endométriose est un désordre gynécologique bénin caractérisé par la prolifération de tissus de l'endomètre de façon ectopique sur les surfaces adjacentes à l'utérus que ce soit sur les trompes de Fallope, le vagin, l'intestin, la vessie ou les ovaires. Selon une hypothèse récente, différant de l'hypothèse classique, le CÉO pourrait dériver de ces lésions d'endométriose, en particulier les tumeurs d'histopathologie endométrioïde et à cellules claires [15, 20].

1.2.4 Épidémiologie/statistiques

Le cancer de l’ovaire est le cancer gynécologique le plus meurtrier, avec 1 600 décès annuels au Canada (Figure 8B). Il est aussi le septième en importance chez la femme au Canada; 2 500 femmes seront touchées par ce cancer en 2009 (Figure 8A) [21].

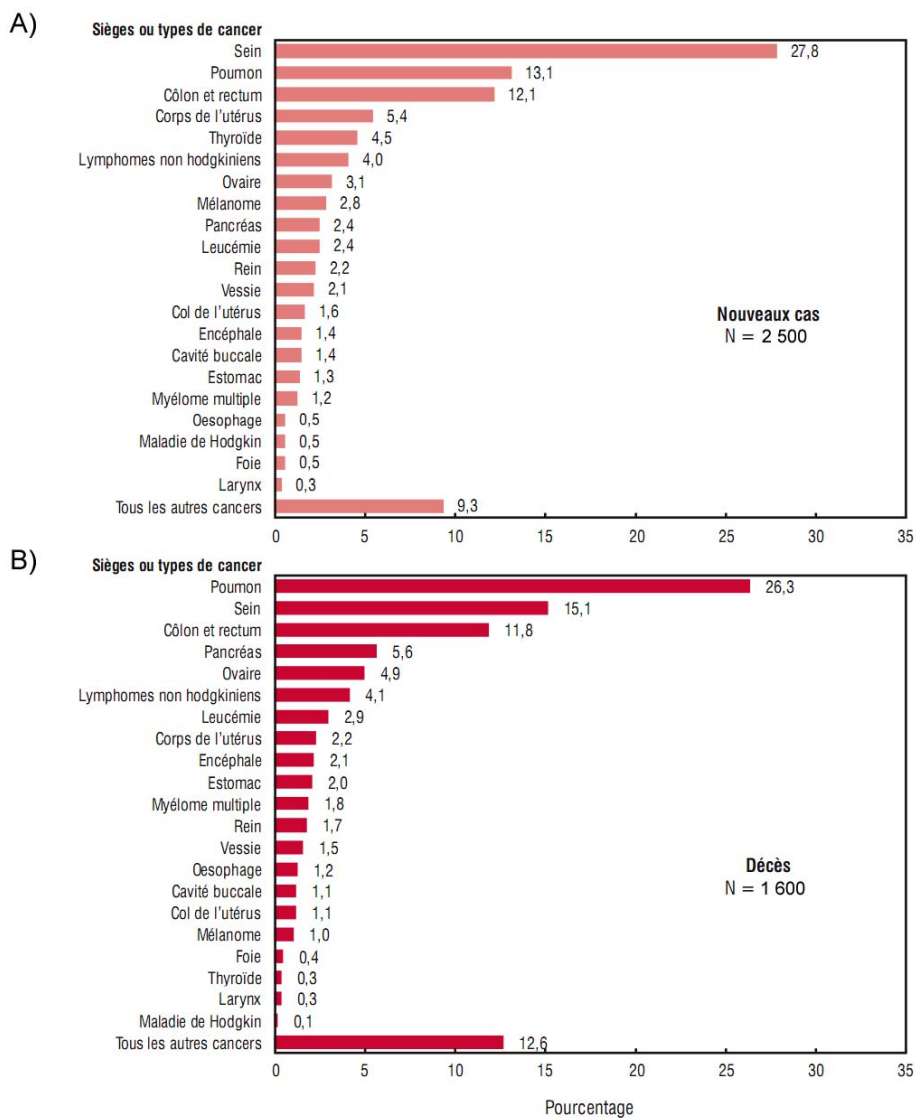


Figure 8. Statistiques relatives au cancer de l’ovaire au Canada (adapté de [21])

A) Incidence

B) Mortalité

Le cancer de l’ovaire touche principalement les femmes d’âge moyen et âgées. Les taux d’incidence les plus élevés sont observés en Amérique du Nord et en Europe du Nord, mais sont plus faibles en Afrique et en Asie.

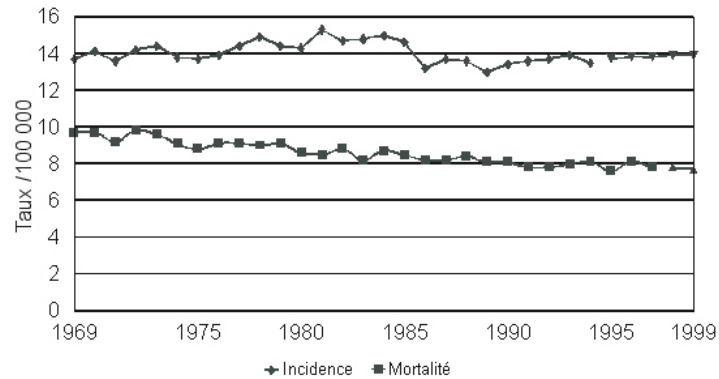


Figure 9. Incidence et mortalité relatives au cancer de l’ovaire à travers les années au Canada (Tiré de [<http://aspc.qc.ca>])

En regardant de plus près l’évolution de la maladie au cours des dernières années, il est possible de remarquer que les taux d’incidence et de mortalité relatifs au cancer de l’ovaire au Canada sont restés plutôt stables (Figure 9). Un des facteurs expliquant cette observation découle du fait que les méthodes de dépistage sont inadéquates, ce qui fait en sorte que les femmes sont souvent diagnostiquées d’un cancer de l’ovaire de façon tardive suite à l’apparition de la maladie. De plus, un haut taux de mortalité est associé à cette maladie, puisque les traitements administrés ne sont pas totalement efficaces, et que la majorité des femmes touchées vont en décéder. Nous y reviendrons plus tard dans la section 1.2.6.

1.2.5 Facteurs de risque

Au Canada, c’est 1-2% des femmes qui seront touchées par un cancer de l’ovaire au cours de leur vie [21]. Or, ce nombre peut augmenter si les femmes sont exposées à divers facteurs de risques supplémentaires, dont voici une description plus exhaustive.

1.2.5.1 L’hérédité et les facteurs génétiques

L’hérédité est un facteur de risque bien connu dans le développement de plusieurs cancers; le cancer de l’ovaire n’y fait pas exception. En effet, ce facteur est impliqué dans 5 à 10% des cas de CÉO, et les facteurs génétiques sont divisés en trois classes distinctes [22, 23].

En premier lieu, viennent les cancers héréditaires dits spécifiques à l’ovaire. Par exemple, une femme ayant un membre de sa parenté immédiate (fille, sœur, mère) atteinte par un cancer de l’ovaire voit son risque d’en développer un augmenter de 4-7%, et ce risque augmente encore si plusieurs d’entre elles sont atteintes par la maladie [22]. Ces cancers seraient liés à la mutation du gène BRCA1. Viennent ensuite les cancers héréditaires sein-ovaire. Dans la plupart des cas, c’est le gène BRCA1 qui est muté, mais il est possible de voir une mutation du gène BRCA2 dans de plus rares occasions. Rappelons que ces deux gènes ont un rôle crucial à jouer dans la réparation des dommages à l’ADN, et qu’une mutation de ceux-ci entraîne un moins bon contrôle de l’apoptose et du suivi des points de contrôle du cycle cellulaire. Les femmes porteuses de mutations BRCA 1/2 voient leur risque de développer un cancer du sein grimper à 35-85%, et leur risque de développer un cancer de l’ovaire à 15-60% [22]. Finalement, un troisième facteur héréditaire peut être responsable du développement des tumeurs de l’ovaire, soit les défauts des gènes de réparation des mésappariements du syndrome de Lynch ou du cancer du colon héréditaire non polyposique (HNPCC). Ces défauts causent de l’instabilité génétique rendant les cellules plus vulnérables à l’acquisition de mutations [23]. Donc, les patientes atteintes d’un de ces syndromes voient leur risque de développer un cancer de l’ovaire augmenter à environ 10%, en plus d’avoir un risque de développer un cancer du colon et de l’endomètre d’environ 40-60% [23].

1.2.5.2 L’âge

Comme c’est le cas dans la plupart des cancers, le risque de développer un cancer de l’ovaire est proportionnel à l’âge; son incidence augmente jusqu’à atteindre son apogée chez les femmes de 75-80 ans [22]. Le CÉO touche en plus grande proportion les femmes péri- ou post-ménopausées, et il est plus rare d’observer son développement chez des femmes âgées de moins de 40 ans.

1.2.5.3 Les habitudes de vie et l’alimentation

Le corps humain est exposé à plusieurs facteurs environnementaux qui peuvent s’avérer néfastes ou bénéfiques pour la santé globale. Le risque de développer un CÉO n’échappe pas à cette règle. En effet, il a été démontré que l’incidence varie en fonction du rang social, de l’ethnie et du pays auxquels la femme est associée. Ceux-ci définissent l’environnement dans lequel la femme évolue, autant dans son alimentation que dans ses habitudes de vie [22]. Par

exemple, il a été démontré qu'une faible consommation de fruits et de légumes, associée à une forte consommation de viandes et de gras d'origine animale pouvait accroître le risque de développer un CÉO [24]. Ces habitudes alimentaires néfastes causeraient des déséquilibres hormonaux et iraient jusqu'à annuler les effets antioxydants de plusieurs aliments. Il n'y a toutefois pas de corrélation claire entre l'indice de masse corporelle et le risque de développer un CÉO, et le tabagisme ne semble pas non plus avoir un impact direct [24].

Toutefois, l'application de talc dans la région péri-génitale, ainsi que l'exposition aux polluants industriels provoqueraient une inflammation propice au développement du CÉO. Ces molécules potentiellement mutagéniques causeraient des dommages cellulaires, possiblement à l'origine de cette inflammation [25].

1.2.5.4 L'ovulation

Lors de l'ovulation, la mince couche de cellules à la surface de l'ovaire, l'OSE, viendrait à se déchirer, puis se réparer. Ces cycles répétés de ruptures et de réparations seraient à la source d'aberrations génétiques et épigénétiques potentielles, pouvant mener au développement du CÉO. Cette hypothèse avant-gardiste, émise par Fathalla en 1971, s'avère être exacte et a été confirmée par plusieurs études [26]. En premier lieu, il faut constater que le nombre d'ovulations chez la femme est proportionnellement beaucoup plus élevé que pour toute autre espèce animale, chez qui le CÉO est pratiquement inexistant. En effet, chez la plupart des espèces animales, l'ovulation ne s'effectue que dans une certaine période de l'année ou en présence d'un mâle.

Il a été démontré, par de nombreuses études, que la diminution des ovulations, que ce soit par les grossesses, la prise d'anovulants ou l'allaitement, était associée à une réduction du risque de développement du CÉO [27]. À l'opposé, les religieuses ou les femmes célibataires voient leur risque augmenter. La prise de traitements d'hyperstimulation ovarienne chez les femmes souffrant d'infertilité augmente aussi ce risque [23].

1.2.5.5 Les hormones de remplacement et la ménopause

L'hormonothérapie, bien qu'elle ait un impact positif sur certains aspects de la ménopause, n'aurait pas que des côtés positifs chez la femme. En effet, les thérapies d'hormones de remplacement iraient jusqu'à doubler le risque de développer un cancer de l'ovaire [27].

L'hypothèse soutenant cette théorie serait que ces hormones exogènes engendreraient une réponse proliférative des ovaires [28]. De façon plus générale, il a été démontré que les femmes ayant eu leurs règles tôt ou ayant une ménopause plus tardive ont aussi un risque plus élevé de développer le CÉO, puisque le nombre de cycles d'ovulation est plus élevé au cours de leur vie.

1.2.5.6 Les gonadotrophines

La LH et la FSH, ces hormones essentielles à la tenue du cycle menstruel et ovarien, pourraient jouer un rôle dans le développement d'un cancer de l'ovaire. En effet, l'hypothèse des gonadotrophines dicte qu'une trop grande exposition à ces hormones augmenterait de façon non-souhaitable une surproduction d'œstrogènes, menant à une prolifération exagérée de l'OSE et donc de possibles transformations cellulaires menant à la formation d'une tumeur [22]. Cette hypothèse se base sur l'observation faite chez les femmes plus âgées, puisque c'est lors de la ménopause que les niveaux de gonadotrophines sont à leur maximum, ce qui concorde avec l'apparition de tumeurs ovariennes [29]. L'autre situation où les femmes sont exposées de façon importante aux gonadotrophines est lors d'une thérapie prescrite de fertilité, situation ayant elle aussi été corrélée avec un plus fort risque de développer un cancer ovarien. À l'opposé, la grossesse ou la prise d'anovulants font chuter les taux de gonadotrophines circulantes, ce qui concorde aussi avec l'observation d'une proportion beaucoup plus faible de tumeurs ovariennes chez ces groupes [27].

Cette théorie est tout de même facilement contredite par l'observation que certaines femmes maintenant de très bas niveaux de LH et FSH développent tout de même des cancers de l'ovaire, et que les femmes allaitant leur enfant maintiennent un taux élevé de FSH. Des études plus approfondies permettraient d'infirmier ou de confirmer cette hypothèse [29].

1.2.6 Caractéristiques cliniques de la maladie

1.2.6.1 Prévention

Certaines habitudes de vie peuvent diminuer le risque global de développer un cancer de l'ovaire. Comme il n'y a, à ce jour, pas de façon efficace de dépister la maladie, les médecins peuvent conseiller à leurs patientes quelques éléments pouvant possiblement réduire leur

risque [30]. Tel que mentionné précédemment, les contraceptifs oraux aideraient à réduire le risque de développer un cancer de l'ovaire. Donc, lorsqu'une patiente plus jeune se questionne sur le choix de contraceptif à utiliser, celle-ci pourrait opter pour cette méthode et ainsi bénéficier des avantages autres que le contrôle de la grossesse; toutefois, d'autres facteurs moins avantageux, tel que l'augmentation du risque de développer un cancer du sein, doivent être pris en considération afin de faire un choix éclairé.

Dans le cas des femmes avec des antécédents familiaux de cancer du sein et/ou de l'ovaire, des tests génétiques peuvent être effectués afin d'identifier les mutations sur les gènes BRCA, qui se présente comme un facteur augmentant les risques de développer un cancer de l'ovaire. Advenant le cas où une mutation serait présente, une ovariectomie prophylactique pourrait être envisagée, ce qui éliminerait presque totalement ce risque. Pour les patientes ayant déjà assouvi leur désir d'avoir des enfants, qui désirent une contraception permanente, l'hystérectomie ou la ligature des trompes s'avèrent être des alternatives très intéressantes, puisqu'elles réduisent elles aussi le risque d'apparition de la maladie [24].

1.2.6.2 Symptômes

Le cancer de l'ovaire porte un surnom plutôt révélateur de son caractère insidieux : le tueur silencieux (*silent killer*). Il est nommé ainsi en raison de l'absence de symptômes à un stade précoce de la maladie [30]. À un stade plus avancé, les femmes commencent toutefois à ressentir certains symptômes, sans que ceux-ci ne soient spécifiques, comme une douleur abdominale, des problèmes intestinaux, un saignement vaginal et/ou un gonflement de la région pelvienne. Dans le cas où une femme présente ces symptômes, des tests diagnostiques devraient être considérés, en plus des divers tests de dépistages, afin d'infirmier ou de confirmer l'hypothèse de la présence d'un cancer de l'ovaire.

1.2.6.3 Dépistage et diagnostic

Comme la survie des patientes diagnostiquées au stade IA est excellente (85%), contrairement à 18% pour les stades IV, le dépistage précoce de la maladie mène à une diminution de la mortalité associée au CÉO [30]. Celui-ci doit toutefois s'appuyer sur un test de dépistage efficace qui, de façon optimale, est à la fois sensible, spécifique, facile à réaliser et peu coûteux.

Les méthodes présentement utilisées permettent de suggérer la présence de la maladie, sans toutefois être assez puissantes pour émettre un diagnostic, et elles seront décrites ci-dessous. Pour émettre un diagnostic, une laparotomie, qui consiste à pratiquer une ouverture de l'abdomen pour y prélever des tissus, devra être exécutée.

Le médecin devrait voir chaque patiente de façon annuelle afin d'opérer un examen gynécologique. À ce moment, il recherchera une masse au niveau des ovaires. Cet examen pelvien est une méthode de dépistage utilisée de façon courante, bien qu'elle ait une valeur limitée. En effet, l'examen pelvien ne parvient à identifier que 67% des masses de 4 à 6 centimètres, lui conférant une sensibilité plutôt faible [30]. Ce type d'examen est donc jugé inadéquat comme méthode de détection. S'il y a un doute qu'un cancer de l'ovaire s'est développé, le test sérique CA-125 pourra être effectué, combiné à une échographie transvaginale.

Le CA-125 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire contenu dans le sérum. Elle est reconnue par l'anticorps murin OC-125. Elle est identifiée comme un marqueur tumoral dans le dépistage du cancer de l'ovaire [31]. En effet, les niveaux de CA-125 sont plus élevés que 35 U/mL, considéré comme le niveau normal, dans 85% des cancers ovariens. Le CA-125 ne représente toutefois pas un marqueur de dépistage efficace. Seulement la moitié des patientes avec un CÉO de stade I ont un taux élevé de CA-125 sérique. De plus, le CA-125 peut être élevé par la présence d'autres maladies, incluant l'endométriose, l'adénomyose, les maladies du foie, la pancréatite, la péritonite, ou de troubles bénins. De façon plus importante, le CA-125 peut aussi se montrer élevé dans d'autres types de cancer, comme les adénocarcinomes endométriaux, ainsi que les carcinomes hépatiques, pancréatiques, colorectaux ou mammaires. Ces faits démontrent avec certitude que le CA-125 ne représente pas un marqueur de dépistage efficace, dû à un manque de spécificité [10]. Par exemple, il pourrait alarmer des patientes ayant un haut niveau de CA-125 qui ne sont atteintes que d'un BOV, alors que dans le cas inverse, il pourrait faillir à identifier un CÉO chez une patiente au stade précoce de la maladie et/ou dont la tumeur n'exprime pas le CA-125. Pour éviter ces situations, des chercheurs se sont tournés vers la combinaison possible du CA-125 avec d'autres marqueurs sériques. Des études ont démontré que le CA-125 avait une valeur plus indicative s'il était couplé à d'autres marqueurs, afin d'augmenter sa spécificité et sa valeur prédictive positive

[32]. Toutefois, ces études n'ont été réalisées qu'à court terme, sur une cohorte de patientes réduite, et augmenterait de façon considérable le coût du test de dépistage.

Lors de l'échographie transvaginale, le médecin procède à l'insertion d'une sonde dans le vagin pour vérifier la présence de zones plus sombres, pouvant indiquer la présence de cancer [30]. Il balayera, par les ondes sonores, les parois du vagin, l'utérus, les trompes de Fallope ainsi que les ovaires.

Advenant le cas où un de ces tests mène à un doute raisonnable de la présence d'un cancer de l'ovaire, et seulement lorsqu'il est fortement suspecté, le médecin pourra alors aller prélever des biopsies et/ou des fluides, que ce soit par laparoscopie ou laparotomie, et ensuite procéder au diagnostic.

1.2.6.4 Traitements

Les traitements offerts aux patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire sont variables, dépendamment de l'état de progression de la maladie. Bien entendu, le but est d'orienter le traitement de façon à offrir le meilleur pronostic qui soit afin de prolonger la durée de vie de la patiente et éviter la récurrence de la maladie, deux aspects qui s'avèrent problématique dans le cas du cancer de l'ovaire.

Chaque patiente est prise en charge de façon individuelle, selon son âge et le type de maladie qu'elle a développé [30]. Dans le cas d'une patiente jeune ayant un cancer BOV (bénin), le chirurgien tentera de faire une chirurgie conservative afin de préserver la fertilité de la patiente. Si la tumeur est plus petite que 8-10 cm, il procèdera par laparoscopie [33]. Toutefois, advenant le cas où la patiente aurait une tumeur de volume supérieur à 10 cm, le chirurgien effectuera une laparotomie, et tentera de retirer le kyste uniquement. Si la patiente est plus âgée, le chirurgien pourra faire l'ablation d'un ou des deux ovaires, puisque la conservation de la fertilité est moins importante, surtout si la femme a eu tous ses enfants. Toutefois, il faut que le médecin prenne en compte les bénéfices et les risques engendrés par cette procédure sur la santé globale de la patiente. Par exemple, une femme jeune, dans la vingtaine ou la trentaine, aurait une ménopause prématurée qui serait évitable en laissant l'ovaire controlatéral sain en place.

La plupart des patientes qui présentent une tumeur de type LMP sont jeunes; la préservation de la fertilité est donc un aspect clé lors du traitement [30]. Le chirurgien procédera donc de la même façon qu'avec une patiente BOV, qui consiste à faire une chirurgie conservatrice. Toutefois, l'ovaire collatéral devra être rigoureusement inspecté et une stadification précise devra être exercée.

Lors de la stadification de la tumeur, advenant le cas où un bas stade est annoncé (I ou II), ou si la cytoréduction est optimale (i.e. que la masse tumorale résiduelle est inférieure à 1 cm de diamètre), la chimiothérapie ne s'avère pas nécessaire. Dans le cas contraire, elle est fortement recommandée.

Dans le cas où un cancer ovarien avancé est diagnostiqué (TOV, stade III-IV), le chirurgien devra effectuer une cytoréduction, une stadification complète par laparotomie, pour ensuite pratiquer une lymphadénectomie (c'est-à-dire la résection des ganglions lymphatiques et/ou des vaisseaux lymphatiques), un prélèvement de biopsies et une ronde de chimiothérapie [30]. Les types d'agents utilisés en traitements se divisent en deux catégories, soit les taxanes, qui stabilisent les microtubules pour empêcher la division cellulaire, et les platines, qui sont des agents alkylants de l'ADN, qui bloque sa réplication. En général, deux agents chimiothérapeutiques appartenant chacun à une catégorie sont couplés afin d'augmenter l'efficacité du traitement et réduire le risque de résistance [34]. La chimiothérapie peut être administrée de façon intraveineuse, mais de plus en plus les médecins l'administrent de façon intra-péritonéale, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration de l'agent à laquelle la tumeur est exposée.

Si le cancer est trop avancé pour que le chirurgien opère la patiente, il débute le traitement en lui prescrivant une première ronde de chimiothérapie pour que le volume tumoral diminue [30]. Ensuite, il procède à l'opération si nécessaire.

Le choix de la radiothérapie dans le traitement du cancer de l'ovaire est encore controversé [35]. En effet, le choix de l'administration de radiothérapie et des doses à administrer est plutôt imprécis. De plus, il est difficile de cibler avec précision quelles patientes pourraient bénéficier d'une telle intervention. Dans certains cas, elle peut présenter un bénéfice pour les patientes ayant une maladie résiduelle minime, ou être administrée de façon palliative. Toutefois, elle ne

représente pas une alternative intéressante dans la plupart des cas de cancers de l'ovaire, puisqu'il y a une toxicité intestinale beaucoup trop grande associée à ce type de traitement.

1.2.6.5 Suivi des patientes

Le médecin traitant devra s'assurer de faire un suivi rigoureux des patientes ayant été diagnostiquées et traitées pour un cancer de l'ovaire, afin de surveiller les signes de récurrence [30]. Durant la première année suivant les traitements reçus, le médecin rencontrera la patiente tous les trois mois. Pendant les années suivantes, ces rencontres seront plutôt espacées aux quatre à six mois, pour ensuite être effectuées de façon annuelle à partir de la cinquième année. Les rencontres se déroulent principalement selon le protocole suivant : le médecin effectue en premier lieu une révision du dossier clinique de la patiente et lui fait subir un examen physique complet, incluant la palpation mammaire, pelvienne et rectale. Il s'assurera ensuite de faire des prélèvements sanguins selon un horaire régulier afin de procéder à des analyses sériques du marqueur CA-125, afin de détecter toute fluctuation à la hausse de la concentration du marqueur, qui pourrait laisser présager une récurrence et/ou un traitement inefficace. Le médecin, suite à ces examens, peut prendre la décision d'exercer des tests par imagerie, tels qu'une échographie transvaginale ou pelvienne, un CT (*computed tomography*) scan, un PET (*positron emission tomography*) scan ou une IRM (imagerie par résonance magnétique), si une masse est suspectée.

Seulement une mince proportion des femmes diagnostiquées à un stade avancé de la maladie réussira à compléter leur traitement tout en y répondant de façon adéquate [36]. La majorité (85%) des patientes vont se retrouver devant une situation beaucoup moins souhaitable : la rechute. Bien que la progression de la maladie lors de la récurrence se manifeste à plusieurs niveaux, elle est mesurable, entre autres, par différents critères de progression. Ces critères sont l'augmentation du niveau sérique de CA-125, que ce soit au-delà d'un seuil déterminé (soit d'environ 100 U/mL) ou plutôt de façon séquentielle à travers un intervalle de temps, une augmentation de la masse tumorale de 25% ou plus en taille, et finalement une apparition de nouvelles lésions chez la patiente [37]. Classiquement, les lésions du cancer de l'ovaire vont réapparaître sous forme d'une carcinomatose diffuse dans la cavité péritonéale, et au niveau de l'apex vaginal sous forme de petites masses pelviennes.

La récurrence est définie comme la réapparition de la tumeur à la suite d'une réponse initiale complète à une chimiothérapie de première ligne [30, 37]. Une maladie dite résistante est diagnostiquée par le médecin lorsque celle-ci réapparaît sous forme de tumeur avant 6 mois après le début du traitement. Passé ce seuil, la maladie est plutôt considérée comme sensible. Lorsqu'une tumeur répond partiellement à une thérapie initiale et qu'il y a une augmentation du niveau de CA-125, la maladie est caractérisée comme persistante. Toutefois, lorsque la tumeur progresse durant la phase initiale de la thérapie, elle est qualifiée de progressive ou réfractaire. Dans les deux derniers cas, la patiente peut se voir offrir un traitement de chimiothérapie de deuxième ligne, qui comprend un agent de type platine ou paclitaxel [30, 37]. Les patientes réfractaires ont aussi la possibilité de s'inscrire dans un essai clinique ou d'essayer d'autres agents chimiothérapeutiques, par exemple la gemcitabine, le topotécan ou la doxorubicine liposomale. Ces traitements ne sont pas considérés comme curatifs; ils ont plutôt comme objectif de contrôler la maladie de façon à améliorer la qualité de vie des patientes.

1.2.6.6 Pronostic

Les facteurs pronostiques sont essentiels pour la prédiction de l'évolution de la maladie [30, 38]. Ceux-ci permettent, entre autres, une meilleure prise en charge de la patiente lorsque son diagnostic est effectué. Par exemple, une patiente atteinte d'une tumeur de type LMP a un excellent pronostic, traduit par une survie à cinq ans de 95%. Il est juste d'affirmer qu'un stade précoce de la maladie, une histopathologie de type séreuse ainsi qu'un jeune âge au diagnostic constituent des éléments de pronostic favorable [38]. Un autre facteur permettant de déterminer le pronostic d'une patiente est son grade. Alors que la survie à cinq ans des patientes atteintes d'un cancer de grade 1 est de 90%, celle-ci chute à 85% à grade 2, et plus drastiquement à 45% pour un grade 3 [38]. La cytoréduction optimale est l'un des facteurs clé dans l'établissement du pronostic [39]. En effet, la maladie résiduelle suite à la chirurgie est inversement proportionnelle à la survie des patientes. Ensuite, vient le nombre de chromosomes d'une cellule; les patientes ayant une tumeur diploïde ont une meilleure chance de survie à cinq ans que les patientes ayant une tumeur aneuploïde, puisque ces dernières ont un nombre anormal de chromosomes, dû à des mutations génétiques et des mitoses déficientes. Cette aneuploïdie compose un risque puisque, advenant le cas où un chromosome

lourdement muté perdrait sa copie normale, aucun « sauvetage » par cette dernière ne pourrait être effectué.

Toutefois, les patientes atteintes d'un TOV ont un pronostic beaucoup plus sombre; seulement 30% de ces patientes survivront à cinq ans [38, 39]. Dans ces cas plus avancés, plusieurs autres facteurs peuvent arriver à influencer le pronostic des patientes, notamment le jeune âge, une histopathologie autre que mucineuse ou à cellules claires, une bonne condition physique générale, l'absence d'ascite, un stade précoce et une maladie résiduelle peu ou pas présente suite à la cytoréduction, pour ne nommer que ceux-là.

1.3 Modèles d'étude dans le CÉO

Plusieurs modèles sont à la disposition des chercheurs afin d'étudier le cancer de l'ovaire. Ceux-ci varient selon leur provenance, leur application, et leur proximité de la maladie telle qu'elle se présente de façon physiologique chez la femme.

Le premier modèle est le tissu ovarien, sain ou tumoral, qui provient d'une patiente suite à une chirurgie. Il s'agit du modèle qui se rapproche le plus du cancer de l'ovaire. Il est possible d'en extraire du matériel, soit l'ADN, l'ARN et les protéines, afin de procéder à des analyses moléculaires. Ensuite, il présente une composition cellulaire complexe. Or, il présente une limitation importante, puisque aucun ajout de matériel génétique ne peut être effectué. De plus, le tissu est disponible en quantité limitée, ne peut pas être amplifié et n'est pas prolifératif.

En contre partie, une partie des tissus ovariens récoltés chez les patientes peut être utilisée pour élaborer le deuxième modèle d'étude : les cultures primaires. Celles-ci sont obtenues par deux techniques principales, soit par le grattage du tissu tumoral ou par la digestion du tissu par des collagénases [40, 41]. Ce modèle est fort utile, puisqu'il permet la multiplication des cellules tumorales en culture; Cependant, bon nombre de ces cultures ne sont pas immortelles, donc elles ne sont utilisables que pour un court laps de temps, limitant les expériences pouvant être effectuées sur celles-ci. De plus, elles sont souvent hétérogènes, puisque les tissus contiennent d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes.

Toutefois, il arrive que certaines de ces cultures persistent à travers les passages; il s'agit alors du modèle des lignées cellulaires. Ces lignées ont la caractéristique d'être immortelles, et peuvent être dérivées de tumeurs solides ou des cellules tumorales flottant dans l'ascite de la patiente. Au laboratoire, plusieurs lignées cellulaires provenant de patientes chimiothérapie-naïves ayant diverses histopathologies ont été établies et caractérisées [42, 43]. Bien que le microenvironnement en culture ne soit pas parfaitement représentatif de la maladie, ce modèle constitue tout de même un excellent outil de travail en laboratoire, puisqu'il est très représentatif de la tumeur d'origine, il est exploitable sur une longue période, et il est possible d'y insérer du matériel génétique.

Alors que les modèles de cultures primaires ou de lignées établies en culture constituent une représentation en 2 dimensions de la maladie, le modèle des sphéroïdes se rapproche de la

maladie physiologique en offrant la possibilité de créer des structures cellulaires en 3 dimensions. Ce modèle, élaboré au laboratoire, recrée de façon plus représentative l'environnement original des tumeurs. Le principe est simple; les cellules sont déposées dans un pétri dans des gouttelettes inversées, puis incubées pendant quelques jours. Ces cellules vont entrer en contact et former des structures plus complexes appelées sphéroïdes, grâce aux interactions intercellulaires [44].

Dans une autre catégorie vient le modèle des xénogreffes. Celui-ci, contrairement aux modèles décrits ci-haut, constitue un véritable modèle *in vivo*. Dans ce modèle, les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire sont injectées dans des souris immunodéficientes, ce qui entraînera la formation de tumeurs dans la souris, que ce soit de façon intra-péritonéale ou sous-cutanée. Le microenvironnement de la tumeur est considéré comme celui se rapprochant le plus de celui qui est présent chez l'humain; la majeure différence réside toutefois en l'absence du système immunitaire de la souris, puisque le système immunitaire humain pourrait avoir une influence négative sur le développement tumoral, ce qui est évité chez la souris. Or, l'immunodéficiência est nécessaire pour que les cellules injectées ne soient pas éliminées par la souris, mais qu'elles puissent bien former des xénogreffes.

1.4 Projet de maîtrise

1.4.1 Étude antérieure

Une étude antérieure faite au laboratoire visait à identifier les différences épigénétiques entre les tumeurs séreuses LMP et TOV, afin de mieux comprendre le CÉO et d'identifier des candidats potentiels capables de prédire le pronostic de la patiente [45]. L'intérêt de la comparaison entre ces deux groupes est alimenté par la grande différence de comportement de ces tumeurs et de leur évolution clinique opposée.

Une analyse sur une micropuce à ADN de type HuFL a été conduite, où des échantillons provenant de tissus ou de cellules caractérisés comme étant de type séreux LMP ou TOV ont été comparés. Après analyses statistiques, plusieurs candidats ont montré une différence considérable dans leur niveau d'expression génique entre les deux groupes. Ensuite, la liste raffinée de candidats, selon la disponibilité des anticorps commerciaux et la fonction biologique, a été soumise à une immunohistochimie sur un micro-étalage de type séreux [46]. Quelques candidats ont démontré un intérêt particulier pour la prédiction du pronostic, dont la protéine Cks1 (*CDC28 protein kinase regulatory subunit 1*), élément régulateur du cycle cellulaire. Cette protéine est surexprimée dans les tumeurs TOV, alors que son expression est presque nulle dans les tumeurs LMP. Les conclusions de cette étude suggèrent que l'expression seule de Cks1 est capable de prédire la survie des patientes à un stade avancé de la maladie. Mon projet de maîtrise a été consacré à l'implication de Cks1 dans le développement du cancer épithélial de l'ovaire au niveau moléculaire.

1.4.2 Cks1

1.4.2.1 Introduction sur la famille Cks et structure

Le gène codant pour Cks1 est situé sur le chromosome 1q21.2 et code pour une protéine de 79 acides aminés, ayant un poids moléculaire de 9 kDa [47]. Cette protéine fait partie de la sous-famille des Cks, qui regroupe des petites protéines de 9-18 kDa connues pour réguler le cycle cellulaire. À l'origine, les protéines Cks furent découvertes chez la levure (CDC28) comme suppresseurs de mutation [48]. Elles sont structurellement et fonctionnellement conservées chez les eucaryotes. Chez l'humain, deux membres composent cette sous-famille, soit Cks1 et Cks2. La structure cristalline des homologues chez l'humain a été élucidée dans les dernières

années [49] (Figure 10). Cela a permis de révéler qu'elles se présentent sous deux formes : monomère ou dimère. Les protéines Cks monomériques présentent quatre feuillets β anti-parallèles et deux hélices α . De plus, dans le cas de Cks1, l'extrémité carboxy-terminale démontre une ressemblance marquée avec l'extrémité amino-terminale des Cdks. La région-clé au cœur du repliement des Cks réside dans une région charnière (*hinge*) β , comprenant les résidus HxPEPH. Cette région est conservée à travers les membres de la famille Cks. Lorsque cette région se replie, les protéines Cks se présentent sous forme monomérique, alors qu'avec la région charnière β étendue, elles dimérisent. La dimérisation se fait par l'échange de feuillets β , un type d'interaction protéine-protéine plutôt rare.



Figure 10. Structure cristalline des protéines de la famille Cks (Tiré de [49])

1.4.2.2 Rôles physiologiques

Les rôles respectifs des protéines Cks sont encore peu connus. Découvertes au milieu des années 1980, ces protéines ont initialement été associées aux complexes cycline-CDK comme étant des sous-unités qui interagissaient avec elles [50]. Un rôle au cœur du cycle cellulaire était alors envisagé. Donc, les scientifiques ont poursuivi dans cette voie pour tenter d'élucider le rôle précis des Cks. Toutefois, à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, aucun organisme

ne nécessite Cks1 pour l'activité de ses complexes cycline-CDK [49]. Cela a donc lancé une toute nouvelle quête à la découverte des fonctions des Cks. Les études réalisées ont surtout mis l'emphase sur Cks1, qui est au cœur de cette thèse, donc c'est de ses rôles dont il sera question dans les prochaines sections.

Au commencement, les premiers indices indiquaient que Cks1 accélère la phosphorylation de plusieurs substrats de Cdk1, incluant Cdc25, Wee et d'autres composants du complexe promoteur de l'anaphase chez le *Xenopus* [51-53]. De plus, il a été noté que la perte de fonction de Cks1 menait à des défauts mitotiques chez les espèces de levure *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces*, en plus des œufs de *Xenopus* et *Caenorhabditis elegans* [51-53]. Il avait aussi été observé, chez la levure, que Cks1 pourrait jouer un rôle dans la sortie de la mitose, en participant à l'ubiquitination de la cycline B, la menant tout droit vers le protéasome pour sa dégradation [52].

1.4.2.2.1 Rôle de Cks1 dans la progression du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une série d'événements prenant place au sein de la cellule et qui permettent sa réplication en deux cellules distinctes [5, 54]. Il est divisé en quatre phases principales, soit les phases G1, S, G2 (composant l'interphase) et M (mitose), et est hautement régulé (voir figure 11). Sa régulation est assurée par des complexes composés de deux types de protéines, soit les cyclines et les CDK (*cyclin-dependent kinases*) [55]. Ces deux protéines ont besoin de la présence de l'une et l'autre pour accomplir leur fonction respective au sein du cycle cellulaire, soit de faire progresser la cellule d'une phase à l'autre. En effet, la CDK active sa cycline associée par une phosphorylation, ce qui permet l'activation de cet hétérodimère et, par le fait même, la progression du cycle cellulaire.

Toutefois, l'activation des complexes CDK-cycline est elle-même régulée par une autre famille de protéines, soit les CDKI (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) [56]. Ceux-ci se lient aux complexes CDK-cyclines afin de les inactiver. Grâce à leur capacité de freiner le cycle cellulaire, certaines CDKI telles que p21 et p27 sont aussi appelées les suppresseurs de tumeur.

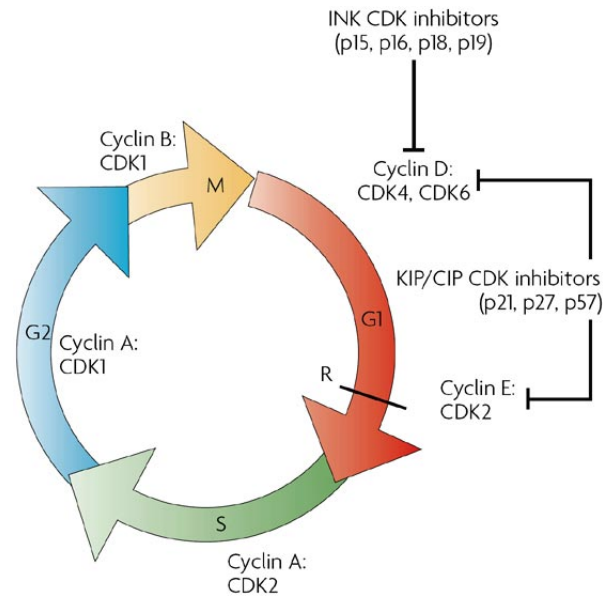


Figure 11. Illustration du cycle cellulaire (Tiré de [54])

Afin d'éviter des erreurs lors de la réplication et l'accumulation de dommages à l'ADN de la cellule, le cycle cellulaire fait aussi intervenir une série de points de contrôle, essentiels à la formation de cellules exemptes de défauts au niveau de leur ADN [57, 58]. Ils ont le pouvoir de freiner le cycle cellulaire, permettant d'effectuer les vérifications et la réparation des dommages à l'ADN. La cellule ne peut passer à la prochaine phase du cycle tant et aussi longtemps que les critères des points de contrôle n'aient été atteints. Quatre points de contrôle principaux existent; ils prennent place lors de la transition G1/S, en phase S, lors de la transition G2/M et finalement, à la transition métaphase-anaphase de la mitose.

Tout dérèglement du cycle cellulaire peut rendre la cellule vulnérable à une multiplication effrénée et à des erreurs au niveau de la ségrégation des chromosomes, événements qui peuvent pousser la cellule vers la formation de tumeurs cancéreuses [58].

Cks1 aurait un rôle important à jouer dans plusieurs étapes du cycle cellulaire. Peu de notions sont connues sur les mécanismes d'action de cette protéine, mais son rôle majeur prendrait place lors de la destruction de p27, un inhibiteur des CDKs. Ce mécanisme, au cœur de la transition G1/S du cycle cellulaire, est hautement régulé [59, 60]. p27 maintient deux complexes inactifs, soit la cycline E-CDK2 et la cycline A-CDK2, empêchant la transition vers la phase S (Figure 12). Lorsque des signaux de croissance sont envoyés, ces complexes vont

permettre la phosphorylation de p27 sur le résidu T187 (Figure 12a) [61]. Cette phosphorylation est reconnue par un membre du complexe SCF (Skp-Cullin-F-box), la protéine Skp2 (Figure 12b). Le complexe SCF est une E3 ubiquitine ligase, et c'est lui qui sera responsable de lier les ubiquitines à p27. Toutefois, cette interaction n'est pas suffisante pour permettre l'ubiquitination de p27; l'ajout au complexe du co-activateur de Skp2, soit Cks1, sera nécessaire [62, 63]. Cks1 est alors recruté au SCF via Skp2, ce qui induit un changement conformationnel de Skp2 qui interagit de façon plus forte avec p27. Une fois que les deux co-activateurs Cks1 et Skp2 sont réunis, le complexe SCF est en mesure d'ubiquitiner p27, le menant tout droit à la dégradation par le protéasome (Figure 12c). Cette chute du niveau de p27 lève l'inhibition sur les complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2, permettant l'envoi d'un signal positif de prolifération et entraîne la cellule en phase S du cycle cellulaire [60].

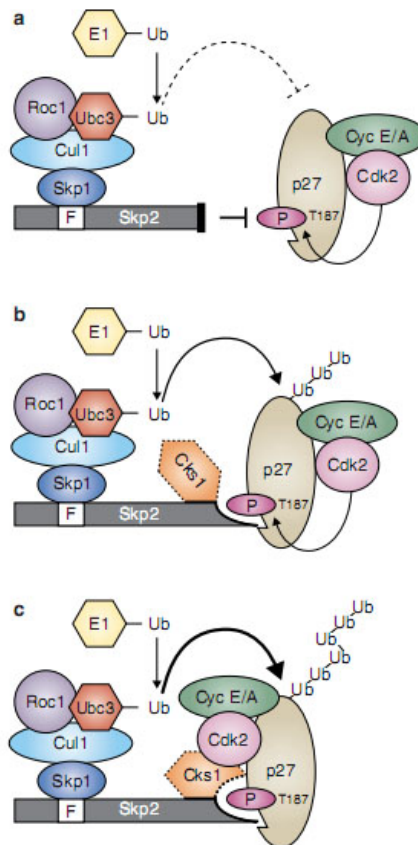


Figure 12. Mécanisme de dégradation de p27 (Tiré de [60])

Cks1 aurait aussi un rôle à jouer dans la transcription de certains gènes, notamment Cdc20, tel que révélé dans une étude faite chez la levure *S. cerevisiae* [64]. En effet, Cks1 participe au recrutement de certaines composantes du protéasome, soit Rpt1 et Pre1, au promoteur de Cdc20, ce dernier étant au cœur du point de contrôle du fuseau mitotique lors de la transition métaphase-anaphase de la mitose. En effet, l'activation de Cdc20 permet au complexe APC d'amorcer la séparation des chromatides par le biais d'une enzyme, la séparase, et ainsi favoriser la progression du cycle cellulaire [65]. Donc, Cks1 aurait, en plus de son rôle-clé dans la transition G1/S, un rôle important dans la régulation de la mitose [64]. Or, le contrôle de la transcription de Cdc20 ne serait pas le seul rôle de Cks1 dans la mitose. Récemment, certains groupes ont confirmé que Cks1 exerçait un contrôle dans la dégradation de certaines cyclines, soit la cycline B et la cycline A, ce qui favoriserait aussi la progression du cycle cellulaire [66, 67]. Toutefois, les mécanismes par lesquels ces fonctions sont effectuées demeurent imprécis.

Les études chez la levure et *Xenopus* ont permis de révéler que la perte de fonction de la protéine Cks1 serait liée à des défauts lors des différentes étapes de la mitose [53]. Des délétions de Cks1 ont été faites chez la souris, donnant des animaux viables mais nettement plus petits que la normale, un phénotype qui rappelle celui des souris dépourvues de Skp2 [62]. *In vitro*, des analyses faites sur des cellules *Cks1*^{-/-} indiquent une accumulation de p27 phosphorylé en T187, suggérant que l'ubiquitination de p27 fut bloquée quelque part après sa phosphorylation [63]. Toutefois, l'ajout de Cks1 recombinant dans les extraits dépourvus en Cks1 est suffisant pour restaurer la réaction d'ubiquitination de p27.

1.4.2.2.2 Effets de la surexpression de Cks1 dans le cancer

Plusieurs équipes ont tenté d'élucider en partie le rôle que Cks1 pourrait jouer dans le développement de certains cancers. En effet, dans les cas de cancers étudiés, soit les cancers du sein [68], colorectal [69], gastrique [70], urothélial [71], NSCLC (carcinome du poumon à cellules non-petites) [72], de la prostate [73], rénal [74] et oral squameux [75], la surexpression de Cks1 est associée à un mauvais pronostic. Ces études ont tenté d'élucider son rôle précis en effectuant des études de déplétion de Cks1 sur des cellules cancéreuses, *in vitro* et *in vivo*, et ont noté plusieurs changements importants dans la progression tumorale. D'une part, une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaires, combinées à une augmentation de l'apoptose et un blocage du cycle cellulaire. Ces phénotypes sont étroitement

liés au rôle de Cks1 sur la dégradation de p27, qui est généralement absent dans ce type de tumeur, et cette perte est connue comme étant liée à une tumeur agressive et un mauvais pronostic. Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a été faite pour vérifier l'implication de Cks1 dans le cancer épithélial de l'ovaire.

1.4.3 Les objectifs du projet de maîtrise

À ce jour, tel que mentionné précédemment, il n'existe pas de traitement ni méthodes de dépistage efficaces pour le CÉO. Vu la mortalité élevée associée à cette maladie, il y a donc une urgence de mieux la caractériser. Comme Cks1 est un régulateur du cycle cellulaire, et qu'il a été démontré comme étant surexprimé, autant au niveau génique, de l'ARNm que des protéines, dans les cancers ovariens de type TOV, notre hypothèse est que Cks1 joue un rôle clé dans la progression du cancer épithélial de l'ovaire.

Mon premier objectif, était donc d'inhiber l'expression de Cks1 dans les lignées tumorales ovariennes invasives du laboratoire, par l'utilisation d'un système d'ARN interférence. Une fois cet objectif réalisé, mon deuxième objectif était de caractériser le rôle de Cks1 dans la progression du cancer, par divers critères, tels que la prolifération et la migration cellulaire, ainsi que la formation de sphéroïdes. Par ces expériences, nous voulons confirmer le rôle de Cks1 dans le développement et la progression du CÉO et ainsi de le valider comme marqueur pronostique potentiel.

CHAPITRE II MATÉRIEL & MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires choisies pour effectuer la déplétion de Cks1 sont la TOV112D et la TOV1946. Ces deux lignées tumorales agressives ont démontré un patron d'expression élevé pour Cks1 lors d'une analyse sur micropuce à ADN HuFL. La première lignée, soit la TOV112D, a été dérivée au laboratoire suite à une digestion du tissu tumoral par collagénases. La patiente de laquelle la lignée a été issue était âgée de 42 ans lors de son diagnostic et elle est décédée environ trois mois après avoir subi sa cytoréduction, suite à une progression fulminante de sa maladie. Cette patiente a reçu un traitement de chimiothérapie composé de platine. La tumeur est de type endométrioïde de grade 3 et de stade IIIC [43]. Pour sa part, la lignée cellulaire TOV1946 a été dérivée au laboratoire suite à un grattage de la tumeur solide d'une autre patiente, âgée de 75 ans au diagnostic. Elle est décédée suite à des complications post-opératoires, ce qui fait que le devenir de sa maladie demeure inconnu. La tumeur était de type séreux, de grade 3 et de stade IIIC [42].

Ces lignées sont cultivées dans du milieu OSE 1X (Wisent, Qc, Canada) complété avec 10% de FBS (sérum de veau fœtal), 2.5 g/mL d'amphotéricine B (Wisent, Qc, Canada) et 50 g/mL de gentamycine (Gibco). Les cellules sont divisées 2 fois par semaine dans une proportion 1:5 dans des pétris de 100 mm. Elles sont placées dans un incubateur humide conservé à 37°C ayant une atmosphère détenant 5% de CO₂.

2.2 Clonage

Le plasmide pcDNA6/TR est fourni dans le kit BLOCK-iT d'Invitrogen, et a été transformé au laboratoire (Figure 13). Les shRNAs contrôle (LacZ) sont issus du kit BLOCK-iT d'Invitrogen, alors que les séquences des shRNAs contre Cks1 ont été construits à partir de siRNAs décrits dans la littérature. Ces siRNAs ont été transformés en shRNAs par un logiciel bioinformatique disponible sur le site web d'Invitrogen. Les oligonucléotides ont été synthétisés par Alpha DNA (Montréal) et les séquences des divers shRNAs testés sont représentées dans le Tableau II. Ces oligonucléotides ont ensuite été hybridés et la ligation a été faite dans le vecteur H1/T0 fourni dans le kit BLOCK-iT d'Invitrogen. Une fois cette étape réussie, la transformation dans des

bactéries compétentes *E. coli* One Shot TOP10 a été effectuée, et les bactéries détenant le plasmide ont été sélectionnées avec une concentration de 50 µg/mL de kanamycine. L'ADN a ensuite été récolté et purifié à l'aide d'un kit QIAGEN. La recombinaison du vecteur contenant la séquence de shRNA efficace a ensuite été recombinaison dans le vecteur 694.6 par la technologie Gateway, afin de procéder à l'infection des cellules (Figure 14) [76]. La séquence du shRNA choisie (CKS1-7) est située entre les sites attB1 et attB2 du vecteur 694.6.

Nom	Séquence du shRNA	Référence
CKS1-5	5'-CACCGGACATAGCCAAGCTGGTCCGAAGACCAGCTTGGCTATGTCC-3'	[75]
CKS1-6	5'-CACCGGACGAGGAGTTTGAGTATTTGAAAAATACTCAAACCTCCTCGTCG-3'	[77]
CKS1-7	5'-CACCAACGAAACCTCACATCTTGTGAGAAACAAGATGTGAGGTTCTGG-3'	[77]
CKS1-8	5'-CACCGTCTGATGTCTGAATCTGAATTCGAAAATTCAGATTCAGACATCAGA-3'	[77]
CKS1-9	5'-CACCGCAAATTTACTATTCGGACATTGAGAAAATGCCGAATAGTAAATTTG-3'	[77]

Tableau II. Séquences de shRNAs dirigés contre Cks1 et testés dans les lignées cellulaires TOV112D et TOV1946

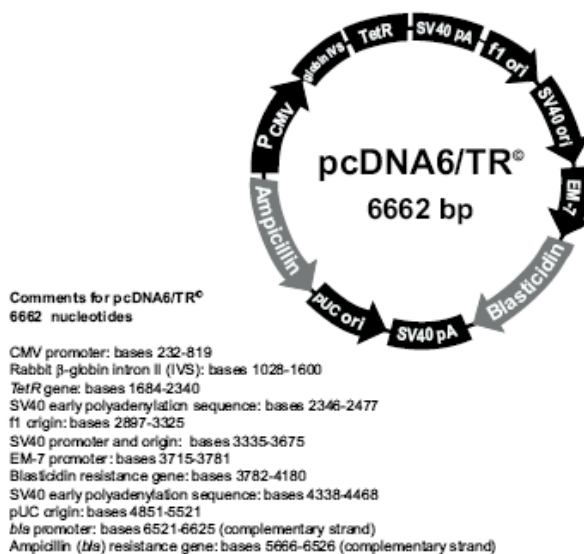


Figure 13. Carte de plasmide du pcDNA6/TR (Invitrogen)

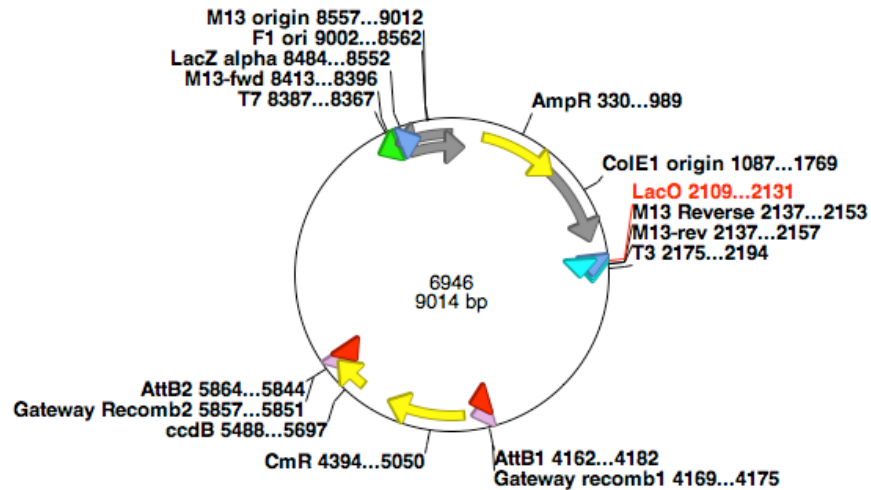


Figure 14. Carte de plasmide du vecteur 694.6 [76]

2.3 Transfection

Les lignées TR (*Tetracycline Repressor*) ont été transfectées avec un agent lipidique, la lipofectamine (Invitrogen), alors qu'elles étaient à une confluence d'environ 60%. 2 ug d'ADN ont été mélangées à 16 uL de Plus Reagent et 500 uL de milieu OSE seul, et incubés 15 minutes à température ambiante. Dans un tube séparé, 24 uL de Lipofectamine ont été ajoutées à 500 uL de milieu OSE seul, et aussi incubés 15 minutes à température ambiante. Ensuite, les deux solutions ont été mélangées et incubées 15 minutes. Pendant l'incubation, le milieu OSE complet des cellules a été changé pour du milieu OSE seul. Finalement, le cocktail de transfection a été incorporé dans le milieu des cellules à transfecter et gardé toute la nuit dans un incubateur. Le lendemain matin, le milieu OSE seul a été remplacé par du milieu OSE complet. 48 heures plus tard, la blasticidine a été ajoutée au milieu de culture, à raison de 3 ug/mL, et conservée au cours des passages. Des clones individuels pour les populations TOV112D-TR et TOV1946-TR ont été isolés par la méthode avec papiers stériles.

Les premiers tests de shRNA contre LacZ et Cks1 ont aussi exploité la méthode de transfection à la lipofectamine. Or, pour l'établissement des populations mixtes et des clones stables, les cellules ont été infectées avec un virus contenant le plasmide 694.6. La production de virus a été effectuée dans des 293FT, dans lesquelles ont été transfectés 8 ug des shRNAs contrôle et Cks1 avec la Lipofectamine 2000 et le Packaging Mix ViraPower (Invitrogen). Les cellules ont été incubées toute la nuit. Le lendemain matin, le milieu de culture a été changé. Puis, 2 jours plus tard, le surnageant est recueilli, puis concentré par ultracentrifugation. Les lignées TOV112D-TR

et TOV1946-TR sont ensuite ensemencées dans des plaques 6 puits contenant 1 mL de milieu OSE complet, dans lesquelles 0,5X et 1X du virus sera ajouté, puis incubé toute la nuit. Le lendemain, le milieu de culture a été changé pour un milieu OSE contenant de la puromycine, à raison de 0.5 ug/mL. Après sélection, des clones individuels pour chaque condition ont été isolés par dilution limite. L'induction à la tétracycline est effectuée par l'ajout d'une concentration finale de 1 ug/mL de tétracycline dans le milieu de culture des cellules.

2.4 Extraction de protéines

Après avoir été rincées avec du PBS, les cellules ont été grattées dans 1 mL de PBS et recueillies dans un tube. Suite à une centrifugation de 10 minutes à 4000 rpm à 4°C, le surnageant a été enlevé et les culots ont été lysés durant 30 minutes à 4°C avec un tampon de lyse (1% Igepal, 10% glycérol, 50mM Tris-Base (pH 8), 2mM EDTA, 5 mM NaF, 150 mM NaCl) contenant des antiprotéases (1X) (Complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail Tablets, Roche Diagnostics). Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 30 minutes à 13000 rpm à 4°C. Puis, les surnageants ont été récoltés et conservés à -80°C. La concentration des protéines a été mesurée par l'analyse de Bradford (Protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) selon les instructions du manufacturier.

2.5 Immunobuvardage de type Western

Pour l'immunobuvardage de type Western, 30 µg d'extraits protéiques de chacun des clones ont été séparés sur gels Tris-Tricine 16.5% (Bio-Rad) puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été bloquées pendant 1 heure à température pièce avec un tampon de blocage (5% de lait en poudre sans matières grasses dilué dans du PBS-Tween 0.05%). Puis, les membranes ont été incubées à 4°C pendant 2 heures avec l'anticorps primaire de Cks1 (C-term, #36-6800, Zymed, Invitrogen,) dilué 1:100 dans du tampon de blocage. Le répresseur à la tétracycline est vérifié grâce à une hybridation avec un anticorps anti-TetR, dilué 1:1000 (#TET01, MoBiTec). Le contrôle de charge a été vérifié par une hybridation avec la β -actine, à une concentration de 1:5000 (AC-15, ab6276-100, abcam). Les membranes ont ensuite été lavées trois fois avec du tampon PBS-Tween 0.05%, 10 minutes par lavage, puis incubées 1 heure à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à l'enzyme HRP (sc-2077, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) dilué 1:5000 dans du tampon de blocage pour Cks1 et TetR. Pour la β -actine, les membranes ont plutôt été

hybridées avec l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à l'enzyme HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology), dilué 1:5000. Après trois lavages de 10 minutes au PBS-Tween, les membranes ont finalement été exposées à un substrat chimioluminescent (ECL SuperSignal) et placées au contact d'un film Kodak.

2.6 Prolifération

Trois jours avant le début de l'expérience, la moitié de ces cellules a été induite à la tétracycline à une concentration de 10 ug/mL. Ensuite, 150 000 cellules ont étéensemencées par puits dans des plaques 6 puits, à raison de deux puits par condition, par jour de compte, sur 5 jours. Au moment du compte, à intervalles de 24 heures, les cellules ont été trypsinisées et neutralisées, puis 70 uL de la suspension a été ajoutée à 7 mL de CASYTon, afin de créer une dilution de 1 :100. Puis, à l'aide de l'appareil CASY (don de la Fondation Carole Epstein), les cellules ont été comptées en duplicata, afin de fournir une concentration de cellules viables. Pour déterminer le nombre de cellules présent dans chaque puits, le volume total a été calculé, puis la concentration a été divisée par celui-ci. L'expérience a été réalisée en triplicata.

2.7 Essais de migration : Recouvrement suite à une blessure

Trois jours avant le début de l'expérience, la moitié de ces cellules a été induite à la tétracycline à une concentration de 10 ug/mL. Au jour 0, des plaques 6 puits ont étéensemencées à raison de 400 000 cellules par puits. Deux puits par clones étaient nécessaires pour chaque intervalle de temps testé (0, 6, 24, 30 et 48 heures). Au jour 1, le milieu de tous les puits a été changé. Au jour 2, les cellules devaient être à confluence. À l'aide d'une pipette et d'embouts à pipette jaunes (20-200 uL), des blessures (« scratches ») ont été effectuées en gardant toujours la pipette bien perpendiculaire au pétri et en appuyant avec une force constante. Quatre stries ont été ainsi réalisées par puits. Lorsque les stries étaient faites, les plaques ont été rincées avec du PBS avant l'ajout de milieu complet et elles ont ensuite été remises à 37°C pour 6, 24, 30 ou 48 heures. Pour chaque temps, les cellules ont été fixées dans les puits au méthanol. Après un lavage au PBS, du PBS-méthanol (50%) à température pièce a été ajouté, puis du méthanol 100% froid (4°C). Les cellules ont ensuite été rincées avec du méthanol 100% à température pièce et mises à sécher. Les plaques ont été colorées en utilisant du Giemsa (dilution 1:10) (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) et mises à l'abri de la lumière pour la nuit. Pour

chaque clone, l'expérience a été réalisée en triplicata. Des photos de toutes les stries ont été prises à un grossissement de 4X à l'aide d'un microscope inversé de type Nikon Eclipse TS100 et d'un appareil photo Nikon Coolpix 5000.

2.8 Essai de migration : Méthode de quantification des stries

Toutes les photos correspondant au temps 0 heure et 48 heures ont été analysées avec le logiciel Image-Pro® Plus (MediaCybernetics®) version 5.1. Afin d'évaluer la surface des stries, il a tout d'abord fallu créer un filtre qui recouvrait tout l'espace non-occupé par les cellules. Une boîte de sélection a aussi été créée et a été utilisée pour les photos de toutes les expériences avec les TOV112D. La surface de chacune des stries et la surface adjacente (confluence des cellules) à ces dernières a aussi été calculée grâce au logiciel, à 0 et 48 heures. Afin de corriger les variations observées lors de la fixation des cellules avec le méthanol froid (4°C), la surface adjacente a été soustraite à la surface de la strie.

2.9 Formation de sphéroïdes

Trois jours avant le début de l'expérience, la moitié de ces cellules a été induite à la tétracycline à une concentration de 10 µg/mL. Les différents clones des lignées cellulaires TOV112D et TOV1946 ont été évalués pour leur capacité à former des sphéroïdes (structures tridimensionnelles). Pour ce faire, une quarantaine de gouttes, chacune composée de 4×10^3 cellules suspendues dans 16 µL de milieu OSE complet, ont été placées sur la surface interne du couvercle d'une boîte de pétri 100 mm. Puis, le couvercle était remis sur le pétri contenant 5-10 mL de milieu complet pour prévenir la déshydratation des gouttelettes. Les pétris étaient ensuite placés à 37°C pour 6 jours. Pour chaque clone, un minimum de 5 photos significatives des sphéroïdes ont été prises, après les 6 jours d'incubation, à un grossissement de 4X à l'aide d'un microscope inversé de type Nikon Eclipse TS100 et d'un appareil photo Nikon Coolpix 5000.

2.10 Statistiques

Les moyennes et les barres d'erreur ont été calculées avec le logiciel Microsoft Excel. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (ou S.E.M., standard error of the mean)

CHAPITRE III RÉSULTATS

3.1 Implantation du système de répresseur à la tétracycline dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire

La première étape pour inhiber l'expression de Cks1 fût d'implanter un système de répresseur inductible à la tétracycline dans les deux lignées cellulaires choisies, TOV112D et TOV1946. Ces deux lignées cellulaires sur-expriment toutes les deux Cks1 au niveau protéique. Pour vérifier le bon fonctionnement du système transfecté dans les deux lignées cellulaires, un immunobuvardage de type western a été effectué pour évaluer la présence du répresseur inductible à la tétracycline (TR). Ce dernier est bel et bien exprimé, autant dans les TOV112D et les TOV1946 transfectées (TR) (Figure 15), alors qu'il n'est pas détectable dans les lignées non-transfectées (Mock), tel qu'attendu. Ces lignées seront dorénavant appelées TOV112D-TR et TOV1946-TR afin de les distinguer des lignées cellulaires de base. Pour chaque lignée, des clones individuels ont été isolés, et un exemple pour chaque lignée est illustré en figure 15. Le plasmide encodant pour le gène du répresseur inductible à la tétracycline contient aussi un gène de résistance à la blasticidine. Une première sélection, pour éliminer les cellules non-transfectées, a été faite avec du milieu OSE contenant 3 mg/mL de blasticidine. Ensuite, les lignées sont maintenues dans ce même milieu de sélection.

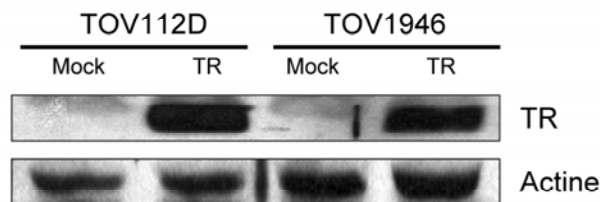


Figure 15. Caractérisation de l'expression du répresseur à la tétracycline dans les lignées cellulaires TOV112D et TOV1946. Le plasmide du répresseur à la tétracycline a été transfecté ou non dans les lignées cellulaires sélectionnées. Ensuite, un buvardage de type Western a été fait avec les protéines extraites à partir de chaque échantillon afin d'analyser l'expression du répresseur dans les lignées. L'actine a servi de contrôle de la quantité de protéines chargée sur le gel. Résultat représentatif d'une expérience effectuée en triplicata. (*Mock* : cellules non-transfectées; *TR* : cellules transfectées avec le répresseur à la tétracycline)

3.2 Déplétion de Cks1 par un système de shRNA inductible dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire

Afin de compléter mon premier objectif, une variété de shRNAs inductible ciblés contre Cks1 ont été dérivés. Ceux-ci ont une séquence inspirée de plusieurs études antérieures publiées où la déplétion de Cks1 avait été effectuée à l'aide de siRNA, principalement [75, 77]. Ces shRNAs ont été testés dans les TOV112D-TR et TOV1946-TR pour vérifier leur capacité à diminuer le niveau protéique cellulaire de Cks1. De plus, à titre de contrôle, nous avons aussi dérivé des shRNAs inductibles ciblés contre LacZ, une protéine qui n'est pas exprimée de façon endogène dans les lignées cellulaires mammifères. Comme l'infection virale est caractérisée par une meilleure efficacité que la transfection traditionnelle utilisant la lipofectamine, nous avons choisi de poursuivre l'étude en infectant les cellules avec un lentivirus pour y introduire les shRNAs. Bien entendu, le changement de méthode a conduit à la nécessité de changer de plasmide. Parmi les séquences testées, un seul shRNA a été démontré comme étant efficace pour la réduction de l'expression de Cks1. Comme il est possible de le noter à la figure 16, des populations mixtes (appelées shLacZ P.M. et shCks1 P.M.) induites à la tétracycline montrent que le niveau protéique de Cks1 reste stable lorsque le shRNA LacZ est activé, alors qu'il chute de façon drastique lorsque le shRNA de Cks1 est introduit et exprimé dans les cellules, autant dans les TOV112D-TR (Figure 16A) que dans les TOV1946-TR (Figure 16B). Ceci démontre que les shRNAs dérivés contre Cks1 sont efficaces pour la déplétion de l'expression de Cks1 dans les lignées cellulaires et ce, de façon inductible.

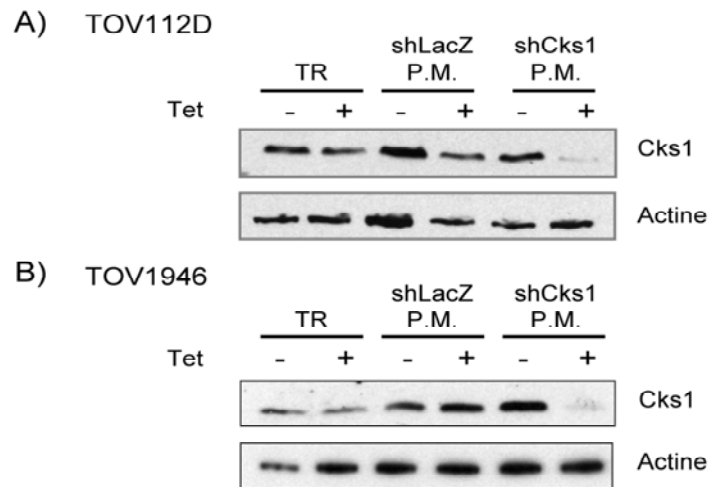
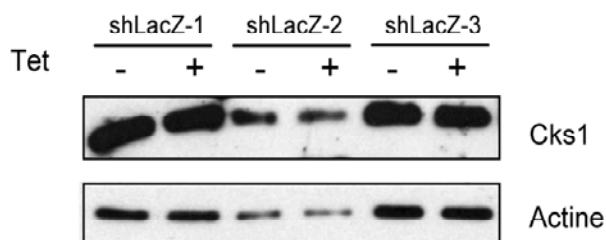


Figure 16. Déplétion de Cks1 dans les lignées cellulaires TOV112D et TOV1946. Les plasmides codant pour les shRNA LacZ (contrôle) et Cks1 ont été transfectés dans les lignées cellulaires TOV112D (A) et TOV1946 (B) contenant le répresseur à la tétracycline, pour former les populations mixtes. Elles ont ensuite été induites ou non à la tétracycline pendant trois jours. Ensuite, un immunobuvardage de type Western a été fait avec les protéines extraites à partir de chaque échantillon afin d'analyser l'expression de Cks1 dans les lignées. L'actine a servi de contrôle de la quantité de protéines chargées sur le gel. Résultat représentatif d'une expérience effectuée en triplicata. (TR : Lignée exprimant seulement le répresseur à la tétracycline; shLacZ P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA contrôle; shCks1 P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant Cks1; Tet : tétracycline; - : sans tétracycline; + : avec tétracycline)

Afin d'étudier une population de cellules plus homogènes, des clones de chacune de ces populations ont été dérivés à partir des populations mixtes infectées avec les shRNAs ciblés contre LacZ et Cks1. Il est important de noter que, pour tous les résultats présentés, les différents clones exprimant le shRNA LacZ seront nommés shLacZ-1, -2 et -3, et que les clones de Cks1 seront nommés shCks1-1, -2 et -3, afin de simplifier la lecture. Tel que démontré à la figure 17, les clones LacZ, autant dans les TOV112D-TR (Figure 17A) que dans les TOV1946-TR (Figure 17B) se comportent de la même façon que la population mixte de base. C'est aussi le cas des clones isolés infectés avec le shRNA ciblant Cks1 dans les TOV112D-TR (Figure 18A) et TOV1946-TR (Figure 18B); toutefois, chaque clone shCks1 a une expression du shRNA propre à lui-même, provoquant des variations dans le niveau de Cks1 entre les clones. Bref, à la lumière de ces résultats, il est possible d'affirmer que la déplétion de Cks1 dans les lignées cellulaires tumorales de l'ovaire sélectionnées a été correctement effectuée.

A) TOV112D



B) TOV1946

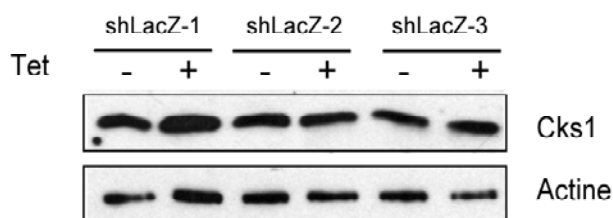


Figure 17. Observation de l'expression de Cks1 chez des clones contrôles isolés issus des lignées cellulaires TOV112D et TOV1946. Le plasmide codant pour le shRNA LacZ (contrôle) a été infecté dans les lignées cellulaires TOV112D-TR (A) et TOV1946-TR (B). Puis, des clones individuels ont été dérivés et ils ont été induits ou non à la tétracycline pendant trois jours. Ensuite, un immunobuvardage de type Western a été fait avec les protéines extraites à partir de chaque échantillon afin d'analyser l'expression de Cks1 dans les lignées. L'actine a servi de contrôle de la quantité de protéines chargées sur le gel. Résultat représentatif d'une expérience effectuée en triplicata. (*shLacZ-1* à *3* : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (*LacZ*); *Tet* : tétracycline; - : sans tétracycline; + : avec tétracycline)

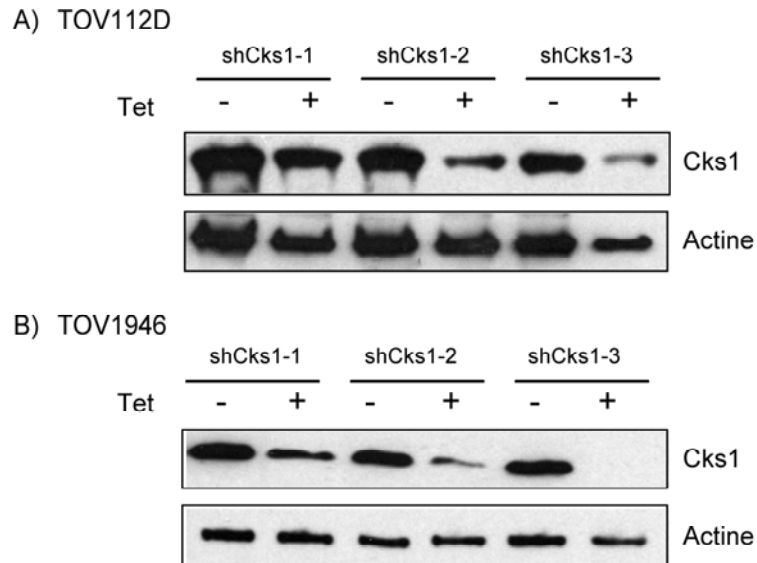


Figure 18. Observation de l'expression de Cks1 dans des clones isolés déplétés en Cks1 issus des lignées cellulaires TOV112D et TOV1946. Le plasmide codant pour le shRNA ciblant Cks1 a été infecté dans les lignées cellulaires TOV112D-TR (A) et TOV1946-TR (B). Des clones individuels ont été dérivés et ils ont été induits ou non à la tétracycline pendant trois jours. Ensuite, un buvardage de type Western a été fait avec les protéines extraites à partir de chaque échantillon afin d'analyser l'expression de Cks1 dans les lignées. L'actine a servi de contrôle de la quantité de protéines chargées sur le gel. Résultat représentatif d'une expérience effectuée en triplicata. (*shCks1-1* à *3* : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA Cks1; Tet : tétracycline; - : sans tétracycline; + : avec tétracycline)

3.3 Effets in vitro de la déplétion de Cks1 dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire

Une fois que des clones stables exprimant des shRNAs fonctionnels capables de cibler Cks1 et les contrôles correspondants ont été établis, l'étape suivante était d'évaluer les effets de la déplétion de Cks1 sur des paramètres de progression tumorale. Les paramètres testés sont la prolifération cellulaire, la formation de sphéroïdes et la migration cellulaire des cellules tumorales suite à la déplétion de Cks1.

3.3.1 Effet de la déplétion de Cks1 sur la prolifération cellulaire

Comme Cks1 est au cœur de la régulation du cycle cellulaire, nous avons voulu vérifier si sa déplétion allait influencer la prolifération cellulaire des TOV112D-TR et des TOV1946-TR. Pour

ce faire, nous avons effectué des courbes de croissance pour chacune de ces lignées. Nous avons doncensemencé des plaques 6 puits avec 150 000 cellules préalablement traitées durant trois jours à la tétracycline ou non, en duplicata, pour chaque condition, et nous avons compté les cellules sur une base quotidienne pendant cinq jours, en tenant uniquement compte des cellules vivantes. Ces courbes de croissance, correspondant aux lignées cellulaires TOV112D-TR et TOV1946-TR, représentées aux figures 19 et 20 respectivement, ont permis de constater qu'il n'y a pas de différence significative de prolifération cellulaire entre les populations exprimant le shRNA de Cks1 et celles qui ne l'expriment pas.

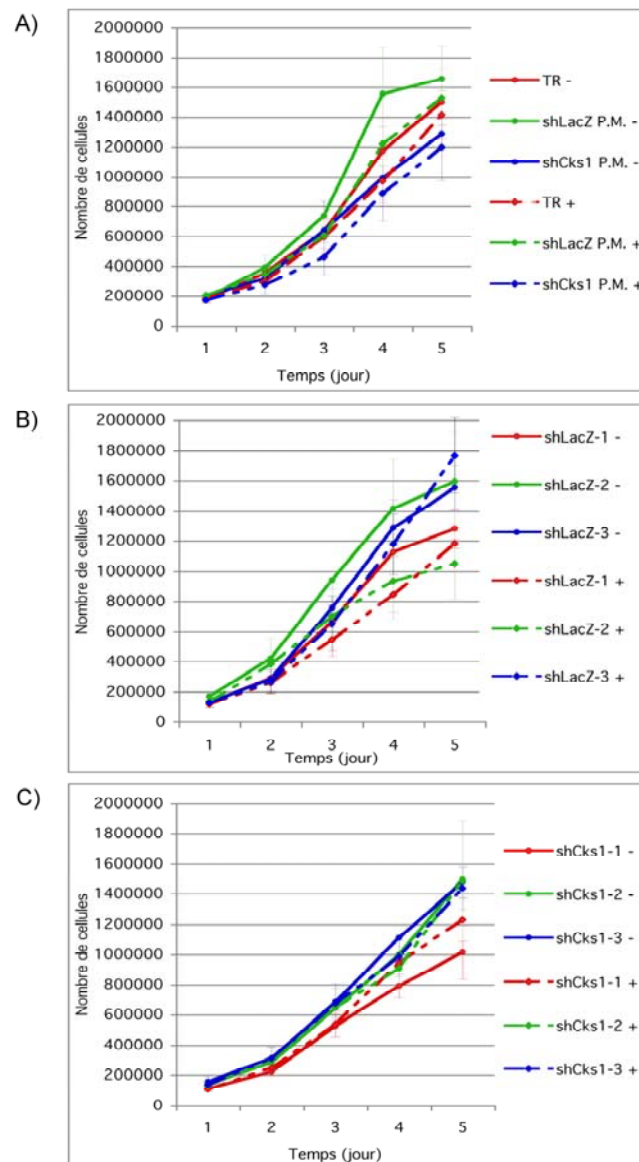


Figure 19. Taux de croissance des populations mixtes et des clones déplétés en Cks1 dans la lignée cellulaire TOV112D. Les populations mixtes (A), les clones LacZ (B) et les clones Cks1 (C) ont été évalués, avant et après induction à la tétracycline pendant trois jours. Au temps 0, 150 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les comptes cellulaires ont été effectués aux 24h sur une période de 5 jours. Pour chaque expérience, 2 échantillons d'une même population ont été testés, et chaque expérience a été faite en triplicata. Représentation de la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur ont été calculées selon l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.). (*TR* : lignée exprimant le répresseur à la tétracycline; *shLacZ P.M.* : population mixte exprimant le TR et transfecté avec le shRNA contrôle (*LacZ*); *shCks1 P.M.* : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant *Cks1*; *shLacZ-1* à *3* : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (*LacZ*); *shCks1-1* à *3* : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA *Cks1* Tet : tétracycline; - et ligne pleine : sans tétracycline; + et ligne pointillée : avec tétracycline)

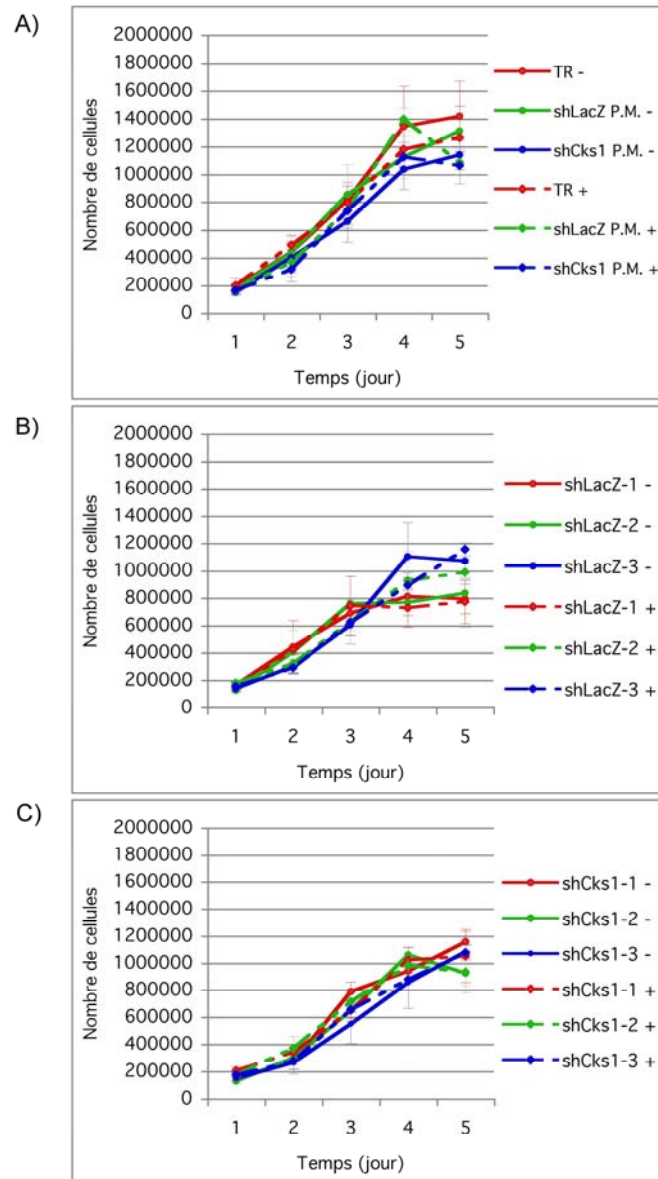


Figure 20. Taux de croissance des populations mixtes et des clones déplétés en Cks1 dans la lignée cellulaire TOV1946. Les populations mixtes (A), les clones LacZ (B) et les clones Cks1 (C) ont été évalués, avant et après induction à la tétracycline pendant trois jours. Au temps 0, 150 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les comptes cellulaires ont été effectués aux 24h sur une période de 5 jours. Pour chaque expérience, 2 échantillons d'une même population ont été testés, et chaque expérience a été faite en triplicata. Représentation de la moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur ont été calculées selon l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.). (TR : lignée exprimant le répresseur à la tétracycline; shLacZ P.M. : population mixte exprimant le TR et transfecté avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1 P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant Cks1; shLacZ-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA Cks1 Tet : tétracycline; - et ligne pleine : sans tétracycline; + et ligne pointillée : avec tétracycline)

3.3.2 Effet de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire

Un essai de recouvrement de plaie suite à une blessure (*scratch assay*) a été fait pour vérifier l'effet de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire. Pour ce faire, nous avons pratiqué des stries, pour chaque condition, sur une monocouche de cellules à confluence, préalablement induites ou non à la tétracycline pour trois jours, et nous avons laissé les cellules en incubation pendant différents intervalles de temps, jusqu'à concurrence de 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées et photographiées afin d'analyser la capacité de recouvrement des cellules avec le logiciel Image-Pro Plus. Il a été possible de déterminer la capacité des TOV112D-TR à recouvrir une plaie. Comme nous pouvons l'observer sur les photographies représentées à la figure 21, prises après 48h de migration, il n'existe pas de différence significative entre les cellules induites ou non-induites à la tétracycline, que ce soit pour les populations mixtes (Figure 21A), les clones LacZ (Figure 21B) ou les clones Cks1 (Figure 21C). Les pourcentages de recouvrement de la plaie aux différentes conditions ont ensuite été quantifiés, et les résultats sont représentés à la figure 22. Il est possible de noter que la population mixte de Cks1, en A, semble montrer une légère augmentation de la migration après induction à 48 heures, mais ce phénomène n'est pas reproduit de façon significative dans les clones isolés déplétés en Cks1 (Figure 22C). Pour leur part, les clones LacZ ne montrent pas de différence notable au niveau de la migration cellulaire, avant ou après induction, entre les temps zéro et 48 heures (Figure 22B). Les lignées dérivées des TOV1946-TR, pour leur part, ne peuvent être présentées du à des problèmes d'adhésion lors de l'étape de la fixation.

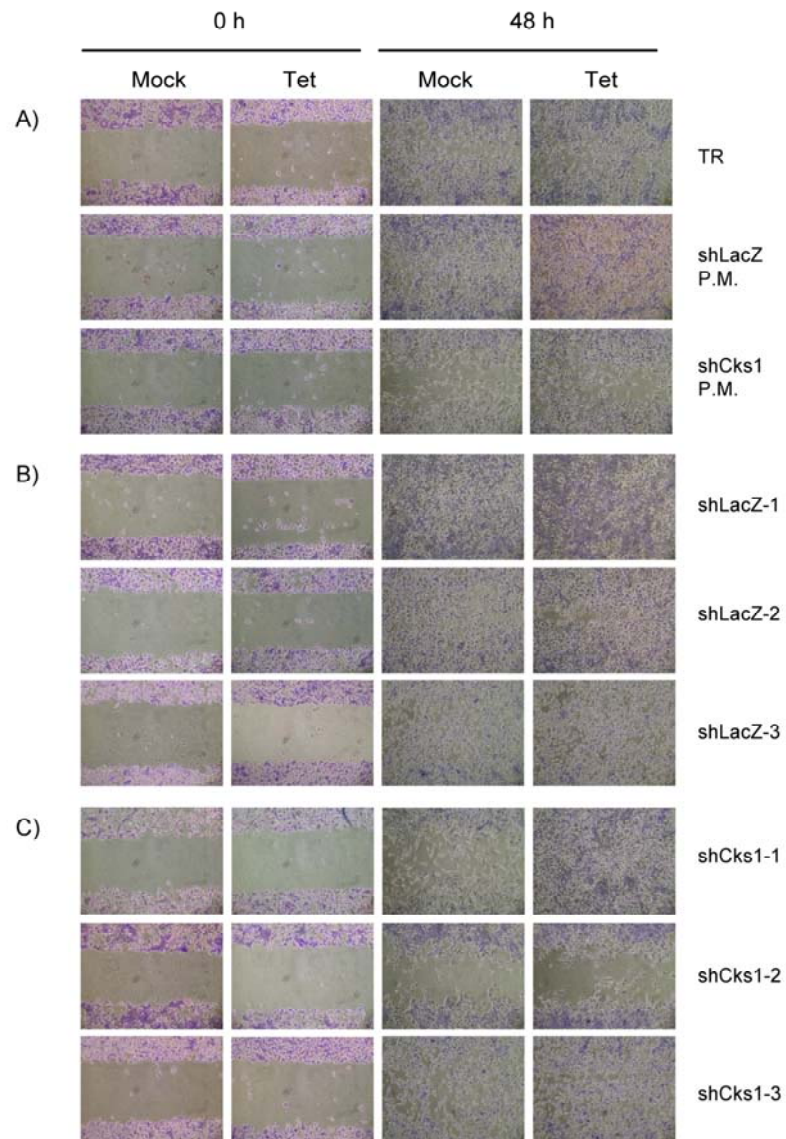


Figure 21. Capacité de migration des différents clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée cellulaire TOV112D. Des stries ont été effectuées sur des cellules en monocouche à l'état de confluence. Des photographies à temps 0h et après 48h de recouvrement ont été prises, pour les cellules induites ou non à la tétracycline. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, et pour chaque condition 24 photos ont été prises (2 photos par strie, 4 stries par puits, 3 puits par condition). Présentation d'une photo représentative pour chaque condition. (*TR : lignée exprimant le répresseur à la tétracycline; shLacZ P.M. : population mixte exprimant le TR et transfecté avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1 P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant Cks1; shLacZ-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA Cks1; Mock : lignée non induite à la tétracycline; Tet : lignée induite à la tétracycline*)

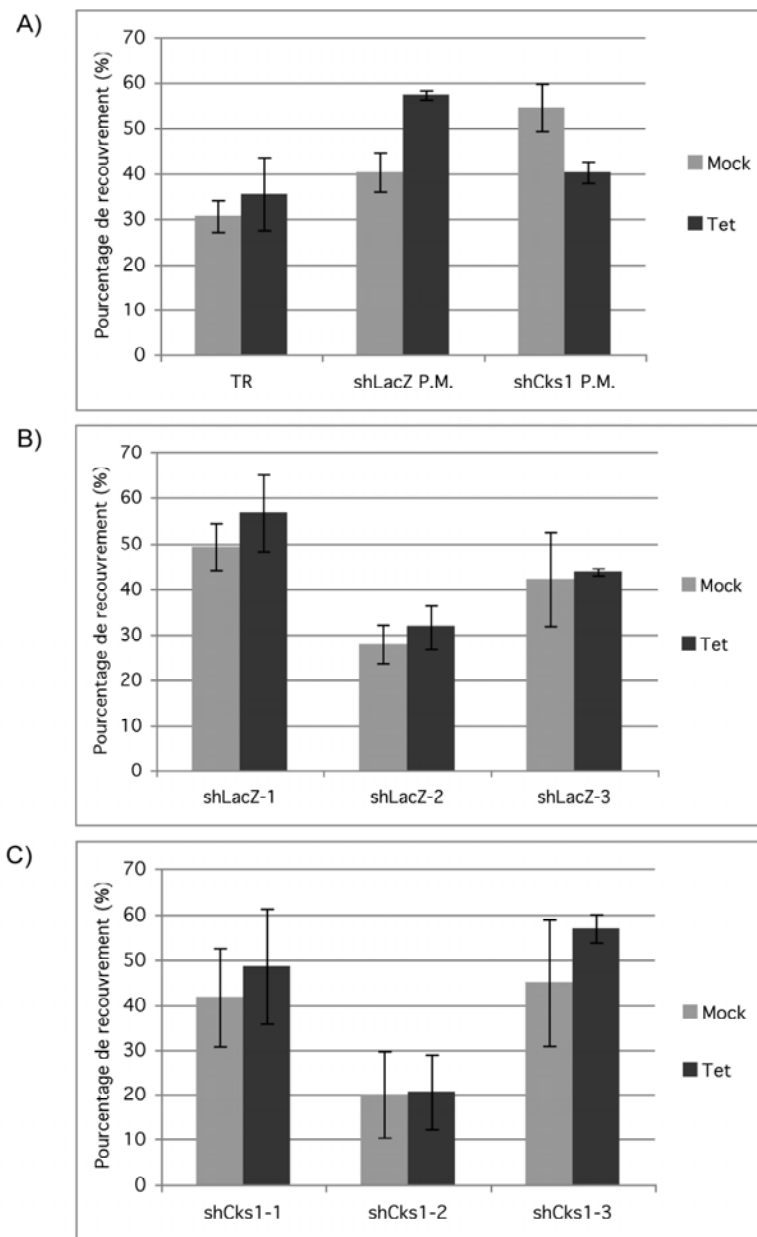


Figure 22. Représentations graphiques de la capacité de migration des différents clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée cellulaire TOV112D. Taux de recouvrement des stries déterminé par le logiciel Image-Pro Plus à 48 heures. L'expérience a été réalisée en triplicata, et pour chaque condition 24 photos ont été prises (2 photos par strie, 4 stries par puits, 3 puits par condition). Représentation de la moyenne des pourcentages des trois expériences. Les barres d'erreur ont été calculées selon l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.). (TR : lignée exprimant le répresseur à la tétracycline; shLacZ P.M. : population mixte exprimant le TR et transfecté avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1 P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant Cks1; shLacZ-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA Cks1; Mock : lignée non induite à la tétracycline; Tet : lignée induite à la tétracycline)

3.3.3 Effet de la déplétion de Cks1 sur la formation de sphéroïdes

Finalement, nous avons effectué un test de formation de sphéroïdes, pour valider si la déplétion de Cks1 allait altérer la formation de structures cellulaires en trois dimensions. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique développée au laboratoire, qui consiste à disposer les cellules sous forme de gouttelettes inversées. Comme il est possible de le constater aux figures 23 (A : Populations mixtes; B : Clones LacZ; C : Clones Cks1) et 24 (A : Populations mixtes; B : Clones LacZ; C : Clones Cks1), toutes les cellules, peu importe la condition, sont aptes à former des sphéroïdes plus ou moins compacts, selon la lignée. Or, la déplétion de Cks1 n'affecte pas la formation de sphéroïdes de façon significative dans les TOV112D-TR (Figure 23 A, B et C), ni dans les TOV1946-TR (Figure 24 A, B et C). Ainsi, la déplétion de Cks1 ne semble pas avoir d'impact sur les interactions intercellulaires.

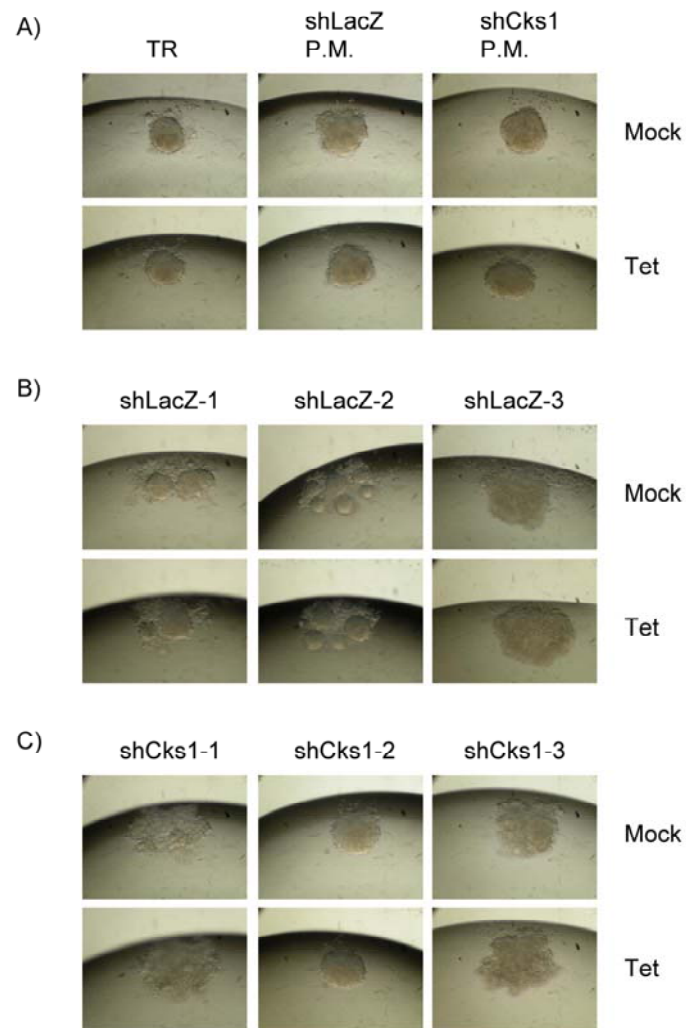


Figure 23. Formation de structures tridimensionnelles par les clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée TOV112D. L'habileté des clones dérivés à former des structures en trois dimensions est mesurée par méthode de gouttelettes inversées. Photographies significatives des sphéroïdes formés après 6 jours. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. (TR : lignée exprimant le répresseur à la tétracycline; shLacZ P.M. : population mixte exprimant le TR et transfecté avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1 P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant Cks1; shLacZ-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA Cks1; Mock : lignée non induite à la tétracycline; Tet : lignée induite à la tétracycline)

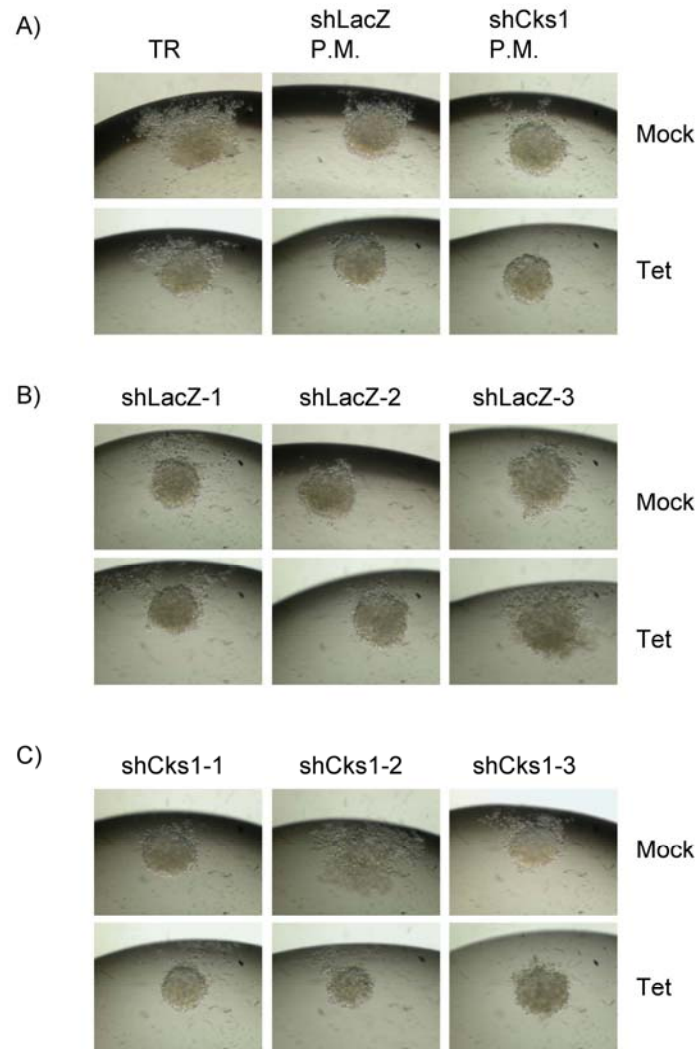


Figure 24. Formation de structures tridimensionnelles par les clones déplétés en Cks1 dérivés de la lignée TOV1946. L'habileté des clones dérivés à former des structures en trois dimensions est mesurée par méthode de gouttelettes inversées. Photographies significatives des sphéroïdes formés après 6 jours. Trois expériences indépendantes ont été effectuées. (TR : lignée exprimant le répresseur à la tétracycline; shLacZ P.M. : population mixte exprimant le TR et transfecté avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1 P.M. : Population mixte exprimant le TR et transfectée avec le shRNA ciblant Cks1; shLacZ-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA contrôle (LacZ); shCks1-1 à 3 : clones isolés exprimant le TR et transfectés avec le shRNA Cks1; Mock : lignée non induite à la tétracycline; Tet : lignée induite à la tétracycline)

CHAPITRE IV DISCUSSION

L'implication de Cks1 dans la progression tumorale de plusieurs cancers a été assez bien caractérisée, tel que démontré par plusieurs études effectuées dans les dernières années. Les scientifiques perçoivent de plus en plus Cks1 comme un oncogène, puisque sa surexpression, observée par micropuce à ADN, RT-PCR, immunobuvardage de type Western ou immunohistochimie, mènerait possiblement au développement d'un cancer [75, 77-79]. Les chercheurs ont aussi remarqué que sa surexpression entraînait une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaires, ce qui favoriserait l'enracinement des implants tumoraux au site tumoral et possiblement la métastase à distance [79]. De plus, les chercheurs ont observé que ce niveau élevé de Cks1 jouerait un rôle inhibiteur sur un des mécanismes de défense naturel de la cellule, soit l'apoptose, ce qui pousserait les cellules dérégulées à se multiplier frénétiquement en propageant des mutations hautement favorables au développement tumoral [73].

Or, bien que les effets de la surexpression de Cks1 soient plutôt bien caractérisés, son rôle précis dans la tumorigenèse reste quelque peu nébuleux. De par son rôle dans la progression du cycle cellulaire, il est tentant de spéculer que son rôle serait lié au dérèglement des points de contrôle du cycle cellulaire, notamment en transition G1/S. D'ailleurs, dans les modèles cellulaires étudiés, une surexpression de Cks1 est souvent fortement associée avec une surexpression de Skp2 (membre du complexe SCF et co-activateur de Cks1) et une faible quantité de p27 (inhibiteur de la transition G1/S du cycle cellulaire), leur cible de destruction, ce qui vient appuyer cette hypothèse [74, 80].

4.1 Implantation du système de répresseur à la tétracycline dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire

Une étude réalisée antérieurement au laboratoire, avec une micropuce à ADN de type HuFL, a révélé que Cks1 était surexprimé chez les tumeurs invasives (TOV) du cancer épithélial de l'ovaire par rapport aux tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP). Bien que ce fût la première démonstration du phénomène dans le cancer de l'ovaire, la surexpression de Cks1 a été observée à de nombreuses occasions dans d'autres cancers. Ce fût le cas, par exemple,

pour le cancer de la prostate, dans une étude menée par Lan *et al* [73], et aussi pour le NSCLC, dans une étude réalisée par Inui *et al* [72]. Les méthodes ayant servi à l'identification de la surexpression de Cks1 étaient surtout basées sur des analyses par RT-PCR à partir d'échantillons d'ARN extraits de tissus tumoraux et sains [71], mais plusieurs études par immunohistochimie ont aussi été réalisées pour valider cette surexpression dans différents tissus [69, 74], notamment dans notre laboratoire [81].

Lors du début du projet, deux avenues différentes nous étaient offertes pour valider le rôle de Cks1 dans la progression tumorale. La première aurait été de surexprimer Cks1 par clonage dans des lignées à faible potentiel de malignité qui l'expriment de façon faible à normale. Or, de telles lignées n'étaient pas disponibles en laboratoire et auraient exigé un travail plus fastidieux, puisqu'étant moins agressives, elles ont tendance à se répliquer plus lentement. La deuxième option est celle que nous avons sélectionnée, soit la déplétion de Cks1 dans des lignées tumorales invasives surexprimant Cks1 de façon endogène. Non seulement cette option était plus accessible, mais c'est celle qui est retenue dans la plupart des études visant à analyser le rôle de Cks1 dans d'autres types de cancer [75, 82]. Ces études n'utilisent généralement qu'un système de déplétion par siRNA, qui est efficace mais qui n'offre qu'un effet transitoire. Lors de notre étude, nous avons plutôt choisi un système inductible à la tétracycline utilisant des shRNA, qui a le grand avantage d'être stable, de nous permettre de faire de nombreuses études avec les mêmes clones, de travailler avec les mêmes populations que nous choisissons d'induire ou non, et qui est efficace de nombreux mois après la transfection. Le fait de pouvoir induire ou non l'expression du shRNA de Cks1 dans un même clone donne la certitude que l'effet observé est dû à la déplétion de Cks1.

Le système de répresseur à la tétracycline a été mis en place dans nos lignées cellulaires choisies, soit les TOV112D et les TOV1946, qui sont respectivement des lignées cellulaires de type endométrioïde et séreux (Figure 15). Cks1, à l'origine, avait été identifié chez des échantillons de type séreux, ce qui justifie l'emploi de la lignée cellulaire TOV1946. Pour sa part, la lignée TOV112D a un phénotype très agressif, et l'utilisation d'une deuxième lignée cellulaire nous a permis de comparer les effets de la déplétion sur deux types de cancers ovariens différents. De plus, rappelons que ces deux lignées cellulaires démontraient, suite aux analyses de la micropuce, un taux endogène élevé de Cks1 [45].

4.2 Déplétion de Cks1 par un système de shRNA inductible dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire

La prochaine étape fut de tester les différentes constructions de shRNA dans nos lignées cellulaires exprimant le répresseur à la tétracycline, soit les lignées TOV112D-TR et TOV1946-TR. Pour faire nos constructions, nous nous sommes inspiré des séquences de siRNA déjà utilisées dans les études d'autres groupes et ayant montré une bonne efficacité de déplétion [75, 77]. Les siRNAs ont été transformés en shRNAs à l'aide du logiciel bioinformatique fourni par Invitrogen; ceci est fait en ajoutant des attaches, pour que la séquence puisse s'intégrer dans le plasmide, mais aussi en ajoutant une boucle qui lui confère sa structure en épingle à cheveux. Les shRNA contre LacZ (contrôle) et Cks1 ont d'abord été transfectés dans les lignées cellulaires pour vérifier leur efficacité. Puis, nous avons choisi de travailler avec l'infection comme système de transduction pour obtenir nos populations mixtes, ainsi que nos clones individuels. L'infection constitue en effet une méthode de choix, puisqu'elle présente une excellente efficacité, soit de près de 99%, contrairement à environ 50% par transfection régulière à la lipofectamine. Tel que présenté dans les résultats, la population mixte et les clones individuels transfectés avec LacZ n'ont aucune influence sur le niveau protéique de Cks1, avant ou après induction (Figures 16 et 17). Or, les constructions de shRNA dirigées contre Cks1 ont montré une belle efficacité pour dépler Cks1 dans nos lignées, après induction (Figures 16 et 18).

Il est toutefois important de constater que les différents clones contrôle, ainsi que les clones déplétés en Cks1, montrent une certaine variabilité et ce, dans les deux lignées cellulaires. Il faut souligner que le shRNA, puisqu'il s'incorpore dans le génome, ne le fera pas au même endroit pour tous les clones ce qui pourrait engendrer un effet clonal; par exemple, si le shRNA s'incorpore en aval d'un promoteur, il sera plus exprimé que s'il se retrouve dans une zone non-transcrite. De plus, bien que les lignées TR sont issues d'un seul clone, il se peut que ce clone ait muté ou évolué au fil des passages, ce qui rendrait cette population, à l'origine homogène, plus hétérogène. Cet effet clonal explique pourquoi nous avons choisi de travailler avec les populations mixtes, aussi bien qu'avec trois clones indépendants pour chaque condition.

Malgré le nombre de séquences testées, une seule a montré une bonne efficacité pour dépleter Cks1 dans nos cellules, soit la séquence Cks1-7 (voir Tableau II). Pourtant, les cinq séquences testées, sous forme de siRNA dans les études respectives [75, 77], avaient montré une belle efficacité de déplétion de Cks1. Bien que ces siRNAs aient été testés dans des lignées cellulaires différentes des nôtres, il est quand même étonnant de voir que ces séquences, transformées en shRNA, n'aient pas d'effet dans nos lignées cellulaires de l'ovaire testées. Ceci pourrait être partiellement explicable par le fait qu'il peut exister des légères variations dans la séquence de Cks1 à travers les types cellulaires. De plus, l'ajout de séquences formant les attaches et la boucle, cruciales pour la structure du shRNA, peut jouer sur l'efficacité de déplétion du shRNA, comparativement au siRNA qui a une structure plus simple.

4.3 Effets de la déplétion de Cks1 sur la croissance cellulaire

Étant donné le rôle clé de Cks1 dans la progression du cycle cellulaire, nous supposons que la prolifération ces cellules serait affectée suite à sa déplétion. Toutefois, tel qu'illustré sur nos diverses courbes de croissance, nous n'avons pas observé de différences significatives au niveau de la croissance cellulaire entre les clones déplétés en Cks1 et les clones correspondant exprimant Cks1, ainsi que chez les clones contrôle (Figures 19 et 20). La méthode utilisée pour quantifier la prolifération cellulaire en est une qui est simple, rapide, et couramment exécutée au laboratoire, soit le compte cellulaire sur une période de cinq jours. Il est possible de remarquer que, pour la lignée cellulaire TOV112D, les cellules sont toujours en phase de croissance exponentielle, puisqu'aucune des conditions étudiées ne présente de plateau ou de pentes descendantes. Pourtant, au cinquième jour, les cellules observées avant le compte étaient pour la plupart confluentes. Il aurait pu être intéressant de poursuivre l'expérience en laissant les cellules croître encore quelques jours, pour voir si la phase de plateau aurait été atteinte rapidement; ceci aurait pu être fait en changeant le milieu des cellules de façon régulière (afin de ne pas créer de stimulation excessive des cellules), par exemple aux 2 jours. Cette phase de plateau a toutefois été observée chez les TOV1946, plus précisément chez certains clones contrôle. Il est aussi possible de remarquer que les TOV112D, bien qu'elles soient ensemencées à la même densité que les TOV1946 au départ, croissent de façon un peu

plus importante que ces dernières, tel que démontré antérieurement au laboratoire [42]. Les caractéristiques de ces deux lignées permettraient peut-être d'apporter certains éléments de réponses, pouvant expliquer les phénomènes observés. Premièrement, les TOV112D sont beaucoup plus petites que les TOV1946, ce qui pourrait expliquer pourquoi elles n'atteignent pas la phase de plateau plus rapidement; la confluence, à densité de départ égale, est plus longue à atteindre. Toutefois, leur temps de dédoublement est beaucoup plus court que chez les TOV1946, ce qui explique pourquoi elles sont plus nombreuses lors du compte cellulaire [42, 43].

Kitajima *et al* ont validé l'effet de la déplétion de Cks1 par siRNA sur la prolifération cellulaire, montrant un ralentissement de croissance chez les cellules du cancer oral squameux [75]. Pour tester la croissance cellulaire, ils ont compté les cellules à l'aide d'un compteur cellulaire pendant six jours, donc selon une méthode similaire à la nôtre. Toutefois, au sixième jour, ils ont noté un écart significatif de croissance entre les cellules OSCC normales et celles qui ont été transfectées avec un siRNA contre Cks1. En plus du compte cellulaire, ils ont effectué un essai d'incorporation de BrdU, qui permet aussi de quantifier la vitesse à laquelle les cellules se répliquent, et ont aussi observé un ralentissement de croissance cellulaire suite à la déplétion de Cks1 par rapport au contrôle. La technique employée par cette équipe s'est avérée efficace, puisque le siRNA a un effet très précoce dans la cellule, comparativement au shRNA qui doit s'incorporer dans le génome, pour ensuite être transcrit et transformé. Or, la technique employant des siRNA a aussi ses désavantages, comme celui d'avoir un effet transitoire.

Des études de surexpression de Cks1 ont aussi démontré qu'il y avait une augmentation de la prolifération cellulaire suite à la transfection du plasmide codant pour Cks1 dans des cellules issues de tumeurs bénignes [73]. Celles-ci appuient donc l'hypothèse que la surexpression de Cks1 retrouvée dans certains types cellulaires cancéreux joue un rôle dans la progression tumorale, notamment au niveau de la croissance cellulaire. Toutefois, dans le cas du cancer de l'ovaire, cette démonstration n'a pas pu être observée ou n'a pas encore été publiée.

4.4 Effets de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire

La progression tumorale peut aussi être évaluée par la capacité des cellules tumorales à se disséminer, soit le potentiel migratoire des cellules. La déplétion de Cks1 dans la lignée

cellulaire TOV112D n'a pas semblé avoir d'impact sur la migration cellulaire, tel que démontré par l'étude de recouvrement de blessure effectuée (Figures 21 et 22). Autant chez les clones contrôle que les clones déplétés en Cks1, aucune différence notable n'a été observée et ce, avant ou après induction à la tétracycline. Il semblait y avoir une légère tendance observable dans la population mixte déplétée en Cks1, mais cette tendance ne s'est pas répétée chez les clones. Aussi, il est possible d'observer une grande variabilité du taux de recouvrement de la plaie, d'un clone à l'autre, à travers les réplicas. Ceci est probablement dû au fait que les stries pratiquées sur les cellules à confluence sont difficilement reproductibles d'un essai à l'autre, ce qui fait fluctuer la largeur de ces dernières. Nous avons aussi tenté de tester l'effet de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire dans les TOV1946, mais nous avons rencontré des problèmes d'adhésion cellulaire lors de la fixation de ces dernières, rendant impossible l'analyse des résultats obtenus pour cette lignée cellulaire.

D'autres études ont montré un effet de la déplétion de Cks1 sur la migration cellulaire. À titre d'exemple, Wang et al., en 2009, ont publié un article montrant que la déplétion de Cks1 avait un impact important sur la migration cellulaire dans le cancer du sein [79]. Toutefois, leur approche pour la déplétion était basée sur une technique de siRNA et, surtout, leur méthode pour tester la migration était différente de la nôtre. Ils ont en effetensemencé des cellules MDA-MB-231 sur des inserts composés d'une membrane de polycarbonate recouverts d'une couche de fibronectine. Bien que la méthode des inserts soit couramment utilisée pour quantifier la migration cellulaire, elle reste moins visuelle que la méthode que nous avons utilisée, soit le recouvrement d'une plaie et, à moins d'avoir des inserts commerciaux parfaitement identiques, elle peut elle aussi entraîner une certaine variation. Toutefois, pour la lignée TOV1946, la méthode par inserts aurait pu constituer une belle alternative pour pallier aux problèmes d'adhésion observés avec ces cellules.

4.5 Habilité de nos différents clones à former des structures tridimensionnelles

Un des aspects testés pour évaluer l'impact de la progression tumorale suite à la déplétion de Cks1 était la formation de structures tridimensionnelles. En effet, ce paramètre permet d'évaluer l'adhésion cellulaire. La perte d'habileté des cellules à former des sphéroïdes est

associée avec une diminution du potentiel tumorigénique [83]. La déplétion de Cks1 n'a pas eu d'impact majeur au niveau de la morphologie des sphéroïdes, tant chez les clones contrôle que chez les clones déplétés en Cks1 (Figures 23 et 24). L'utilisation de cette technique permet, *in vitro*, de recréer une structure en trois dimensions plus représentative de ce qui se passe au niveau des tumeurs évoluant physiologiquement chez les patientes. Cependant, une des grandes lacunes de ce modèle est qu'il n'est pas capable de recréer parfaitement le microenvironnement tumoral retrouvé chez celles-ci. Peut-être que c'est ce facteur qui a fait en sorte que nous n'avons pas observé de différences majeures. L'ajout de certains types cellulaires (tel que des fibroblastes) dans des gouttelettes inversées pourrait possiblement influencer positivement les interactions intercellulaires et donner lieu à un modèle plus proche de la réalité, nous donnant ainsi une meilleure indication du rôle possible que pourrait jouer Cks1 dans la progression tumorale.

Aucune autre étude n'a testé l'effet de la déplétion de Cks1 sur la formation de structures tridimensionnelles. De plus, aucune étude chez la souris pour un modèle *in vivo* de cancer n'a été effectuée; les connaissances tirées de la déplétion de Cks1 dans les cellules tumorales ou de sa surexpression dans des cellules normales ou issues de tumeurs bénignes ne sont donc tirées que d'études de modèles *in vitro* en deux dimensions. L'utilisation de la méthode des gouttelettes inversées est facilement justifiable par le fait qu'elle est facile à réaliser, reproductible, peu coûteuse et éprouvée au laboratoire [44].

4.6 Synthèse

Comment expliquer que les résultats présentés ici, dans notre étude du CÉO, ne reflètent pas ce qui est rencontré dans la littérature? Tout d'abord, c'est la première fois que la déplétion de Cks1 est étudiée dans le CÉO. De plus, les méthodes utilisées lors de notre étude diffèrent en plusieurs points de celles utilisées dans la littérature. Il pourrait être pertinent de tenter de reproduire les expériences telles qu'elles ont été réalisées dans la littérature; or, les méthodes utilisées au laboratoire ont été éprouvées pour déterminer l'impact d'un gène candidat dans la progression tumorale et ce, depuis de nombreuses années [42, 43, 84].

D'autres pourraient croire que l'induction à la tétracycline réalisée pour enclencher l'activation de la déplétion de Cks1 ne dure que de façon très transitoire, et que la perte rapide de

l'expression du shRNA pourrait expliquer pourquoi aucun effet n'est observé. Toutefois, nous avons réalisé une expérience test où nous avons incubé les cellules pendant trois jours avec la tétracycline et où ces cellules ont été passées à tous les trois jours pendant environ 14 jours, sans rajouter de tétracycline. Des extraits protéiques ont été recueillis à chaque passage, et une analyse par immunobuvardage de type Western nous a clairement montré que la déplétion de Cks1 est encore effective 14 jours après son induction initiale (données non présentées). Comme le plus long laps de temps écoulé durant nos expériences est de 5 jours après induction à la tétracycline, nous pouvons conclure que ce facteur n'a pas influencé les résultats obtenus.

Nous pourrions aussi penser que Cks2, le deuxième membre de la famille Cks, pourrait jouer un rôle de sauveteur des fonctions de Cks1, lorsque ce dernier est déplété. À ce jour, nous ne connaissons toutefois pas le statut de Cks2 dans les lignées cellulaires du cancer de l'ovaire au laboratoire. Bien que Cks1 et Cks2 partagent 87% d'homologie, Cks2 est incapable d'effectuer certaines fonctions de Cks1, telle que l'ubiquitination de p27, mais serait crucial pour la méiose [85]. Les souris déplétées en Cks1 ou en Cks2 sont toutes viables, mais présentent une différence dans la taille des spécimens, qui s'avèrent être plus petits [86]. Or, les souris déplétées à la fois en Cks1 et en Cks2 sont létales, mourant après à peine deux à quatre cycles de division cellulaire [85]. Les études suggèrent qu'il y aurait une redondance dans le rôle de Cks2 par rapport à celui de Cks1, par exemple lors de l'entrée et de la sortie de la mitose, mais le rôle précis de Cks2 reste à élucider [86].

Une piste nous mène toutefois à croire que les effets que nous avons observés suite à la déplétion de Cks1 dans le cancer de l'ovaire ne seraient pas un cas isolé. En effet, une étude menée récemment par Nam *et al* a montré que les niveaux de p27, la cible de destruction de Cks1, n'avaient pas d'impact sur le pronostic des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire [87]. Dans le cancer du sein, Westbrook *et al* a aussi observé la surexpression de Cks1, sans toutefois observer de diminution de p27 [88]. Finalement, Kawakami *et al* n'a pas observé de corrélation clinique entre Cks1 et p27, dans une étude visant à analyser l'implication de ces protéines dans le cancer urothélial humain [71]. Ces observations nous portent donc à croire que le rôle de Cks1 dans la progression tumorale n'est probablement pas associé à sa fonction dans la dégradation de p27, mais possiblement via une autre fonction au sein de la cellule.

Une des hypothèses quant au rôle que Cks1 dans la progression tumorale avait été mise en lumière lors de l'étude de micropuce effectuée au laboratoire par Ouellet *et al* [45]. Cette étude avait identifié Cks1 comme étant surexprimé dans les tumeurs TOV, mais aussi Cdc20, dont la transcription est augmentée par la liaison de Cks1 sur son promoteur [64]. Il est donc tentant de spéculer que les effets de la surexpression de Cks1 seraient liés à une transcription accrue de Cdc20, qui lui-même joue un rôle clé dans la progression de la mitose. Hormis Cdc20, Cks1 joue aussi un rôle dans la transcription de d'autres gènes; il serait intéressant de voir si ceux-ci se retrouvent dans la liste de candidats identifiés par la micropuce. Des études supplémentaires pourraient nous donner plus de précisions sur ce rôle potentiel de Cks1.

PERSPECTIVES

Le manque d'effet suite à la déplétion de Cks1 sur les paramètres testés ouvre la porte à plusieurs nouvelles avenues au point de vue fondamental. Comment expliquer que la déplétion de Cks1 n'affecte pas la croissance cellulaire, alors que Cks1 se retrouve au cœur du cycle de réplication de la cellule? L'absence de réponse nous pousse à investiguer de façon plus approfondie d'autres rôles insoupçonnés de Cks1 dans la progression tumorale du cancer de l'ovaire.

Les perspectives à court terme seraient de compléter l'analyse des paramètres de progression tumorale, soit d'entamer une étude d'invasion cellulaire, exploitant la technologie des chambres de Boyden recouvertes de Matrigel couramment utilisée au laboratoire, et de voir si la déplétion de Cks1 affecte le potentiel invasif des cellules.

Afin de connaître l'impact de la déplétion de Cks1 dans un modèle qui se rapproche de l'humain, nous pourrions aussi mener une étude à plus large échelle *in vivo* chez des souris SCID, auxquelles nous injecterions dans la cavité péritonéale des cellules tumorales de l'ovaire contenant les différents shRNAs en induisant la déplétion de Cks1 par une diète supplémentée en doxycycline, un analogue de la tétracycline. Ceci pourrait nous indiquer si l'expression de Cks1 influence la formation de tumeurs *in vivo*. Nous pourrions aussi tester d'autres séquences de shRNA, afin de confirmer les effets (ou le manque d'effets) observés lors de nos analyses.

À moyen terme, nous pourrions surexprimer Cks1 dans des lignées cellulaires issues d'ovaires normaux, de tumeurs bénignes ou de tumeurs à faible potentiel de malignité, afin de constater si la surexpression de cette protéine provoque la transformation tumorale.

Il pourrait aussi être très intéressant d'évaluer l'effet de la fluoxétine (Prozac™), un inhibiteur de l'activité de Cks1, dans nos lignées cellulaires tumorales du laboratoire, pour confirmer si les effets observés par ARN interférence dans la présente étude seraient reproduits à l'aide de cet inhibiteur.

Finalement, il serait bien de vérifier à plus long terme quel est le profil d'expression des interacteurs de Cks1, par exemple p27, les membres du complexe SCF, Skp2 et même de ses cibles transcriptionnelles, afin de constater, seuls ou en combinaison avec Cks1, le portrait global de ce qui se passe au niveau moléculaire lorsqu'il y a formation et progression de la tumeur. Une meilleure compréhension de Cks1 au sein du développement du cancer épithélial est primordiale, et permettrait d'évaluer sa candidature comme cible thérapeutique potentielle, en combinaison avec d'autres cibles.

CONCLUSIONS

Mon projet de maîtrise avait pour but de faire la lumière sur le rôle de Cks1, régulateur du cycle cellulaire, dans la progression du cancer épithélial de l'ovaire. Nous n'avons pas observé d'effet de la déplétion de Cks1 sur les paramètres testés, soit la croissance et la migration cellulaires, ainsi que la formation de structures tridimensionnelles (sphéroïdes). Ces résultats soulèvent plusieurs interrogations, notamment la raison pour laquelle Cks1 se retrouve surexprimé dans les échantillons de tumeurs invasives du cancer de l'ovaire, alors qu'il est exprimé plus faiblement chez les tumeurs à faible potentiel de malignité. Cks1, considéré comme un oncogène, aurait-il un rôle différent à jouer qu'au sein du cycle cellulaire dans la présente pathologie? La manifestation de sa surexpression ne se fait peut-être que par la transcription accrue de d'autres gènes dont les effets n'ont pas été visibles lors des expériences effectuées lors de ce projet, mais possiblement via d'autres paramètres biologiques.

CHAPITRE V RÉFÉRENCES

1. Cederroth, C.R., et al., *Genetic programs that regulate testicular and ovarian development*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 3-9.
2. Satoh, M., *Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos*. J Anat, 1991. **177**: p. 85-107.
3. Sekido, R. and R. Lovell-Badge, *Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge?* Trends Genet, 2009. **25**(1): p. 19-29.
4. Voutilainen, R., *Differentiation of the fetal gonad*. Horm Res, 1992. **38 Suppl 2**: p. 66-71.
5. Campbell, N.A., ed. *Biologie*. ed. ERPI. 1995: Saint-Laurent. 1190.
6. Brooker, C., *Le corps humain: Étude, structure et fonction*, ed. É.D. Boeck. 1998, Bruxelles.
7. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 2002.
8. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 255-88.
9. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
10. Benedet, J.L., et al., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. Int J Gynaecol Obstet, 2000. **70**(2): p. 209-62.
11. Hart, W.R., *Borderline epithelial tumors of the ovary*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S33-50.
12. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
13. Soslow, R.A., *Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 161-74.
14. Wang, V., et al., *Ovarian cancer is a heterogeneous disease*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **161**(2): p. 170-3.
15. Bell, D.A., *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*. Mod Pathol, 2005. **18 Suppl 2**: p. S19-32.
16. Murdoch, W.J. and A.C. McDonnell, *Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis*. Reproduction, 2002. **123**(6): p. 743-50.
17. Menon, U., et al., *Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS)*. Lancet Oncol, 2009. **10**(4): p. 327-40.
18. Nakayama, N., et al., *KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(12): p. 2020-8.
19. Landen, C.N., Jr., M.J. Birrer, and A.K. Sood, *Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(6): p. 995-1005.
20. Crum, C.P., et al., *The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(1): p. 3-9.

21. Société canadienne du cancer, I.N.d.c.d.C., Statistique Canada, *Statistiques canadiennes sur le cancer 2009*, A.d.l.s.p.d.C. Registres du cancer des provinces et des territoires, Editor. 2009, Statistique Canada.
22. Vo, C. and M.E. Carney, *Ovarian cancer hormonal and environmental risk effect*. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2007. **34**(4): p. 687-700, viii.
23. 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.
24. Hanna, L. and M. Adams, *Prevention of ovarian cancer*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006. **20**(2): p. 339-62.
25. Mills, P.K., et al., *Perineal talc exposure and epithelial ovarian cancer risk in the Central Valley of California*. *Int J Cancer*, 2004. **112**(3): p. 458-64.
26. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* *Lancet*, 1971. **2**(7716): p. 163.
27. McGuire, V., et al., *Relation of contraceptive and reproductive history to ovarian cancer risk in carriers and noncarriers of BRCA1 gene mutations*. *Am J Epidemiol*, 2004. **160**(7): p. 613-8.
28. Salehi, F., et al., *Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2008. **11**(3-4): p. 301-21.
29. Risch, H.A., *Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(23): p. 1774-86.
30. Partridge, E.E. and M.N. Barnes, *Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment*. *CA Cancer J Clin*, 1999. **49**(5): p. 297-320.
31. Bast, R.C., Jr., et al., *A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 1983. **309**(15): p. 883-7.
32. Gogoi, R., S. Srinivasan, and D.A. Fishman, *Progress in biomarker discovery for diagnostic testing in epithelial ovarian cancer*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006. **6**(4): p. 627-37.
33. Lee, C.L., et al., *The roles of laparoscopy in treating ovarian cancer*. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2009. **48**(1): p. 9-14.
34. Aabo, K., et al., *Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials*. *Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group*. *Br J Cancer*, 1998. **78**(11): p. 1479-87.
35. Dembo, A.J., *Abdominopelvic radiotherapy in ovarian cancer. A 10-year experience*. *Cancer*, 1985. **55**(9 Suppl): p. 2285-90.
36. Armstrong, D.K., *Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease*. *Oncologist*, 2002. **7 Suppl 5**: p. 20-8.
37. Therasse, P., et al., *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors*. *European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(3): p. 205-16.
38. Friedlander, M.L., *Prognostic factors in ovarian cancer*. *Semin Oncol*, 1998. **25**(3): p. 305-14.
39. Makar, A.P., et al., *The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 1995. **56**(2): p. 175-80.
40. Kruk, P.A., S.L. Maines-Bandiera, and N. Auersperg, *A simplified method to culture human ovarian surface epithelium*. *Lab Invest*, 1990. **63**(1): p. 132-6.

41. Lounis, H., et al., *Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies*. *Exp Cell Res*, 1994. **215**(2): p. 303-9.
42. Ouellet, V., et al., *Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 152.
43. 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.
44. Zietarska, M., et al., *Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC)*. *Mol Carcinog*, 2007. **46**(10): p. 872-85.
45. Ouellet, V., et al., *Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling*. *Oncogene*, 2005. **24**(29): p. 4672-87.
46. Ouellet, V., et al., *Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(3): p. 599-607.
47. Pines, J., *Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins*. *Curr Biol*, 1996. **6**(11): p. 1399-402.
48. Hadwiger, J.A., et al., *The *Saccharomyces cerevisiae* *CKS1* gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the *Cdc28* protein kinase complex*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(5): p. 2034-41.
49. Bourne, Y., et al., *Crystal structure and mutational analysis of the human *CDK2* kinase complex with cell cycle-regulatory protein *CksHs1**. *Cell*, 1996. **84**(6): p. 863-74.
50. Hayles, J., et al., *The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function*. *Mol Gen Genet*, 1986. **202**(2): p. 291-3.
51. Tang, Y. and S.I. Reed, *The *Cdk*-associated protein *Cks1* functions both in *G1* and *G2* in *Saccharomyces cerevisiae**. *Genes Dev*, 1993. **7**(5): p. 822-32.
52. Reynard, G.J., et al., **Cks1* is required for *G(1)* cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(16): p. 5858-64.
53. Patra, D. and W.G. Dunphy, **Xe-p9*, a *Xenopus* *Suc1/Cks* homolog, has multiple essential roles in cell cycle control*. *Genes Dev*, 1996. **10**(12): p. 1503-15.
54. Dehay, C. and H. Kennedy, *Cell-cycle control and cortical development*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(6): p. 438-50.
55. Nigg, E.A., *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle*. *Bioessays*, 1995. **17**(6): p. 471-80.
56. Peter, M. and I. Herskowitz, *Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle*. *Cell*, 1994. **79**(2): p. 181-4.
57. Elledge, S.J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis*. *Science*, 1996. **274**(5293): p. 1664-72.
58. Flatt, P.M. and J.A. Pietsenpol, *Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery*. *Drug Metab Rev*, 2000. **32**(3-4): p. 283-305.
59. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of *G1*-phase progression*. *Genes Dev*, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
60. Bartek, J. and J. Lukas, **p27* destruction: *Cks1* pulls the trigger*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(4): p. E95-8.
61. Tsvetkov, L.M., et al., **p27(Kip1)* ubiquitination and degradation is regulated by the *SCF(Skp2)* complex through phosphorylated *Thr187* in *p27**. *Curr Biol*, 1999. **9**(12): p. 661-4.
62. Ganoth, D., et al., *The cell-cycle regulatory protein *Cks1* is required for *SCF(Skp2)*-mediated ubiquitinylation of *p27**. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(3): p. 321-4.

63. Spruck, C., et al., *A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 639-50.
64. Morris, M.C., et al., *Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast*. Nature, 2003. **423**(6943): p. 1009-13.
65. Machado, E., M. Eguren, and M. Malumbres, *The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions*. Biochem Soc Trans. **38**(Pt 1): p. 65-71.
66. Hixon, M.L., et al., *Ectopic expression of cdc2/cdc28 kinase subunit Homo sapiens 1 uncouples cyclin B metabolism from the mitotic spindle cell cycle checkpoint*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6224-37.
67. Wolthuis, R., et al., *Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A*. Mol Cell, 2008. **30**(3): p. 290-302.
68. Slotky, M., et al., *The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. R737-44.
69. Shapira, M., et al., *The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(7): p. 1336-46.
70. Masuda, T.A., et al., *Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(15): p. 5693-8.
71. Kawakami, K., et al., *Increased SKP2 and CKS1 gene expression contributes to the progression of human urothelial carcinoma*. J Urol, 2007. **178**(1): p. 301-7.
72. Inui, N., et al., *High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(3): p. 978-84.
73. Lan, Y., et al., *Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death*. Int J Cancer, 2008. **123**(3): p. 543-51.
74. Liu, Z., et al., *Prognostic implication of p27Kip1, Skp2 and Cks1 expression in renal cell carcinoma: a tissue microarray study*. J Exp Clin Cancer Res, 2008. **27**: p. 51.
75. Kitajima, S., et al., *Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation*. Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 2147-55.
76. Campeau, E., et al., *A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6529.
77. Westbrook, L., et al., *Cks1 regulates cdk1 expression: a novel role during mitotic entry in breast cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(23): p. 11393-401.
78. Krishnan, A., S.A. Nair, and M.R. Pillai, *Loss of cks1 homeostasis deregulates cell division cycle*. J Cell Mol Med, 2009.
79. Wang, X.C., et al., *Role of Cks1 amplification and overexpression in breast cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **379**(4): p. 1107-13.
80. Zolota, V.G., et al., *Histologic-Type Specific Role of Cell Cycle Regulators in Non-Small Cell Lung Carcinoma*. J Surg Res, 2009.
81. Ouellet, V., et al., *Immunohistochemical profiling of benign, low malignant potential and low grade serous epithelial ovarian tumors*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 346.
82. Wang, X.C., et al., *Overexpression of Cks1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis in breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(10): p. 1393-401.
83. Cody, N.A., et al., *Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p*. Oncogene, 2007. **26**(4): p. 618-32.

84. Puiffe, M.L., et al., *Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer*. *Neoplasia*, 2007. **9**(10): p. 820-9.
85. Martinsson-Ahlzen, H.S., et al., *Cyclin-dependent kinase-associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(18): p. 5698-709.
86. Donovan, P.J. and S.I. Reed, *Germline exclusion of Cks1 in the mouse reveals a metaphase I role for Cks proteins in male and female meiosis*. *Cell Cycle*, 2003. **2**(4): p. 275-6.
87. Nam, E.J. and Y.T. Kim, *Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2008. **18**(6): p. 1169-82.
88. Westbrook, L., et al., *High Cks1 expression in transgenic and carcinogen-initiated mammary tumors is not always accompanied by reduction in p27Kip1*. *Int J Oncol*, 2009. **34**(5): p. 1425-31.