

Université de Montréal

Le cancer épithélial des ovaires à cellules claires et de type mucineux

exprime un niveau élevé de HYAL-1

Corrélation inverse avec l'expression des récepteurs d'estrogène et de progestérone

Par

Paule-Hélène Yoffou

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.) en biochimie

Août 2010

Copyright Paule-Hélène Yoffou, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Le cancer épithélial des ovaires à cellules claires et de type mucineux

exprime un niveau élevé de HYAL-1

Corrélation inverse avec l'expression des récepteurs d'estrogène et de progestérone

Présenté par:

Paule-Hélène Yoffou

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry, dep Biochimie

Président rapporteur

Dr Manjunath Puttaswamy

Co Directeur de recherche

Dr Euridice Carmona

Directeur de recherche

Dr Estelle Schmitt, dep Médecine

Membre du jury

Résumé

Le cancer épithélial des ovaires (CEO) est classifié en sous types histopathologiques identifiés tel que séreux, endométrioïde, à cellules claires et mucineux. Une analyse génétique réalisée au niveau moléculaire a suggéré un rôle pour des gènes suppresseurs de tumeur localisés sur le bras court du chromosome 3p21.3 dans la pathogénèse du CEO de type séreux. Notre objectif était d'évaluer le profil d'expression de HYAL-1, localisé dans cette même région, dans les différents sous types du CEO, et de vérifier une éventuelle corrélation avec l'expression des récepteurs d'hormones stéroïdiennes. Pour se faire, nous avons analysé par RT-PCR quantitative l'expression de l'ARNm de HYAL-1, des récepteurs d'estrogène (ER- α et ER- β) et du récepteur de progestérone (PR) dans des échantillons de tissus extraits de tumeurs du CEO provenant de deux cohortes indépendantes et dans des lignées cellulaires. Nous avons également réalisé des analyses bioinformatiques à partir de l'expression de ces gènes en ayant recours à une base de données de microarray disponible en ligne et ouverte au public. Par la suite, nous avons mesuré l'activité enzymatique de HYAL-1 dans des lignées cellulaires du CEO et dans des échantillons de plasma. Nos résultats ont montré que l'expression de l'ARNm de HYAL-1 était élevée dans le type à cellules claires et mucineux mais non dans les types séreux et endométrioïdes, autant dans les échantillons sains que de ceux provenant de tumeurs bénignes. De façon cohérente, le niveau d'ARNm et l'activité enzymatique de HYAL-1 étaient élevés dans les lignées cellulaires à cellules claires et mucineuses.

Nous avons aussi démontré qu'il y avait une corrélation inverse entre les niveaux de l'ARNm de HYAL-1 et ceux d'ER- α et PR dans les échantillons de tissus de CEO du type mucineux et à cellules claires. De façon similaire, nous avons noté que l'activité de HYAL-1 était élevée dans le plasma de ces mêmes patients. En conséquence nos travaux proposent HYAL-1 en tant que biomarqueur potentiel dans le cas des CEO de type à cellules claires et mucineux présentant un faible niveau d'expression d'ER- α et PR.

Mots clés : Hyaluronidase-1, cancer des ovaires à cellules claires, cancer des ovaires de type mucineux, récepteur d'estrogène alpha

Abstract

Epithelial ovarian cancer (EOC) is morphologically heterogeneous being classified as serous, endometrioid, clear cell, or mucinous. Molecular genetic analysis has suggested a role for tumor suppressor genes located on chromosome 3p in the pathogenesis of serous EOC. Our objective was to evaluate the expression of *HYAL-1*, located at chromosome 3p21.3, in these EOC subtypes, and to verify a possible correlation with the expression of steroid hormone receptors. We analyzed the mRNA expression of *HYAL-1*, estrogen receptor (ER)- α , ER- β and progesterone receptor (PR) in EOC tumor samples and cell lines using quantitative RT-PCR. We also performed bioinformatics analyses on the expression of these genes using a publicly available microarray dataset. HYAL-1 enzyme activity was measured in EOC cell lines and in plasma samples from patients. We found that *HYAL-1* mRNA expression was elevated in clear cell and mucinous EOC tissue samples, but not in serous and endometrioid samples, normal ovaries or benign tumors. Significantly, similar results were obtained by two different techniques and with tissue sample cohorts from two independent institutions. Concordantly, *HYAL-1* mRNA levels and enzyme activity were elevated in EOC cell lines derived from clear cell and mucinous subtypes. We also showed that *HYAL-1* mRNA was inversely correlated to that of ER- α and PR, but not to that of ER- β , specifically in clear cell and mucinous EOC tissue samples. HYAL-1 activity was also high in the plasma of patients with these EOC subtypes. Our results suggest Hyaluronidase-1 as a potential target/biomarker for

clear cell and mucinous EOCs and especially in tumors with low levels of ER- α and PR

Table des matières

The table of contents is empty because none of the paragraph styles selected in the Document Inspector are used in the document.

Liste des tableaux et figures

<u>Figure I. Représentation des différents types histologiques majeurs du cancer des ovaires. [Extraie de Cho & Shih 2009].</u>	2
<u>Figure II. Progression histologique et génétique moléculaire du cancer ovarien de type endométrioïde. [Extraie de Cho & Shih 2009].</u>	8
<u>Figure III. Arrangement chromosomique des différents gènes des hyaluronidases chez l'humain et la souris.</u>	14
<u>Figure IV. Représentation des différents domaines protéiques des hyaluronidases.</u>	15
<u>Figure V. Structure génomique des gènes hyaluronidases. Les exons sont indiqués avec les rectangles jaunes et les introns avec les rectangles vert foncés. [Extraie de www.glycoforum.gr.jp].</u>	16
<u>Figure VI. Représentation de la présumée réaction endoprotéolytique de HYAL-1. HYAL-1 non clivée est montré au-dessus de la figure.</u>	18
<u>Table I - Samples and clinical data of ovarian cancer patients for each analysis dataset.</u>	58
<u>Table II - Correlation coefficient for <i>HYAL-1</i> mRNA expression with those of progesterone receptor (PR), or estrogen receptors alpha (ERα) or beta (ERβ).</u>	59
<u>Figure 1. HYAL-1 expression in ovarian cancer tissue samples and cell lines.</u>	60
<u>Figure 2. Expression of progesterone receptor (A), and estrogen receptors alpha (B) and beta (C) in ovarian cancer cell lines and tissue samples.</u>	61

Figure 3. Correlation of HYAL-1 expression with those of estrogen receptor alpha (A) and progesterone receptor (B).....62

Figure 4. Secreted HYAL-1 protein as a potential plasma biomarker for the identification of clear cell and mucinous EOC..... 62

Liste des abréviations et des sigles

%: pourcentage

°C: degree celcius

µg : mirogramme

µl : microlitre

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog

BSA : bovine serum albumine

cDNA : complementary desoxyribonucleic acid

CEO : cancer épithéliale des ovaires

CNNB1: the gene that encodes β-catenin

DNA : desoxyribonucleic acid

EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid

EOC : epithelial ovarian cancer

ER : estrogen receptor protein

ER α : estrogen receptor alpha protein

ER β : estrogen receptor beta protein

ESR1: estrogen receptor 1 gene

ESR2: estrogen receptor 2 gene

FBS: fetal bovine serum

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

G1: grade 1

G3: grade 3

h: heure

HA : hyaluronic acid / acide hyaluronique

HLA-G: human leukocyte antigen-G

HNF-1 β : hepatocyte nuclear factor-1 beta

HYAL-1: hyaluronidase 1

HYAL-2: hyaluronidase 2

HYAL-3: hyaluronidase 3

HYAL4: hyaluronidase 4

HYALP1: hyaluronidase 1 pseudo gene

KRAS : Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog

M: molaire

mA: milliampère

min : minute

ml: millilitre

mM : millimolaire

mRNA : messenger ribonucleic acid

NaCl : chlorure de sodium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

nm : nanomètre

nmol: nanomole

NOSE: normal ovarian surface epithelium

PR : progesterone receptor protein

PGR : progesterone receptor gene

Q-PCR : quantitative – polymerase chain reaction

R2 : Pearson correlation coefficient

RNA : ribonucleic acid

Rsf-1: chromatin-remodeling gene

RT-PCR : reverse transcriptase - polymerase chain reaction

Sec : seconde

SEO: surface de l'épithélium

SPAM1 : sperm adhesion molecule 1

TP53 : Tumor Protein 53

WT1: Wilms' tumor 1

Hommages

A mon père, Jean-Luc, et ma mère, Eugénie pour leur amour, leur affection, leur soutien tant moral que spirituel, pour l'éducation et les valeurs plus que solides qu'ils m'ont inculquées qui ont fait de moi la femme que je suis.

A ma sœur, Sabine, et mon frère, Jean-Yves dont la conviction, la persévérance et la force de caractère m'inspirent tous les jours et m'encouragent à toujours être d'avantage meilleure.

A l'homme que j'aime, mon époux Kévin Folly-Kossi que Dieu a placé dans ma vie pour me rendre complète et épanouie et dont la force d'esprit me conduit à toujours repousser mes limites.

Enfin au Dieu tout puissant sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci Seigneur pour la vie, la santé, l'intelligence et les personnes que tu mets autour de moi et afin de m'aider à atteindre le but.

Remerciements

Tout d'abord j'aimerais remercier très chaleureusement Dr Euridice Carmona pour l'opportunité qu'elle m'a donné de travailler à ses côtés. Cela a été une expérience non seulement enrichissante sur le plan académique mais aussi très plaisante sur le plan humain. Ces deux années passées en laboratoire ont grandement contribué à augmenter le désir de poursuivre d'avantage dans un programme de doctorat en biochimie. Je remercie énormément Dr Carmona pour l'encadrement sans précédent qu'elle m'a offert, pour la patience, l'indulgence et la flexibilité dont elle a fait preuve à mon égard. Ça été un véritable honneur de passer toutes ces journées à travailler avec elle et à partager ses connaissances.

J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire. Adriana Orimoto pour le temps qu'elle m'a accordé dans le but de développer en un temps record mon agilité. Merci à Lydia Edjékouane et Farah Zmiri pour leur aide mais surtout leur compagnie irremplaçable. Un grand merci à Marie-ève Koué qui plus qu'une collègue de laboratoire est une amie incontournable, pour m'avoir conseillé et partagé son expérience tout au long de mon cursus.

J'aimerais particulièrement remercier Liliane Meunier, membre du laboratoire de recherche du Dr Anne-Marie Mes-Masson pour sa collaboration active en nous fournissant la plupart des échantillons de tissus de tumeurs cancéreuses et de plasmas, sans lesquels ces travaux n'auraient pas pu avoir autant de poids et de fiabilité.

Je ne saurais conclure cette section sans remercier vivement mon codirecteur de recherche, Dr Manjunath Puttaswamy et mon parrain, Dr El Bachir Affar pour leur encadrement, leurs encouragements et leur soutien tout au long de ce parcours laborieux.

1. Introduction

1.1. Le cancer des ovaires

1.1.1.Introduction générale

Le cancer épithélial des ovaires (CEO) est la première cause de mortalité en gynécologie oncologique au Canada et la quatrième cause de décès dans la plupart des pays occidentaux (Jemal et al. 2008). Du au fait que ce cancer se développe généralement sans symptôme spécifique et qu'il n'existe pas encore de test de dépistage fiable et effectif, malheureusement environ 70% des femmes sont diagnostiquées à un stade tardif, et seulement 30% d'entre elles peuvent espérer vivre 5 ans. Malgré le fait que moins de 20% des cancers ovariens se limitent au niveau des ovaires lors du diagnostique, le taux de survie de 5 ans peut excéder les 90% lorsque les tumeurs sont localisées. Il faut cependant noter que le taux de survie n'a bénéficié que de faibles améliorations ces dernières 40 années (Jemal *et al.* 2008). Bien que la majorité des patientes répondent positivement à la chimiothérapie au départ, le taux de récurrence est quand même très élevé et résulte en un pronostique médiocre (Liu 2005). Il est donc impératif de mieux comprendre la pathogénèse moléculaire de la maladie afin d'identifier de nouvelles cibles et biomarqueurs dans le but de faciliter un dépistage à un stage plus précoce. Approximativement 90% des tumeurs primaires ovariennes malignes sont de nature épithéliale, appelées également carcinomes. La majorité des recherches suggèrent que les tumeurs se formeraient à la surface de l'épithélium de l'ovaire (SEO) ou à la surface de l'épithélium des kystes (Feeley *et*

al. 2001; Bell *et al.* 2005). Une autre école de pensée a posé l'hypothèse que ces tumeurs se développeraient à partir des canaux de Müller (Dubeau *et al.* 1999). La classification des tumeurs de l'épithélium de l'ovaire actuellement utilisée par les pathologistes est entièrement basée sur la morphologie des cellules tumorales. Il existe quatre sous types majeurs organisés en différents sous types histopathologiques. Ces différents sous types sont définis selon leurs caractéristiques moléculaires distinctes et leur réponse différente au traitement (Cho & Shih 2009 review). Le CEO se divise donc comme suit, le type séreux, endométrioïde, à cellules claires et mucineux. Chacun d'eux correspond aux différents types d'épithélium présents dans l'appareil reproductif féminin (Seidman *et al.* 2004 review). Des exemples de ces différents type de carcinomes ovariens sont représentés à la figure I.

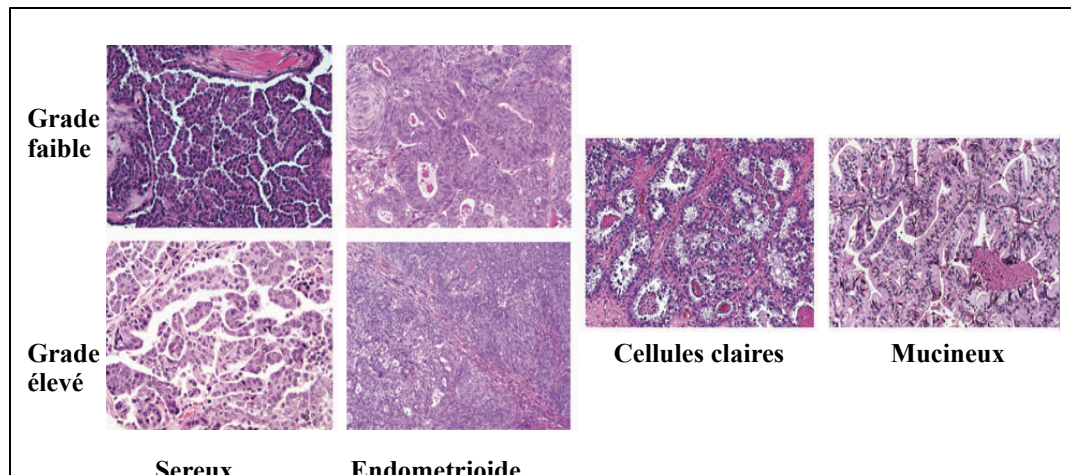


Figure I. Représentation des différents types histologiques majeurs du cancer des ovaires. [Extraie de Cho & Shih 2009]

Les différentes réponses à la chimiothérapie et les conséquences sur les patientes résultent probablement de l'hétérogénéité moléculaire de ces CEOs qui sont morphologiquement distincts (Cho & Shih 2009). De plus, les tumeurs groupées par types cellulaires peuvent être subdivisées en tumeurs identifiées comme étant exclusivement bénignes (cystadénomes), spécifiquement malignes (carcinomes), de celles qui sont des intermédiaires entre les deux formes (généralement connues comme étant des tumeurs prolifératives atypiques, ou comme des tumeurs ayant un potentiel faible de malignité, ou encore comme des tumeurs à la limite de la malignité). En plus d'être classifiés selon le type cellulaire, les carcinomes ovariens s'organisent également sous catégories selon le degré de différenciation, que l'on désigne par le terme grade de la tumeur. Autrefois, les systèmes de classement par grade les plus communément utilisés étaient ceux proposés par la Fédération Internationale de Gynécologie et d'obstétrique (FIGO), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le groupe d'oncologie gynécologique (GOG) (Silverberg *et al* 2000). Le système FIGO utilise trois types de grades basés sur des critères architecturaux tels que la proportion des structures glandulaires et papillaires relatives aux régions de la croissance de la tumeur solide. Les grades 1, 2 et 3 correspondent respectivement à moins de 5%, entre 5 et 50% et à plus de 50% de croissance solide. Il est bien établi que les tumeurs se développent et progressent à cause de

changements génétiques ou génomiques qui s'accumulent, tels que les mutations et les amplifications de gènes, les délétions et les translocations. A travers le temps, l'analyse de ces différentes altérations a permis d'identifier de nouveaux gènes associés au cancer incluant des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur et des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. Certaines technologies avancées telles que le "digital karyotyping" et le "array-based" ont permis de localiser de façon précise les régions du chromosome amplifiées ou supprimées. De telles études ont montré que les différents types histologiques du carcinome ovarien se distinguent principalement selon leur profil d'expression génétique (Schwartz *et al.* 2002; Schaner *et al.* 2003; Marquez *et al.* 2005; Wu *et al.* 2007), en d'autres termes selon les types d'altérations génétiques ou structurelles. Pour chacun des types du CEO, trois niveaux d'analyse sont réalisées afin de mieux comprendre les causes et la progression des cancers chez l'homme. Il s'agit d'analyser la nature des mutations, les variations du nombre de copie de l'ADN pour identifier des délétions et des amplifications de l'ADN visant à altérer l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes respectivement. Pour se faire le génome est fractionné en segments, le nombre de copies altéré est quantifié et les régions exactes des variations du nombre de copie dans le génome sont localisées. Enfin la troisième étape est d'analyser le profil d'expression génique.

1.1.2. Le cancer des ovaires de type séreux

Les carcinomes de type séreux représentent la majorité des cancers des ovaires. Par conséquence, c'est le type du cancer ovarien le plus étudié. Jusqu'à ce jour quelques mutations sporadiques ont été identifiées. Par exemple, une série de mutations localisées au niveau des gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes tel que PTEN et PIK3CA ont été reportées comme étant spécifiques au type séreux. Également, l'oncogène TP53 est muté dans plus de la moitié des types séreux de grade élevé (Singer *et al.* 2005; Willner *et al.* 2007). Dans leurs études sur le type séreux de stage I (stage initial), Leitao et ses collègues ont montré que p53 était surexprimé et que TP53 était muté dans la plupart des cas. Ce qui suggère que la mutation de TP53 est un événement précoce. La présence de mutations dans les oncogènes KRAS ou BRAF a été détectée dans plus de la moitié des grades mineurs et des études de génétiques moléculaires ont montré que ces mutations étaient exclusivement mutuelles et associées à des événements prématurés dans le type séreux de grade faible. Par ailleurs, une série d'analyse de variation du nombre de copies de l'ADN a révélé que le grade élevé du type séreux se caractérise par des niveaux plus élevés de gains et/ou de pertes comparativement au grade faible. Les conséquences fonctionnelles de l'amplification de gènes dans le type séreux sont très peu connues. Par exemple, il est bien connu que la surexpression de Rsf-1, gène impliqué dans le remodelage de la chromatine et localisé sur le chromosome 11q13.5,

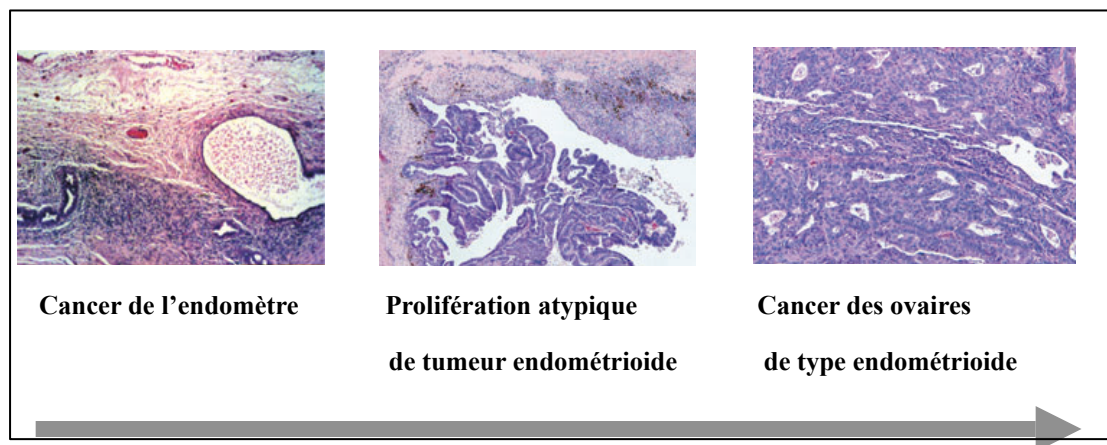
stimule la prolifération cellulaire. Cependant lorsque ce gène est silencieux, cela a pour conséquence d'inhiber la croissance cellulaire (Shih *et al.* 2005). Les patientes ayant la mutation sur le 11q13.5 ont un taux de survie significativement réduit par rapport à celui de celles qui ne l'ont pas. En outre, une série d'études a également été réalisée pour analyser le profil d'expression des gènes dans le CEO du type séreux, en utilisant des techniques telles que le SAGE (serial analysis of gene expression) ou le microarray. Un dénouement majeur de ces études a été de révéler qu'il est possible de distinguer le type séreux des autres types de cancer ovarien conformément à leur profil d'expression génique. En effet, ces études ont permis d'identifier des gènes qui sont impliqués dans d'importants processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'invasion tumorale et le contrôle de l'immunité locale (Bonome *et al.* 2005; Landen *et al.* 2008). Ainsi, il a été démontré que WT1 connu pour jouer un rôle important dans le développement de l'appareil génital, s'exprime spécifiquement dans le type séreux indépendamment du grade, ce qui n'est pas le cas dans les autres types du cancer des ovaires. Par ailleurs, il est bien établi que la nature agressive du grade élevé du type séreux est partiellement associée à la capacité du cancer à contourner de façon efficace le système immunitaire. L'un des mécanismes par lequel le cancer ovarien dévie le système immunitaire est de réguler la surexpression de l'antigène d'histocompatibilité de classe G (HLA-G), acteur incontournable dans les processus d'immunité, c'est ainsi que le HLA-G est fréquemment surexprimé dans les carcinomes séreux de grade élevé mais rarement

dans ceux de grade faible. Par contre, très peu de gènes sont connus pour s'exprimer préférentiellement dans le cancer séreux de grade faible.

1.1.3. Le cancer des ovaires du type endométrioïde

L'association entre le cancer ovarien endométrioïde et celui de l'endomètre ou de l'utérus a déjà été bien reconnue et accepté il y a bien longtemps (DePriest *et al.* 1992; Fukunaga *et al.* 1997; Yoshikawa *et al.* 2000; Erzen *et al.* 2001). Dans plus du tiers des cas, cette association est reliée à l'identification d'altérations génétiques associées à des lésions dans l'endomètre ainsi qu'à l'observation de transfert de caractères morphologiques entre le carcinome de l'endomètre et celui de l'ovaire de type endométrioïde. C'est donc pour cette raison qu'il est de plus en plus considéré que le cancer utérin est un précurseur du type endométrioïde du cancer ovarien (Feeley *et al.* 2001; Sainz de la Cuesta *et al.* 1996; Thomas *et al.* 2000). L'analyse mutationnelle du type endométrioïde a montré que celui-ci partage plusieurs variations génétiques moléculaires avec le cancer utérin. En effet, la présence de mutations dans une série de gènes suppresseurs de tumeur, d'oncogènes et de gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN a été observée dans les deux cas. De façon intéressante, il a été démontré que CNNB1, connu pour être responsable d'encoder la β -caténine qui est engagée dans la voie de signalisation de Wnt dont le rôle est de réguler la prolifération, la motilité et la survie cellulaire, est muté dans 16 à 38% des cas du cancer ovarien du type endométrioïde sachant que

cette mutation est rare dans les autres types du cancer ovarien. Dans des études récentes, Wu et son équipe (Wu *et al.* 2007) ont non seulement trouvé que les mutations dans la voie de signalisation de Wnt étaient significativement associées aux mutations qui déstabilisent la voie de signalisation de PI3K/PTEN (gènes suppresseurs de tumeurs) mais ont aussi indiqué que ces mutations étaient spécifiques au type endométrioïde. De plus, les tumeurs ayant ces mutations ont tendance à être de grade faible (voir figure II).



Accumulation des mutations de PTEN, CTNNB1, PIK3CA, TP53 et autres mutations

Figure II. Progression histologique et génétique moléculaire du cancer ovarien de type endométrioïde. [Extraie de Cho & Shih 2009]

En outre, étant donné que le type endométrioïde est plus rare, très peu d'études ont été effectuées sur l'analyse du nombre de copies de l'ADN. Cependant Tapper et ses collègues (Tapper *et al.* 1997) ont observé des gains sur le chromosome 1q mais les gènes ciblés n'ont malheureusement pas été identifiés. Finalement, concernant l'analyse du profil d'expression génique, moins de travaux ont également été réalisés. Toutefois un rapport récent a indiqué qu'il y avait une simultanéité de l'expression génique entre les types endométrioïde et séreux qui seraient due à l'incapacité des pathologistes à distinguer précisément des critères morphologiques spécifiques au type endométrioïde comparativement à son homologue séreux (Wu *et al.* 2007). Dans un contexte où le profil de mutation des gènes TP53, CTNNB1, PTEN, PIK3CA et KRAS est pris en compte, les tumeurs endométrioïdes ayant un patron d'expression génique similaire aux tumeurs de type séreux, ont tendance à être de grade élevé et à masquer la mutation de TP53. Inversement, lorsque le profil d'expression génique des deux types est distinct, les tumeurs endométrioïdes ont tendance à être de grade faible et à masquer les mutations de CTNNB1, PTEN et/ou PIK3CA.

1.1.4. Le cancer des ovaires à cellules claires et de type mucineux

Due à la rareté des cancers ovariens à cellules claires et de type mucineux, très peu d'études ont été réalisées sur les variations moléculaires. Toutefois, quelques

analyses ont indiqué qu'il existe une association plus significative entre le cancer de l'endomètre et celui des ovaires à cellules claires, qu'entre le cancer de l'endomètre et le CEO de le type endométrioïde (Fukunaga *et al.* 1997; Yoshikawa *et al.* 2000; Erzen *et al.* 2001). Les analyses mutationnelles ont révélé que les mutations de BRAF et TP53 dans certains cas du CEO à cellules claires sont de 8.3% et 6.3% respectivement bien que la fréquence soit assez faible (Schwartz *et al.* 2002; Mayr *et al.* 2006). Pour sa part, le type mucineux présente dans environ 50% des cas des mutations dans KRAS (Enomoto *et al.* 1991; Mok *et al.* 1993; Ichikawa *et al.* 1994; Gemignani *et al.* 2003). Par ailleurs, dans le cas de l'analyse des variations du nombre de copies de l'ADN du CEO à cellules claires, Dent et son équipe (Dent *et al.* 2003) ont trouvé que les délétions sur le chromosome 9p21 étaient les altérations les plus fréquentes suivies par des pertes sur le 1p, 11q et 10q (incluant le locus de PTEN 10q23.3). Toutefois, il faut noter qu'aussi bien des gains que des pertes ont été enregistrés sur le chromosome 19p. Cette discordance s'expliquerait par la nature hétérogène du CEO à cellules claires. Aucune analyse du nombre de copies d'ADN n'a été rapportée concernant le type mucineux. Finalement, une série d'études a été réalisées sur le profil d'expression du cancer des ovaires à cellules claires et a permis d'identifier bon nombre de gènes qui s'expriment préférentiellement dans le type à cellules claires mais dans certains cas aussi, dans le type endométrioïde. Toutefois HNF-1 β , connue comme étant une protéine qui participe à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme du glucose, semble

être un marqueur spécifique du type à cellules claires (Tsuchiya *et al.* 2003). D'autre part, le patron d'expression génique du type mucineux se distingue largement des autres sous-types du cancer des ovaires (Schwartz *et al.* 2002; Dent *et al.* 2003). Heinzelmann-Schwarz et son équipe ont identifié un profil d'expression spécifique au type mucineux réalisé à partir des gènes MUC2, MUC3 et MUC17 caractéristiques de tissus provenant de la souris (Heinzelmann-Schwarz *et al.* 2006).

1.2. Les hyaluronidases

1.2.1. Classification

L'acide hyaluronique (HA) est un composé de haute concentration de la matrice extracellulaire chez les mammifères. Les enzymes impliquées dans le catabolisme du HA sont les hyaluronidases et sont largement distribuées dans l'organisme. Elles possèdent des spécificités variées selon leurs substrats et un large éventail de pH optimal (Kreil *et al* 1995; Frost *et al.* 1996; Csòka *et al.* 1997). L'activité des hyaluronidases a été initialement identifiée dans des extraits provenant de testicules de mammifères. Le terme hyaluronidase a été introduit par Karl Meyer en 1940 pour désigner les enzymes qui dégradent le HA. Ce dernier a organisé les différents types de hyaluronidases en trois classes distinctes en se basant sur des analyses biochimiques réalisées sur ces enzymes et les produits de leur réaction. Encore aujourd'hui la classification de Meyer reste exacte et se définit comme suit. Le groupe 1 comprend les hyaluronidases de types mammifères qui sont des endo-beta-N-acetylhexoaminidases dont les principaux produits finaux sont des tétrasaccharides et des hexasaccharides. Ces deux produits sont hydrolytiques, possèdent une activité transglycosidase et peuvent aussi bien dégrader le HA, le sulfate de chondroïtine (CS), spécifiquement le C4-S et le C6-S, que le sulfate de dermatane (DS). Le groupe 2 désigne les hyaluronidases de type bactérien qui dégradent également le HA et toutes ses variantes, CS et DS. Ces endo-beta-N-acetylhexoaminidases réduisent le HA plutôt en dissaccharide. Enfin le troisième

groupe fait référence aux hyaluronidases provenant des sangsues, autres types de parasites, et des crustacés qui sont des endo-beta-glucuronidases générant des tétrasaccharides et des hexasaccharides comme produits finaux. Dans les tissus des vertébrés, la dégradation du HA survient lors d'une action synchronisée de trois enzymes : une hyaluronidase et deux exoglycosidases qui enlèvent les sucres de façon séquentielle des extrémités non-réductrices, un beta-glucuronidase et un beta-N-acetyl glucosaminidase. Le clivage endolytique par la hyaluronidase génère un nombre croissant des extrémités non-réductrices pour les exoglycosidases (Roden *et al.* 1989). La contribution relative des réactions de clivage endo- et exo- varie d'un tissu à un autre, et leur contribution individuelle sur la dégradation du HA n'ont pas été documenté en général.

1.2.2.Organisation génomique des hyaluronidases de mammifère

Le génome humaine contient six paralogues de hyaluronidases partageant environ 40% de similarité (Csòka *et al* 2001). Les hyaluronidases humaines sont organisées en groupe de trois étroitement liés sur le chromosome 3p21.3, soit *HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3*, et sur le chromosome 7q31.3, soit *HYAL4*, *PH20/SPAM1* et *HYALP1*. (Figures III et IV). La hyaluronidase originaire du venin d'abeille contient environ 30% d'acides aminés (sur 363 acides aminés) identiques à ceux des enzymes PH-20 et HYAL-1. Chacune des trois séquences possèdent à la fois un peptide signal

à l'extrémité N-terminal et un site de clivage à l'extrémité C-terminale. Il s'agit du domaine EGF-like pour HYAL-1 et -2, du domaine ZPB qui est le domaine de liaison à la zone pellucide pour la PH-20 et HYAL-5 ou d'un domaine pas encore clairement identifié. HYAL-2, PH-20 et HYAL-5 ont un domaine d'ancrage GPI (glycosylphosphatidil-inositol) à l'extrémité C-terminal requis pour lier l'enzyme à la surface externe de la membrane plasmique.

La hyaluronidase extraite du venin d'abeille est dépourvue du domaine EGF-like de et du domaine de liaison à la zone pellucide (Chao *et al.* 2007). Parallèlement les gènes homologues des hyaluronidases identifiés chez la souris sont localisés sur le chromosome 9F1-F2 (Csòka *et al.* 1998). Le degré d'homologie entre les gènes orthologues de l'humain et de la souris est plus élevé que celui entre les six gènes humains. Tous les gènes hyaluronidases ont un profil d'expression unique et spécifique aux tissus dans lequel ils sont localisés. La présence d'un pseudogène, HYAP1, et la nature des mutations de ce dernier suggèrent que cette famille multi-génique n'a pas fini d'évoluer dans le temps. La figure V représente la structure génomique des six hyaluronidases humaines. Les gènes localisés sur le chromosome 3 ont tous une structure génomique similaire en termes d'arrangement d'introns et d'exon. De plus, les gènes localisés sur le chromosome 7 sont considérablement plus grand que ceux situés sur le chromosome 3 à cause du pourcentage élevé de leurs séquences non-codantes.

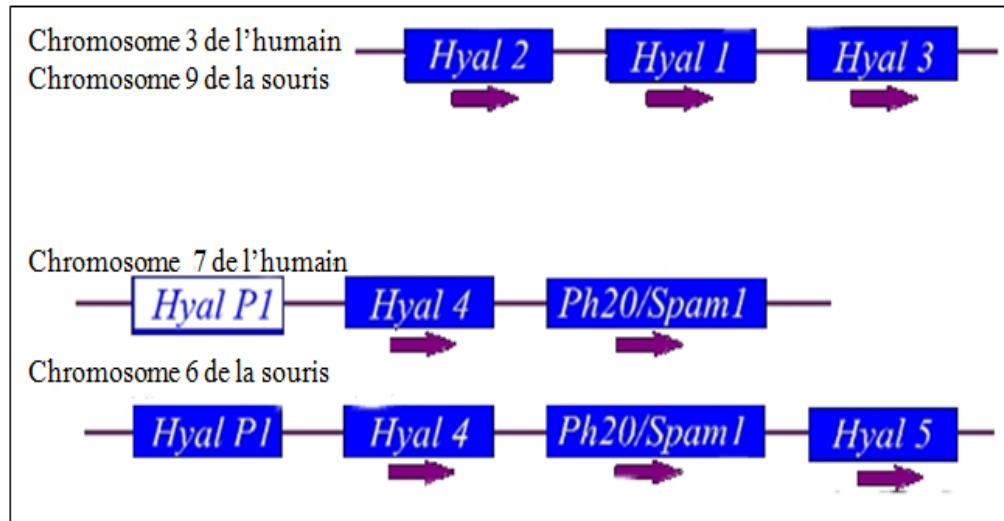


Figure III. Arrangement chromosomique des différents gènes des hyaluronidases chez l'humain et la souris.

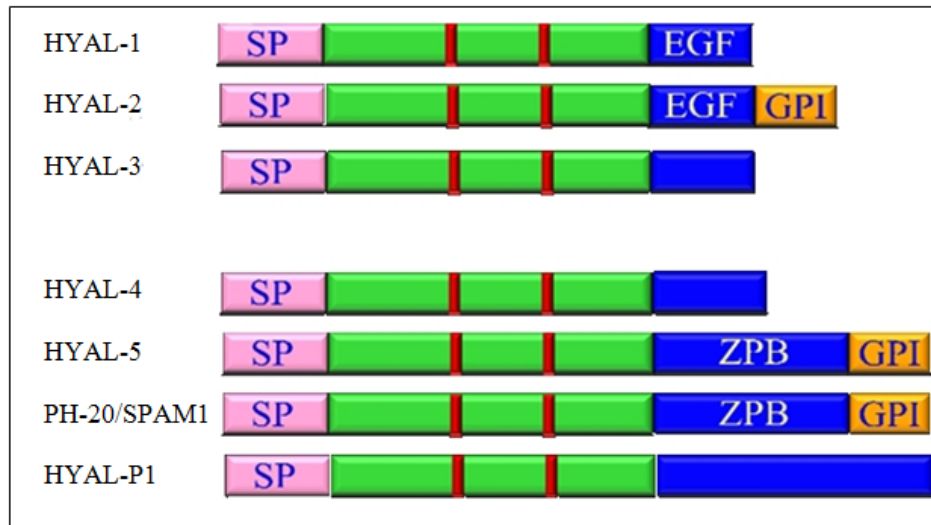


Figure IV. Représentation des différents domaines protéiques des hyaluronidases.

Les lignes verticales rouges représentent les résidus catalytiques (Glu145 et Asp147, chez HYAL-1 de la souris) et les résidus importants pour la position du substrat (Tyr218, Tyr263 et Trp339). SP= peptide signal, EGF= similaire à l'épidermal growth factor, GPI= glycosylphosphatidil-inositol, ZPB= zona pellucida binding.

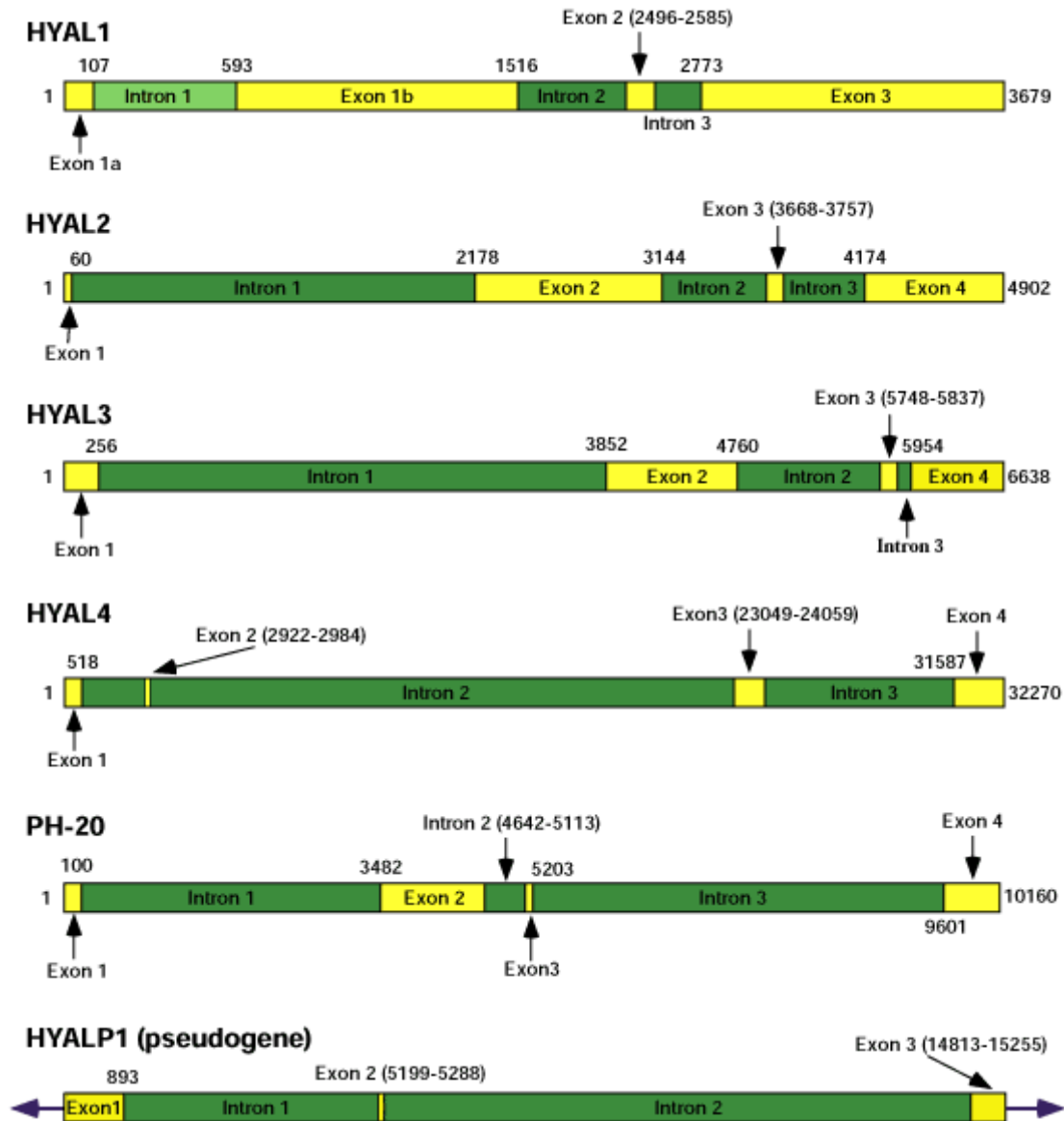


Figure V. Structure génomique des gènes hyaluronidases. Les exons sont indiqués avec les rectangles jaunes et les introns avec les rectangles vert foncés. [Extraie de www.glycoforum.gr.jp]

1.2.3. Caractérisation des hyaluronidases des mammifères

La première hyaluronidase somatique de mammifère isolée à partir de plasma humain était la hyaluronidase 1 (HYAL-1) (Csòka *et al.* 1999; Afify *et al.* 1993). Elle a été clonée, séquencée et exprimée par Frost et son équipe en 1997. Cette glycoprotéine active à pH acide de 57 kDa est composée d'une unique chaîne de polypeptides de 49 kDa et subit une glycolysation post traductionnelle de 8kDa. HYAL-1 est similaire à environ 40% à la hyaluronidase spécifique au spermatozoïde PH-20. Le gène orthologue de la souris qui a été cloné et exprimé (Csòka *et al.* 1998), a révélé jusqu'à 73% de similarité avec l'enzyme humaine (Stern *et al.* 2004; csòka *et al.* 1994). Les plus fortes concentrations de HYAL-1 se retrouvent dans le foie, le rein, la rate et le cœur. Il a également été documenté que l'urine humaine contenait un niveau élevé de l'isoforme de HYAL-1 de plus haut poids moléculaire (Csòka *et al.* 1997). Une deuxième protéine a été révélée à 45kDa dans l'urine. Il semble qu'environ 100 acides aminés aient été enlevés de la protéine principale de 49kDa via deux réactions endoprotéolytiques (figure VI), ce qui résulterait en deux chaînes de polypeptides reliées par un pont disulfure (Csòka *et al.* 1997). La signification exacte de la deuxième protéine active n'est pas tout à fait claire, il se pourrait que ce soit une forme de l'enzyme localisée dans les lysosomes.

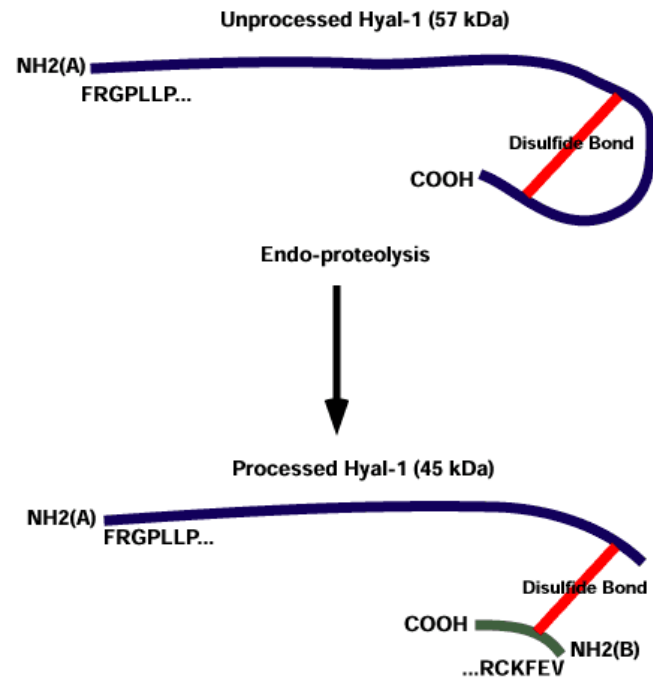


Figure VI. Représentation de la présumée réaction endoprotéolytique de HYAL-1.

HYAL-1 non clivée est montré au-dessus de la figure.

Après la réaction endoprotéolytique, deux fragments sont générés ce qui aboutit à la production de deux extrémités N-terminale. Le fragment de 22 aminoacides est supposé être lié au reste de la protéine par un pont disulfure. [Extrait de www.glycoforum.gr.jp]

HYAL-2 est une autre hyaluronidase humaine amplement exprimée et encodée par un gène adjacent à celui de HYAL-1 sur le chromosome (Lepperdinger *et al.* 1998). Elle est considérée comme étant la plus importante des hyaluronidases car sa délétion est létale chez la souris (Lepperdinger *et al.* 2001). Ce qui n'est pas le cas lors de la délétion HYAL-1 (Martin *et al.* 2008). HYAL-2 est aussi active à pH acide et est ancrée dans la membrane plasmique via son site d'ancrage GPI (Lepperdinger *et al.* 2001). Elle est capable de cliver aussi bien des polymères de HA de poids moléculaire élevé, que de taille intermédiaire d'environ 20 kDa. Il est bien connu que, HYAL-1 et HYAL-2 agissent ensemble pour dégrader le HA. En effet, les produits de la digestion de HYAL-1 sont d'avantage dégradés en oligosaccharides de très faibles poids moléculaires par l'action de HYAL-2 (Wang F *et al.* 2008). Inversement, Il a été démontré que HYAL-3 ne participait pas à l'activité enzymatique impliquée dans la dégradation de l'acide hyaluronique (Hemming *et al.* 2008) et que son rôle physiologique n'était toujours pas entièrement déterminé. Très peu d'informations sont répertoriées concernant la troisième enzyme encodée au locus 3p21.3, HYAL-3. Des profils d'expression fortement similaires ont été montrés dans les testicules de mammifères et dans la moelle osseuse. Ces deux tissus conservent des cellules souches précurseurs de la vie du mammifère, suggérant ainsi que HYAL-3 serait une des premières hyaluronidases à être exprimées durant le développement du fœtus (Csòka *et al.* 1997). PH-20, la hyaluronidase associée au spermatozoïde et HYAL-3 sont abondamment exprimés dans les testicules, mais aucune donnée à ce jour

n'indique que HYAL-3 participe au processus de fertilisation. Il est également connu que l'expression de HYAL-2 et -3 est régulée positivement par les cytokines inflammatoires telles que IL-1 et TNF, ce qui n'est pas le cas pour HYAL-1 (Flannery *et al.* 1998). Parmi les hyaluronidases des mammifères, PH-20 est la plus étudiée et la mieux caractérisée. Celle-ci est localisée sur le chromosome 7q31 chez l'humain et 6A2 chez la souris, elle est la protéine la plus conservée de la membrane des spermatozoïdes (Lathrop *et al.* 1990). Aussi connue sous le nom de SPAM-1, elle possède un site d'ancrage GPI qui lui permet de se fixer à la membrane interne de l'acrosome et au domaine de liaison de la zone pellucide pour faciliter la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule (Cherr *et al.* 2001; Zheng *et al.* 2001). PH-20 est unique car elle est aussi bien active à pH acide que neutre et fait donc intervenir des domaines actifs différents (Cherr *et al.* 2001; Gmachi *et al.* 1993; Oetti *et al.* 2003). Comme la *PH20*, la *HYAL4* et la *HYALP1* sont fortement exprimés dans les testicules chez l'humain. Par contre *HYALP1* est un pseudogène et *HYAL-4* ne présente pas d'activité hyaluronidase. Pour ce projet, il est important de mentionner que les hyaluronidases de type mammifère situées sur le chromosome 3 humains seront plus amplement étudiées.

1.2.4. Le rôle des hyaluronidases dans différents types de cancer

Dans le cancer des ovaires, la présence d'un déséquilibre allélique au niveau de ces trois gènes (*HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3*) a été démontrée dans des

tumeurs et des tissus somatiques (Tuhkanen *et al.* 2004). Aussi, d'autres études ont suggéré que l'activité de HYAL-1 et l'expression de son ARNm étaient significativement réduites dans le CEO du type séreux comparativement aux mesures obtenues dans des ovaires normaux (Hiltunen *et al.* 2002; Nykopp *et al.* 2009). En accord avec ces observations, l'accumulation extracellulaire de l'acide hyaluronique souvent observée dans les tumeurs du stroma et de la matrice péricellulaire de l'ovaire est associée à un mauvais pronostic (Anttila *et al.* 2000; Hiltunen *et al.* 2002). De plus, il a été rapporté à plusieurs reprises que le hyaluronan interagissait avec des récepteurs membranaires tels que CD44, ce qui conduit à l'association entre le CD44 et les protéines du cytosquelette (ex : ankyrin, RhoGTPases, Cdc42) induisant ainsi une signalisation spécifique qui augmente le taux d'adhésion, de migration et de survie des cellules cancéreuses ovariennes (Bourguignon 2008 review). En outre, il a été prouvé que les niveaux d'acide hyaluronique et de HYAL-1 étaient augmentés dans les cancers de la vessie, la prostate, la tête et le cou, ce qui aurait pour effet de promouvoir la progression des tumeurs et le phénomène de métastase (Franzmann *et al.* 2003; Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008 review). De façon intéressante, des niveaux élevés de hyaluronan extracellulaire sont principalement détectés dans les tumeurs du stroma contrairement aux niveaux élevés de HYAL-1 qui sont retrouvés dans les tissus de la tumeur, suggérant une interférence entre

ces deux types de tissus. Des haut niveaux d'expression de HYAL-1 ont aussi été identifiés dans le cancer du sein et des glioblastomes, ce qui a été associé aux tumeurs métastatiques (Delpech *et al.* 2002; Lokeshwar & Selzer 2008). Par ailleurs, il a été montré que les lignées cellulaires du cancer du sein qui n'expriment pas les récepteurs d'œstrogène (ER) tendent à être plus agressives, indiquaient une activité de hyaluronidases amplifiée contrairement aux lignées positives pour le ER (Wang *et al.* 2009). Dans la même idée, HYAL-1 induit la progression du cycle cellulaire en amplifiant les niveaux des régulateurs positifs de la transition G2-M (ex : cdc25c, cyclin B1, cdk10) par un mécanisme encore mal connu dans les lignées cellulaires du cancer de la vessie, de la prostate et des cellules squameuses de la cavité orale (Lin & Stern 2001, Lokeshwar *et al.* 2005a,b). HYAL-1 intensifie aussi l'angiogénèse, probablement en générant des fragments de hyaluronan de tailles distinctes qui possèdent l'habilité de stimuler la prolifération des cellules endothéliales et la formation des capillaires (Takahashi *et al.* 2005). Par conséquence, les niveaux d'expression des hyaluronidases ont tendance à varier en fonction du type de tumeur et de son niveau d'agressivité.

1.3. Les récepteurs d'estrogènes et de progestérone

1.3.1.Introduction générale

Chez l'homme, les récepteurs d'estrogènes et de progestérones font partie des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et possèdent plusieurs domaines fonctionnels. Il existe deux types de récepteurs d'estrogène, chacun de ces types disposent de plusieurs isoformes et variantes d'épissage (Ravdin *et al.* 1997). Le gène du récepteur d'estrogène (α) est localisé sur le bras long du chromosome 6 (6q24–q27), alors que celui du récepteur d'estrogène (β) est situé dans la région q22–24 du chromosome 14 (Gosden *et al.* 1986; Enmark *et al.* 1977). Les deux isoformes partagent une faible similarité de séquence de 47% (Muramatsu *et al.* 2000). La séquence d'ER β est plus courte qu'ER α de 45 résidus acides aminés (Gustafsson review 1999). Bien que ces deux récepteurs aient l'estrogène comme ligand, ils s'expriment en concentrations différentes dans l'organisme et présentent des différences structurelles et donc interviennent dans des processus complexes divers (Green *et al.* 1986). Les récepteurs ER α et ER β sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, notamment la fonction de reproduction bien chez l'homme que chez la femme. Les récepteurs de progestérones possèdent également deux isoformes, PRA (PR α) et PRB (PR β). L'expression du récepteur de progestérone est régulée par deux sites d'initiation de transcription qui contrôlent la synthèse de deux isoformes. Le gène PR α est tronqué par 164 résidus d'acides aminés dans la région N-terminale et par conséquent est plus court que le PR β (Cisneros *et al.* 1999). Les gènes PR α et PR β s'expriment dans plusieurs cellules similaires et semblent être synthétisés à quantité égale. Un certain nombre d'études ont révélé des différences

fonctionnelles entre les deux isoformes dans l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (Magrath et al 1993). Ainsi dans le cancer du sein, PR α est hautement exprimée dans certaines tumeurs et il semblerait qu'il agisse comme inhibiteur de PR β . Ces récepteurs ont tous un mode d'action similaire qui implique les régions fonctionnelles (A-F) suivantes : le domaine N-terminal qui n'est pas très bien conservé à travers les différents récepteurs nucléaires (exemple : seulement 17% de similarité entre les deux isoformes de ER) et qui possède la fonction autonome de transactivation AF-1. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de dimérisation, le signal de localisation nucléaire (NLS) et le domaine de liaison du ligand (LBD).

1.3.2. Les récepteurs d'estrogène et de progestérone dans différents cancers

De façon significative, le CEO est plus prévalent et plus sévère chez les femmes ménopausées. Durant la ménopause, les changements hormonaux produisent d'importantes modifications dans la progression des tumeurs ovariennes. Ces changements incluent des concentrations élevées de lutéine (LH) et de l'hormone FSH (follicular-stimulating hormone), et de faibles concentrations d'estrogène et de progestérone. Bien que les causes du cancer des ovaires ne soient pas claires, certaines facteurs sont reconnus et catégorisés tels que des facteurs à risques. Ainsi, la ménopause et l'infertilité contribuent à augmenter le risque d'être atteinte par le

cancer des ovaires. Par contre des antécédents de grossesse, une ligature des trompes et une hystérectomie réduisent considérablement le risque. Par ailleurs, les contraceptifs oraux réduiraient la probabilité d'avoir le cancer des ovaires (Schildkraut *et al.* 2002; Greer *et al.* 2005). En contradiction, des études épidémiologiques ont montré que la thérapie de remplacement d'hormone est un facteur à risque significatif (Lacey *et al.* 2002 ; Morch *et al.* 2009). De façon cohérente, le profil d'expression des récepteurs d'hormones stéroïdiennes est associé au taux de survie des patientes (Parrott *et al.* 2001; Chan *et al.* 2008). Une corrélation positive a été établie entre la présence des récepteurs de FSH et de LH et la progression de tumeur et un mauvais pronostic. Dans le même sens, de faibles concentrations des récepteurs d'estrogène (ER) et de progestérone (PR) sont associées à faible taux de survie et à mauvais pronostic (Masood *et al.* 1989; Burges *et al.* 2010). L'absence de ER dans le cancer du sein a été joué un rôle dans la progression des tumeurs, la récurrence de la maladie et les métastases. Malgré les avancées majeures en chirurgie et thérapies adjuvantes, le cancer du sein qui n'exprime pas d'ER reste très difficile à traiter (Chen *et al.* 2008; Yamashita *et al.* 2008). De façon, les lignées cellulaires du cancer du sein qui n'expriment pas de ER produit un niveau d'activité de hyaluronidase plus élevé comparativement à celui qui exprime des ER (Wang *et al.* 2009).

1.4. Objectif du projet de recherche

Les quatre sous types majeurs histologiques du CEO (séreux, mucineux, endométrioïde et à cellules claires) présentent des caractéristiques cliniques, morphologiques, biologiques et chimiothérapeutiques distinctes (cho & Shih, 2009). Malgré leurs différences, tous les sous types sont traités avec la même chimiothérapie. Malheureusement certains des types ne répondent pas positivement à cette approche (Sugiyama *et al* 2000; Hess *et al* 2004; Pectasides *et al* 2006; Yamashita 2008). Il est donc évident que des études approfondies sont nécessaires pour mieux caractériser les différents sous types d'un point de vue histologique et génétique dans le but d'améliorer les résultats thérapeutiques et la spécificité des traitements à chaque sous type, ainsi que d'identifier des marqueurs pour le diagnostic et le criblage. L'objet de cette étude était de mieux définir au niveau moléculaire les différences qui existent entre les sous types du CEO concernant le profil d'expression de l'enzyme qui dégrade la matrice extracellulaire, HYAL-1. Nous avons réalisé une analyse détaillée de l'expression de cette enzyme dans des échantillons de tissus extraits de patients diagnostiqués avec le CEO des quatre sous types. Nous avons aussi analysé l'expression de HYAL-1 dans les lignées cellulaires dérivées de ces quatre sous types du CEO et vérifié les niveaux d'activité enzymatique dans le plasma des patientes malades. Le CEO est significativement prédominant et plus sévère chez les femmes post ménopausées. Les changements hormonaux occasionnés par la ménopause participent grandement aux

bouleversements se répercutant dans la régulation de la progression des tumeurs ovariennes. En particulier, des niveaux faibles des récepteurs des estrogènes et de la progestérone (ER et PR, respectivement) sont associés à un faible taux de survie et un pauvre pronostic. (Chen *et al* 2008; Ho 2003). Dans ce présent travail, les niveaux d'expression d'ER-alpha, ER-beta et de PR ont été analysés dans tous nos échantillons et reliés avec les niveaux de HYAL-1.

Manuscript en soumission:

**Clear cell and mucinous epithelial ovarian
cancers exhibit high levels of HYAL-1.
Inverse correlation with the expression of
estrogen and progesterone receptors.**

**Paule Héléna Yoffou¹, Liliane Meunier⁴, Lydia Edjekouane¹, Diane Michèle
Provencher^{3,4}, Anne-Marie Mes-Masson^{2,3,4}, Euridice Carmona^{1,2} ***

*¹Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, Quebec, Canada H1T
2M4; Depts. of ²Medicine and ³Ob/Gyn, University of Montreal, Montreal, Quebec,
Canada H3T 1J4; ⁴Centre de recherche CHUM/Institut du cancer de Montr el,
Montreal, QC, Canada H2L 4M1*

Running title: High HYAL-1 levels in clear cell/mucinous EOC

Key words: Hyaluronidase-1, ovarian cancer, clear cell, mucinous, estrogen receptor
alpha

* Corresponding Author: Euridice Carmona, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre
de Recherche, 5415 boul de l'Assomption, Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada.
Fax: 514-252-3569

Manuscript soumis au International Journal of Cancer

Liste et contributions des auteurs

Paule-Hélène Yoffou : premier auteur (centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont). Première responsable du bon déroulement du projet et des expériences telles que PCR real-time, mesures de l'activité enzymatique, clonage, cultures cellulaires, cultures bactériennes et analyses des résultats.

Liliane Meunier : participation limitée à fournir les échantillons de cDNA des tissus, de plasma et quelques lignées cellulaires cancéreuses (membre du laboratoire du Dr Anne-Marie Mes-Masson au centre de recherche CHUM/Institut du cancer de Montréal)

Lydia Edjékouane : étudiante stagiaire dans le laboratoire du Dr Carmona. Collègue en laboratoire, Lydia a fourni une aide technique. Réalisation de certaines RT-PCR

Diane Michèle Provencher : médecin en charge des prélèvements des tissus et des échantillons de plasma provenant des tumeurs ovariennes (Départements de Médecine et Ob/Gyn, université of Montréal)

Anne-Marie Mes-Masson : chercheur en collaboration au centre de recherche CHUM/Institut du cancer de Montréal

Euridice Carmona : directrice de recherche (centre de recherche de l'hôpital
Maisonneuve-Rosemont)

Abstract

Epithelial ovarian cancer (EOC) is morphologically heterogeneous being classified as serous, endometrioid, clear cell, or mucinous. Molecular genetic analysis has suggested a role for tumor suppressor genes located on chromosome 3p in the pathogenesis of serous EOC. Our objective was to evaluate the expression of *HYAL-1*, located at chromosome 3p21.3, in these EOC subtypes, and to verify a possible correlation with the expression of steroid hormone receptors. We analyzed the mRNA expression of *HYAL-1*, estrogen receptor (ER)- α , ER- β and progesterone receptor (PR) in EOC tumor samples and cell lines using quantitative RT-PCR. We also performed bioinformatics analyses on the expression of these genes using a publicly available microarray dataset. HYAL-1 enzyme activity was measured in EOC cell lines and in plasma samples from patients. We found that *HYAL-1* mRNA expression was elevated in clear cell and mucinous EOC tissue samples, but not in serous and endometrioid samples, normal ovaries or benign tumors. Significantly, similar results were obtained by two different techniques and with tissue sample cohorts from two independent institutions. Concordantly, *HYAL-1* mRNA levels and enzyme activity were elevated in EOC cell lines derived from clear cell and mucinous subtypes. We also showed that *HYAL-1* mRNA was inversely correlated to that of ER- α and PR, but not to that of ER- β , specifically in clear cell and mucinous EOC tissue samples. HYAL-1 activity was also high in the plasma of patients with these EOC subtypes. Our results suggest Hyaluronidase-1 as a potential target/biomarker for

clear cell and mucinous EOCs and especially in tumors with low levels of ER- α and PR

2. Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the leading cause of death from gynecologic cancer in most Western countries (Jemal *et al.* 2008). Because of its asymptomatic growth and the lack of effective screening methods, about 70% of all cases are diagnosed in an advanced stage, with only modest improvements in survival over the past 40 years (Jemal *et al.* 2008). Although most patients respond to chemotherapy initially, recurrence rates are very high resulting in the general poor prognosis seen in these patients (Liu 2005). Furthermore, EOCs are morphologically heterogeneous, and different histopathological subtypes have distinct molecular characteristics and diverse response to treatment (Cho & Shih 2009 review). EOC can be classified as serous, endometrioid, clear cell or mucinous which correspond to the different types of epithelia present in the female reproductive tract (Seidman *et al.* 2004 review). Differences in chemotherapy response and patient outcomes probably result from the molecular heterogeneity of these morphologically distinct EOCs (Cho & Shih 2009). For instance, *TP53* mutations are frequently observed in serous and endometrioid cancers, but are scarcely detected in clear cell and mucinous EOCs (Cho & Shih 2009). It is also known that the frequency of chromosomal instability is higher in serous EOC than in the other subtypes (Cho & Shih 2009).

In serous EOC, molecular genetic analysis has suggested a role for tumor suppressor genes located on the short arm of chromosome 3 (3p) in the pathogenesis of this disease (Hoglund *et al.* 2003). Transcriptome analysis of chromosome 3 genes

identified several differentially expressed genes in EOC cell lines and ovarian tumors when compared to normal ovarian surface epithelial (NOSE) cells (Manderson *et al.* 2002; Birch *et al.* 2008). Chromosomal aberrations in 3p21.3 are frequently found in lung, renal and breast cancers, suggesting that they harbor tumor suppressor genes (Senchenko *et al.* 2004). Our interest lies in a cluster of genes, named hyaluronidases (*HYAL1*, *HYAL2* and *HYAL3*), located on chromosome 3p21.3 that are the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer (Senchenko *et al.* 2004).

Mammalian hyaluronidases (EC 3.2.1.35) are endo-*N*-acetylhexosaminidases which hydrolyze the glycosaminoglycan hyaluronan. They comprise a family of 6-7 genes with approximately 40% identity among each other (Csoka *et al.* 2001; Kim *et al.* 2005). In humans, they are clustered in groups of three on chromosomes 3p21.3 (*HYAL1*, *HYAL2* and *HYAL3*) and 7q31.3 (*HYAL4*, *PH20/SPAM1* and *HYALP1*), with *HYALP1* being a pseudogene and *HYAL4* coding for a chondroitinase enzyme (Csoka *et al.* 1999; Csoka *et al.* 2001). Therefore, in humans, there are four hyaluronidases, HYAL-1, -2, -3 and PH20/Spam1, the latter being mainly expressed in the male reproductive tract and having an important role in fertilization (Martin- DeLeon PA 2006 review). On the other hand, hyaluronidases located on chromosome 3 are ubiquitously expressed. HYAL-1 and HYAL-2 are the main somatic hyaluronidases responsible for hyaluronan turnover and are known to have several physiological and pathological roles (Csoka *et al.* 2001; Stern *et al.* 2006 review), such as wound healing, inflammation and osteoarthritis. In contrast, Hyal-3 has been described to be

devoid of hyaluronan enzymatic activity (Hemming *et al.* 2008) and its physiological role still remains to be determined.

In ovarian cancer, allelic imbalance of these three genes (*HYAL1*, *HYAL2* and *HYAL3*) has been shown in tumor and stroma tissues (Tuhkanen *et al.* 2004), and *HYAL-1* activity and mRNA expression was found to be significantly reduced in serous EOC when compared to normal ovaries (Hiltunen *et al.* 2002; Nykopp *et al.* 2009). In accordance with this observation, extracellular accumulation of hyaluronan is often observed in ovarian tumor stroma and pericellular matrix, and is associated with poor disease outcome (Anttila *et al.* 2000; Hiltunen *et al.* 2002). In addition, several reports have demonstrated interactions between hyaluronan and membrane receptors, such as CD44, which promotes the association of CD44 with certain cytoskeletal proteins (e.g. ankyrin, RhoGTPases, Cdc42) generating specific signalling increases promoting ovarian cancer cell adhesion, migration and survival (Bourguignon 2008 review).

In contrast, levels of both hyaluronan and *HYAL-1* have been reported to be increased in bladder, prostate and head and neck cancers, and to be implicated in tumor progression and metastasis (Franzmann *et al.* 2003; Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008 review). Interestingly, elevated extracellular hyaluronan is mainly found in tumor stroma while elevated *HYAL-1* levels are detected in tumor tissues, suggesting a cross-talk between these two tissue types. High levels of *HYAL-1* expression are also found in breast cancer and glioblastomas, and are

correlated with metastatic tumors (Delpuch *et al.* 2002; Lokeshwar & Selzer 2008). Interestingly, estrogen receptor (ER) negative breast cancer cell lines, which tend to be more aggressive, have enhanced hyaluronidase activity when compared to ER positive cell lines (Wang *et al.* 2009). By a mechanism yet unknown, HYAL-1 induces cell cycle transition and up regulates the levels of positive regulators of G2-M transition (e.g. cdc25c, cyclin B1, cdk10) in bladder, prostate and oral squamous cancer cell lines (Lin & Stern 2001, Lokeshwar *et al.* 2005a,b). HYAL-1 also enhances angiogenesis, probably by generating hyaluronan fragments of distinct sizes which possess the ability to stimulate endothelial cell proliferation and capillary formation (Takahashi *et al.* 2005).

Therefore, levels of hyaluronidase expression may vary depending on tumor type and on its aggressive behavior. In the present work, we performed a detailed study on the expression of HYAL-1 in ovarian cancer tissue samples representing four different subtypes and showed elevated levels of this enzyme in clear cell and mucinous EOCs, but not in serous or endometrioid EOCs. We also demonstrated that levels of HYAL-1 expression in clear cell and mucinous EOCs were inversely correlated with those of ER α and progesterone receptor (PR). To our knowledge, this is the first report demonstrating increased expression of HYAL-1 in different morphological EOC subtypes and showing its inverse correlation with steroid hormones in EOC tissue samples. Finally, we showed that plasma levels of this enzyme are 37-45% higher in patients with clear cell and mucinous EOC but not in

those with serous or endometrioid tumors, when compared to patients with benign cysts. Our present results suggest that HYAL-1 could be a potential biomarker for the detection of these two distinct EOC subtypes.

3. Material and method

3.1. Clinical samples

Tissue tumor samples and plasma collected in EDTA were obtained, with informed consent, from participants undergoing surgeries performed at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Hôpital Notre-Dame. Only tumors from chemotherapy naïve patients were used. Histopathology, grade and stage of tumors were assigned according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria. As normal ovary has little epithelial content, benign serous ovarian tumors were used as a control. Information concerning the samples used in the present study is summarized in Table I.

3.2. Cell lines

Primary cultures of normal ovarian surface epithelium (NOSE) cells were derived, as previously described (Lounis *et al.* 1994), from ovaries of three participants with no prior history of ovarian cancer, following prophylactic oophorectomy at the CHUM Hôpital Notre-Dame and informed consent. EOC cell lines were established as previously described (Lounis *et al.* 1994; Provencher *et al.* 2000; Ouellet *et al.* 2008), and were derived from serous epithelial ovarian tumors (TOV81D, TOV2223, TOV1946) or ascites fluid (OV1946, OV866), from an endometrioid ovarian tumor (TOV112D), a clear cell carcinoma (TOV21G), and a mucinous epithelial ovarian cancer (TOV2444). Cells were cultured in OSE medium

(Wisent Inc., St- Bruno, QC, Canada) containing 2.5 µg/ml amphotericin B and 50 µg/ml gentamicin (both from Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Culture media was supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) for the NOSE cultures and 10% FBS for the EOC cell lines.

3.3. Quantitative real-time RT-PCR (Q-PCR)

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) from frozen tumor samples or directly from cells grown to 80% confluency as described previously (Manderson *et al.* 2002). RNA quality was routinely monitored by agarose gel electrophoresis and with the 2100 Bioanalyzer, using the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The cDNA synthesis was performed according to the protocol of the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) using 1 µg of total RNA. The obtained cDNA solution was diluted ten times and 5 µl aliquots were used in each Q-PCR reaction. Quantitative amplifications were obtained using the Platinum® SYBR® Green Q-PCR supermix UDG (Invitrogen) and the following pair of primers: 5'-AAGCCCTCCTCCTCCTTAACC-3' and 5'-AGCCAGGGTAGCATCGAC-3' for *HYAL-1*, 5'-1 CGCGCTCTACCCTGCACTC-3' and 5'-GAATCCGGCCTCAGGTAGTT-3' for *ESR1* (ER α), 5'-TGGGCTTACTGACCAACCTG-3' and 5'-CCTGATCATGGAGGGTCAAA-3' for

ESR2 ($ER\beta$), 5'-AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAA-3' and 5'-GACAGCGCAGAAGTGAGCATC-3' for *PGR* (PR), 5'-GCGCTGGCTCACCCCTACCT-3' and 5'-GCCCCAGGGTGCAGAGATGTC-3' for *ERK1*. The above mentioned $ER\alpha$, $ER\beta$ and PR primer sequences were obtained from a previous publication (Walton *et al.* 2009). *ERK1* was chosen as the control gene based on its stable expression in 69 ovarian samples, consisting of normal and tumor types, as previously described (Ouellet *et al.* 2005). Fluorescence was captured using the iCycler iQ real-time detection system (BioRad Laboratories). Amplifications were carried out at 50°C for 2 minutes (UDG incubation), 95°C for 3 minutes (denaturing), and 50 cycles of 95°C/30 sec, 58°C/30 sec and 72°C/45 sec, followed by a melting curve of 70 cycles of 0.5°C increase/cycle starting at 60°C. Positive and negative controls were introduced in all experiments, and purity and specificity of the PCR products were sporadically monitored by agarose gel electrophoresis. PCR reactions were performed at least three times for each cDNA sample in separate experiments. Relative expression value was obtained by the $1/2\Delta Ct$ method using *ERK1* as the control gene. In this method, the difference in CT (ΔCt) between the target and the control genes was used to determine gene expression with the formula $2^{\Delta Ct}$. A normalized value of expression for the target gene with reference to the control gene was then obtained by the calculation $1/2^{\Delta Ct}$. All mRNA expression values were ratios relative to the control *ERK1* gene.

3.4. GEO Dataset Analysis

Gene expression profile of several tissue samples of the four morphologically distinct ovarian cancers and of normal ovaries has been performed using the Affymetrix HG_U133A array (Wu *et al.* 2007) and was made accessible through the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GEO dataset GSE6008). In the present study, we uploaded the raw table for each tumor sample and selected the normalized values [quantile-normalized trimmed-mean, log transformed with $\log(\max(x+50,0)+50)$] for the hybridization of the probes of interest. In the case of *HYAL1* and *PGR*, the Affymetrix HG_U133A array contained only one probe for each of these genes (210619_s_at and 208305_at, respectively). Therefore, these values were used as such in our analysis to evaluate the expression of these genes in individual tissue samples. However, for *ESR1* and *ESR2* several probes were available (205225_at, 211233_x_at, 211234_x_at, 1235_s_at, 211627_x_at, 215551_at, 215552_s_at, 217163_at, 217190_x_at for *ESR1*; and 210780_at, 211117_x_at, 211118_x_at, 211119_at, 211120_x_at for *ESR2*), and the average of the normalized values for the probes of each gene was used in our work to analyze the expression of these genes in individual tissue samples. Information concerning histology, grade and stage of these samples was obtained from the available supplemental material (Wu *et al.* 2007) and is summarized in Table I.

3.5. Hyaluronan zymography

To monitor hyaluronidase activity of cell lysates from ovarian cancer cell lines, hyaluronan zymography was performed as previously described (Orimoto *et al.* 2008). Cells harvested from 80% confluent culture were resuspended in lysis buffer (10 mM imidazole, 0.25 M sucrose), briefly sonicated and their protein content determined by the BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories). Samples (containing 30 µg of protein) were separated by native PAGE (20 mA, 4°C) on an 8% gel containing 0.25 mg/ml human umbilical cord hyaluronic acid (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). The gel was then briefly equilibrated in the assay buffer specific for hyaluronidase-1 detection (100 mM sodium formate, 150 mM NaCl, pH 3.7) and subsequently incubated overnight in the same buffer at 37°C. After incubation, gels were treated with 0.01 mg/ml Pronase (Sigma-Aldrich) in a 20 mM Tris buffer (pH 8.0) for 4 h, rinsed with distilled water, and stained sequentially with 0.5% Alcian blue and 0.1% Coomassie blue R, both in 30% methanol:10% acetic acid. Gels were de-stained until clearing bands of digested hyaluronan were evident. Gel zymography was repeated three times for each cell line using cell extracts from different cultures.

3.6. HYAL-1 enzymatic activity of plasma samples

Quantification of HYAL-1 activity in plasma sample was assayed by a colorimetric method for the estimation of *N*-Acetyl-D-glucosamine released after hyaluronan digestion (Reissig *et al.* 1955; Sharma *et al.* 2009). Briefly, aliquots of

EDTA-treated plasma (around 4 μ l, containing 30 μ g proteins, as determined by the BioRad protein assay) were incubated with 40 μ g of hyaluronan from human umbilical cord (Sigma-Aldrich) in 200 μ l final volume of reaction buffer (79mM sodium formate, 150 mM NaCl, 02 mg/ml BSA, pH 3.9) at 37°C for 24 h. The reaction was terminated by addition of 40 μ l of 1.2 M potassium tetraborate pH 9.1 and boiled for 3 min. Colour formation is revealed by the addition of 1.2 ml of *p*-dimethylaminobenzaldehyde reagent [prepared as previously described (Reissig *et al.* 1955; Sharma *et al.* 2009)] and incubation at 37°C for 20 min in the acidic environment of this reagent. Samples were immediately read at 585 nm. Hyaluronidase activity was estimated from a NADG (Sigma- Aldrich) standard curve (1 to 10 nmols), and was expressed as nmol/ μ g protein. Blanks were obtained by omitting the plasma samples. Each plasma sample was measured at least three times in separate experiments.

3.7. Statistical analysis

Differential expressions of the analyzed genes (either by Q-PCR or microarray) in tissue samples as well as differential enzymatic activity in plasma samples were evaluated by the nonparametric two-tailed Mann Whitney test, and significance was considered at $p < 0.05$. Correlation analyses were evaluated by the parametric two-tailed Pearson test and were considered significant when $p < 0.05$. All

statistical analyses were done using Prism4 for Windows version 4 (GraphPad Software, Inc.).

4. Results

4.1. Hyaluronidase-1 expression is elevated in clear cell and mucinous but not in serous and endometrioid EOC

Currently, Hyaluronidase-1 expression levels in ovarian cancer has been described specifically in serous tumors (Hiltunen *et al.* 2002; Nykopp *et al.* 2009), probably because this is the most frequent EOC subtype (Seidman *et al.* 2004). In the present study, we analyzed the mRNA expression of this enzyme by Q-PCR in ovarian cancer tissue samples obtained from patients with different morphological subtypes of this disease, e.g. serous (11 samples), endometrioid (9 samples), clear cell (11 samples) and mucinous (8 samples). Expression levels were then compared to those of 15 benign ovarian tumors. As shown in Figure 1A, levels of *HYAL-1* mRNA are significantly elevated in clear cell and mucinous carcinomas (Mann Whitney test, $p < 0.05$) but not in serous and endometrioid tumors.

Because the size of our sample cohort could be considered small, we decided to validate our results by analyzing *HYAL-1* mRNA expression in a publicly available microarray dataset (GEO dataset GSE6008, Wu *et al.* 2007) containing 41 serous, 37 endometrioid, 8 clear cell and 13 mucinous EOC samples, and 4 normal ovarian tissue samples. Figure 1B shows the normalized values [quantile-normalized trimmed-mean, log-transformed with $\log(\max(x+50,0)+50)$] for the hybridization of each sample with the *HYAL-1* probe (210619_s_at) of the Affymetrix HG_U133A

array. Consistent with our Q-PCR results, no significant difference was observed for *HYAL-1* mRNA expression between normal ovarian tissues and that of serous or endometrioid tumor samples (Figure 1B). Clear cell carcinomas had a tendency to express higher levels of *HYAL-1* mRNA than normal ovarian tissue but no statistical significance was attained. In accordance to our results, mucinous samples had statistically significant higher levels of *HYAL-1* than normal tissue (Mann Whitney test, $p < 0.05$) (Figure 1B).

Ovarian cancer cell lines derived from tumor samples of these different morphological subtypes have been previously characterized and showed behavior similar to the tumor sample from which they originated (Lounis *et al.* 1994; Provencher *et al.* 2000; Ouellet *et al.* 2008). They provide powerful tools to investigate the molecular events related to each morphologically distinct ovarian cancer. Therefore, our next step was to analyze the level of expression of *HYAL-1* mRNA and protein in these cell lines. Primary cell cultures of normal ovarian surface epithelium (NOSE) (Lounis *et al.* 1994) were used as controls. Figure 1C shows that, as expected, mRNA expression of *HYAL-1* was particularly high in cell lines TOV21G (derived from a clear cell carcinoma), and TOV2444 (derived from a mucinous EOC). An intermediate level of *HYAL-1* mRNA expression was observed in the cell line TOV112D, which was derived from an endometrioid ovarian tumor. Cell lines derived from serous epithelial ovarian cancer at the primary site (TOV81D, TOV2223, and TOV1946) or from the ascites fluid (OV1946, OV866) showed low

levels of *HYAL-1* expression, comparable to those of NOSE cell lines. In order to demonstrate that mRNA expression levels, measured quantitatively by our set of primers, reflected the amount of HYAL-1 protein in these samples, we measured HYAL-1 enzymatic activity by a substrate-gel zymogram. This is a conventional method to measure hyaluronidase activity and is specific for hyaluronidase-1 when assayed at acidic pH (Orimoto *et al.* 2008). Figure 1D show that a clear band of digested substrate (hyaluronan) was detected only in the cell lysates of TOV21G and TOV2444 cell lines. The HYAL-1 enzymatic activity in the serous and endometrioid samples was below the detection level of our assay.

4.2. Expression of HYAL-1 in clear cell and mucinous EOC inversely correlates with those of ER α and PR

In breast and gynecologic cancers, low levels of hormone receptors, mainly ER and PR, are associated with reduced survival and poor prognosis (Ho 2003; Chen *et al.* 2008; Yamashita 2008 reviews). Interestingly, hyaluronidase activity has been shown to be elevated in ER negative breast cancer cell lines (Wang *et al.* 2009). Therefore in the present study we analyzed the mRNA expression levels of ER α , ER β and PR by Q-PCR. Our results show that mRNA expression of PR (Figure 2A), ER α (Figure 2B) and ER β (Figure 2C) appears higher in cell lines possessing low *HYAL-1* mRNA expression (Figure 1) and vice-versa. In particular, TOV21G and TOV2444 cell lines have high levels of *HYAL-1* mRNA expression and very low mRNA levels

of all three receptors (see vertical arrows in both Figures 1 and 2). Our findings, using a panel of ovarian cancer cell lines, are concordant with those of breast cancer cell lines (Wang *et al.* 2009).

However, to our knowledge, this inverse relationship between Hyaluronidase-1 and hormone receptors has not yet been demonstrated in tissue samples from cancer patients. Therefore, we decided to address this issue in the present study. First, we characterized the level of mRNA expression of all three receptors (PR, ER α , ER β) in our sample cohort by Q-PCR (Figure 3, left panels) and we verified the mRNA expression of these receptors in the publicly available microarray GEO dataset GSE6008 (Figure 3, right panels). Figure 3B shows that PR mRNA expression is significantly lower ($p < 0.05$) in serous, clear cell and mucinous ovarian cancers when compared to benign tumors (our Q-PCR results) or to normal ovarian tissue (microarray results). ER α mRNA expression was significantly lower ($p < 0.05$) in clear cell and mucinous tumors in our tissue samples using Q-PCR but no significant difference was observed in the microarray dataset (Figure 3A). However, mRNA expression of this receptor was significantly higher ($p < 0.05$) in endometrioid ovarian carcinomas in both our results and those of the microarray data (Figure 3B). For ER β , figure 2C shows that its mRNA expression is significantly low only in serous epithelial ovarian cancer in both datasets.

We further went on to verify whether levels of Hyaluronidase-1 inversely correlated with any of these three receptors. R2 values for Pearson correlation

analyses of *HYAL-1* mRNA expression and the mRNA expression of the three hormone receptors were calculated (Table II). Consistent inverse correlations were observed for *HYAL-1* mRNA expression and those of PR as well as ER α only in clear cell and mucinous ovarian cancer subtypes (see bold fonts in Table II and correlation graphics in Figure 3). This inverse correlation was statistically significant for ER α in clear cell and mucinous samples from the microarray dataset ($p < 0.05$). For all other analyses (Table II) either no correlation was observed or correlation results were not consistent between the two datasets analyzed (for instance, positive correlation using our Q-PCR results and negative using those of the microarray dataset).

To our knowledge this is the first indication of a negative correlation of *HYAL-1* mRNA expression and ER α or PR mRNA levels in epithelial ovarian cancer and especially in tumor tissue samples.

4.3. *HYAL-1* expression is not indicative of grade and stage of epithelial ovarian cancer

It has been previously reported that higher grade bladder, prostate and breast tumors have higher levels of *HYAL-1* in comparison to those of lower grade (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008). Similarly, we wanted to verify whether levels of *HYAL-1* mRNA in clear cell and mucinous ovarian tumors would also correlate with disease grade or stage. Table I shows the characteristics of grade and stage of the patients who provided the samples used in the present work. For the

publicly available microarray dataset, information on disease grade and stage was obtained from the supplemental material (Wu *et al.* 2007) and is summarized in Table I. Pearson correlation analyses did not reveal a significant positive correlation between levels of *HYAL-1* mRNA and either grade or stage in clear cell ($R^2 = 0.075$ and 0.054 for grade and stage respectively in our data set, and $R^2 = 0.018$ for stage in the microarray data, all $p > 0.05$) or mucinous tumor samples ($R^2 = 0.1480$ and 0.3764 for inverse correlation with grade and stage respectively in our data set, and $R^2 = 0.00002$ and 0.1163 for grade and stage in the microarray data, all $p > 0.05$). Global analysis including all subtypes did not show a significant positive correlation between levels of *HYAL-1* mRNA and disease grade or stage ($R^2 = 0.015$ and 0.059 for grade and stage respectively in our data set, and $R^2 = 0.0056$ and 0.0051 for grade and stage respectively in the microarray data, all $p > 0.05$).

4.4. Hyaluronidase-1 activity can be detected in the conditioned culture medium of TOV21G cell line and might be a potential serum/plasma marker for clear cell and mucinous EOC

It has been shown that *HYAL-1* is present in the culture medium of prostate and bladder cancer cell lines as well as in the urine of patients with bladder cancer (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar *et al.* 2005a,b). In the present work, we wanted to verify whether *HYAL-1* is also secreted by EOC cell lines and whether it could be used as a serum/plasma marker for the two morphological subtypes in which its

expression level is elevated, e.g. clear cell and mucinous EOC. Figure 4A shows the presence of HYAL-1 activity (clear band of digested hyaluronan) in the concentrated serum-free conditioned medium of TOV21G cell culture as well as in its cell lysate. In contrast, no enzymatic activity can be detected in concentrated conditioned medium and cell lysate from the TOV1946 cell line (derived from a serous EOC). Having established that HYAL-1 is secreted by ovarian cancer cells expressing this enzyme, we investigated whether this enzymatic activity could be differentially detected in the plasma of patients with distinct morphological EOC subtypes. Because HYAL-1 has long been known to be present in mammalian serum/plasma (De Saiegui & Pigman 1967; Fiszer-Szafarz *et al.* 1990), a method other than the gel-substrate zymogram is needed to better determine differences in plasma/serum levels of this enzyme. For this purpose, we used a quantitative method for HYAL-1 activity measurement in solution (Reissig *et al.* 1955), which has been recently used to detect the activity of this enzyme in human serum and plasma (Sharma *et al.* 2009). The activity of HYAL-1 was assayed in the plasma of patients with serous (10 samples), endometrioid (6 samples), clear cell (6 samples) or mucinous (3 samples) EOC, and compared to activities in plasma from 14 patients having benign ovarian tumors. As expected, HYAL-1 enzyme activity was detected in all plasma samples (Figure 4B). However, levels of this enzyme were 37.5% and 45% higher in plasma samples from patients with clear cell and mucinous EOC (0.0066 ± 0.0016 and 0.0070 ± 0.0013 nmol/ μ g respectively) than those of patients with benign tumors (0.0048 ± 0.0010

nmol/ μ g). Even though statistical significance was not attained in the present study, the p values obtained for the non-parametric Mann-Whitney test were really borderline (p = 0.0526 and p = 0.0678 respectively for clear cell and mucinous when compared to benign). It is possible that a more sensitive method and/or a larger cohort of samples would provide more significant results. HYAL-1 levels in plasma from patients having serous or endometrioid EOC (0.0047 ± 0.0012 and 0.0051 ± 0.0005 nmol/ μ g respectively) were similar to those of benign. It is important to note that the pattern of *HYAL-1* mRNA expression in tumor samples (Figure 1A) is very similar to that of HYAL-1 activity in plasma samples (Figure 4B), reinforcing our assumption that this enzyme can be potentially used as a biomarker.

5. Discussion

Hyaluronidase genes (*HYAL1*, *HYAL2* and *HYAL3*), located on chromosome 3p21.3, have been referred to as tumor suppressor genes because this chromosomal region is frequently deleted in lung, renal and breast carcinomas (Senchenko *et al.* 2004) as well as in epithelial ovarian cancer (Hoglund *et al.* 2003; Tuhkanen *et al.* 2004). However, there are several other candidate tumor suppressor genes in this region, including *SEMA3B* and *SEMA3F* (Tse *et al.* 2002; Xiang *et al.* 2002) as well as *RASSF1* (RAS association domain family 1). In fact, inactivation of the latter has been implicated in the development of more than 40 types of sporadic human cancers (van der Weyden & Adams 2007; Donniger *et al.* 2007 reviews). Therefore, it is possible that the hyaluronidases are not the main tumor suppressor genes in this region, but may instead be consequentially affected by default mechanisms in some tumor types.

The concept of hyaluronidases as tumor suppressors seems appealing, as there is a vast literature demonstrating the role of its substrate, hyaluronan, in tumor progression, survival and metastasis (Bourguignon 2008; Toole & Slomiany 2008; Tammi *et al.* 2008 reviews). However, the roles of hyaluronidases as tumor promoters have also been extensively reported (Lokeshwar & Selzer 2008; Stern 2008 reviews). These studies showed that up-regulation of hyaluronidases can promote cell cycle activation, induce extracellular matrix degradation and formation of angiogenic hyaluronan fragments, and are associated with tumor growth, invasion, and

recurrence in several cancer types (Lokeshwar & Selzer 2008; Stern 2008). Our current results support those reports by showing, for the first time, that *HYAL-1* mRNA is elevated in epithelial ovarian cancer, and specifically in the clear cell and mucinous morphological subtypes (Fig. 1). Similar results were obtained by two different techniques (Q-PCR and microarray) and with tissue sample cohorts from two independent institutions, thus providing independent validation for our observations. Previous studies have shown either no change or a down-regulation in the expression pattern of this enzyme in ovarian cancer when compared to normal ovary (Hiltunen *et al.* 2002; Tuhkanen *et al.* 2004; Nykopp *et al.* 2009). However, these studies were always performed in the context of serous EOC. Our results also show that serous tumors have equivalent or lower mRNA expression levels of *HYAL-1* when compared to benign tumors or normal ovarian tissue (Fig. 1). Combining the notions that the frequency of chromosomal instability is higher in serous EOC than in other subtypes, and that structural abnormalities of chromosome 3 commonly occur in EOC, including loss of all or parts of the 3p arm, and gains of the 3q arm (Manderson *et al.* 2002; Hoglund *et al.* 2003; Birch *et al.* 2008), it is plausible that the expression of *HYAL-1* in serous EOC is affected by chromosomal 3p instability. In clear cell and mucinous EOC, higher *HYAL-1* levels may be involved in tumor progression and metastasis as reported in bladder, prostate and breast cancer (Delpech *et al.* 2002; Lokeshwar *et al.* 2005a,b). Indeed, increased expression levels of hyaluronan and *HYAL-1* have been associated with high grade

bladder and prostate cancers (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008). However, in our study we could not establish a correlation between levels of *HYAL-1* mRNA and tumor grade or stage in any EOC subtype. This observation is clear even when analysing the two tumor types presenting high HYAL-1 levels in our work; clear cell carcinomas were mainly of advanced grade (G3) whereas mucinous were of low grade (G1) (Table 1). Nevertheless, it is possible that HYAL-1 levels are associated with parameters other than disease grade or stage in clear cell and mucinous EOC. One important characteristic that differentiates clear cell from serous EOC is the poor response to standard therapy (Sugiyama *et al.* 2000; Pectasides *et al.* 2006), and the high rate of recurrence for this ovarian cancer type (Sugiyama *et al.* 2000). Interestingly, high HYAL-1 levels have been recently reported to be a better predictor than high hyaluronan levels for recurrent bladder cancer (Gomez *et al.* 2009). As for mucinous EOC, although frequently detected as low grade, this type of tumor is also associated with low response to treatment and can be of high risk (Hess *et al.* 2004; Shimada *et al.* 2009). In this case, clear cell and mucinous subtypes would have the common feature of lower responders to chemotherapy. Therefore, it is possible that HYAL-1 levels are associated with recurrence and/or lack of response to treatment of clear cell and mucinous EOCs. In the present work, we did not have access to such information and further studies are warranted to substantiate this interpretation.

In breast and gynecologic cancers, expression levels of hormone receptors, especially ER and PR, are widely studied and correlated with patient survival, prognosis, and recurrence (Ho 2003; Chen *et al.* 2008; Yamashita 2008). Absence of ER in breast cancer has been consistently associated with tumor progression, recurrence and metastasis, and despite major advances in surgery and adjuvant therapies, ER-negative breast cancer remains hard to treat (Yamashita 2008). Interestingly, ER-negative breast cancer cell lines have higher hyaluronidase levels than ER-positive cells (Wang *et al.* 2009) and silencing of *HYAL-1* by RNA interference inhibited cell proliferation and induced cell cycle arrest in some breast cancer cell lines Tan *et al.* 2006). In our experiments, we analyzed the expression pattern of *HYAL-1*, PR, ER α and ER β in several ovarian cancer cell lines derived from all four morphological subtypes. Our results show that cell lines derived from clear cell (TOV21G) and mucinous (TOV2444) EOC have higher levels of *HYAL-1* mRNA and protein (evaluated by enzymatic activity) than those derived from serous (TOV81D, TOV2223, TOV1946, OV886, OV1946) or endometrioid (TOV112D) (Fig. 1). mRNA expression levels of all three hormone receptors were very low in clear cell and mucinous derived EOC cell lines and variable in the other subtypes (Fig. 2). Therefore, similar to breast cancer cell lines, *HYAL-1* expression is higher in ER-negative ovarian cancer cell lines. We went further and compared mRNA levels of *HYAL-1* with those of PR, ER α and ER β in tumor samples from our patient cohort and in those from the microarray dataset (Fig. 3). Inverse correlation was observed

for PR and ER α , specifically, in clear cell and mucinous subtypes (Table II, Fig. 4), and it is possible that HYAL-1, like PR, is a target for ER α . To our knowledge this is the first demonstration of a correlation between *HYAL-1* and PR or ER α mRNA levels in ovarian cancer samples, including cell lines and especially in tumor tissues. Several studies have demonstrated that patients with PR and ER- α negative ovarian cancer have a poorer prognosis. It is possible that HYAL-1 has a role in tumor progression and cell cycle in ER/PR-negative clear cell and mucinous EOC much in the same way as has been shown for ER-negative breast cancer (Wang *et al.* 2009) and for bladder and prostate cancer cell lines (Lokeshwar *et al.* 2005a,b). HYAL-1 is known to be present in biological fluids such as plasma and urine Fiszler- Szafarz *et al.* 1990; Fiszler-Szafarz *et al.* 1995). Interestingly, levels of hyaluronan and HYAL-1 are reported to be elevated in urine of patients with bladder cancers (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008), and HYAL-1 has been shown to be secreted to the culture medium by some bladder and prostate cancer cell lines (Lokeshwar *et al.* 2005a,b). Furthermore, patients with head and neck carcinomas are shown to have elevated hyaluronidase activity in their saliva (Franzmann *et al.* 2003). Our results show that HYAL-1 is also secreted by the ovarian cancer cell line originating from the clear cell carcinoma, but not from that of serous EOC (Fig. 5). Therefore, we investigated whether HYAL-1 activity could be differentially detected in plasma samples from patients with clear cell or mucinous ovarian cancer. Indeed, our results showed that HYAL-1 activity was 37-45% higher in plasma of patients with these

two EOC subtypes when compared to those of serous, endometrioid and benign tumors (Fig. 5). In the present study, we used a conventional colorimetric assay to measure HYAL-1 activity of plasma samples in a reaction mixture (Reissig *et al.* 1955; Sharma *et al.* 2009). It is possible that results with better significance would have been obtained with a more sensitive method, such as the hyaluronidase ELISA-like assay (Stern & Stern 1992), in which residual hyaluronan previously coated on a 96- well plate is detected by biotinylated hyaluronan-binding protein. This method was used to detect differential HYAL-1 activity in urine of patients with bladder tumors (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008). However, plasma samples are more complex and have higher protein content that might interfere with HYAL-1 activity measurement. For instance, serum albumin can interfere with hyaluronan catalysis and recent reports have shown that a proper concentration of both albumin and the substrate, hyaluronan, is needed for proper HYAL-1 activity (Lenormand *et al.* 2009). A typical ELISA assay for the detection of HYAL-1 protein by anti- HYAL-1 antibodies would be a better alternative to detect the level of this enzyme in plasma of EOC patients, independently of enzymatic activity. However, no ELISA method is currently available to detect HYAL-1 levels, and future studies will be necessary to develop and standardize this technique. Interestingly, only 20-30% of patients with clear cell and mucinous EOC show high levels of serum CA125 (the most commonly used biomarker for EOC), in contrast to 60-80% for the endometrioid and serous subtypes (Meyer & Rustin 2000). The use of HYAL-1 as a

plasma biomarker for these two subtypes would, therefore, improve clinical analysis for detection of ovarian cancers.

In conclusion, we show that HYAL-1 is differentially expressed in morphologically distinct EOCs, being elevated in clear cell and mucinous tumors as well as in the plasma of these patients. We also show that HYAL-1 levels in tumor samples were inversely correlated with those of ER α or PR specifically in these EOC subtypes. In the future, it will be interesting to analyze plasma levels in clear cell and mucinous EOC according to recurrence and prognosis, and to verify whether levels of this enzyme could be used as a serum/plasma biomarker for high risk clear cell and mucinous EOCs.

6. Acknowledgements

We thank Jennifer DuPont for technical assistance on handling/assembling the plasma samples; and the Gynecology-Oncology and Pathology services of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame for tumor procurement. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant # 262142 to EC). Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) affiliated with the CTRNet.

7. Figure legends

Figure 1. HYAL-1 expression in ovarian cancer tissue samples and cell lines. A) Q-PCR for *HYAL-1* mRNA expression in benign tumor (white bar), and in serous (dotted bar), endometrioid (hatched bar), clear cell (shaded bar) and mucinous (black bar) EOC tissue samples from patients. Bars represent the mean \pm SEM of the relative *HYAL-1* expression normalized to control gene *ERK1*. The value for each individual cDNA sample is the mean of 3-4 separate Q-PCR measurements. * denotes $P < 0.05$ on Mann Whitney test. B) Normalized values for *HYAL-1* probe hybridization of the Affymetrix HG_U133A array (GEO dataset GSE6008) on RNA samples of normal ovarian tissues (white bar), and of serous (dotted bar), endometrioid (hatched bar), clear cell (shaded bar) and mucinous (black bar) EOCs. Bars represent the mean \pm SEM of raw values of normalized *HYAL-1* hybridization. * denotes $P < 0.05$ on Mann

Whitney test. C) Q-PCR for *HYAL-1* mRNA expression in cell lines derived from normal ovarian epithelium (NOV2667D, NOV2809D, NOV2206D; white bars), and from serous (TOV81D, TOV2223, TOV1946, OV1946, OV866; dotted bars), endometrioid (TOV112D; hatched bar), clear cell (TOV21G; shaded bar) and mucinous (TOV2444; black bar) EOCs. Bars represent the mean of the relative *HYAL-1* expression normalized to control gene *ERK1*. Q-PCR measurements were repeated at least three times for each cell line cDNA. Vertical arrows indicate clear cell and mucinous cell lines having high *HYAL-1* mRNA expression. D) Hyaluronan zymogram of cell lysates from the above mentioned serous, endometrioid, clear cell and mucinous ovarian cancer cell lines. The horizontal arrow marks the clear band of digested hyaluronan. The image is representative of three independent zymogram experiments.

Figure 2. mRNA Expression of progesterone receptor (A), and estrogen receptors alpha (B) and beta (C) in ovarian cancer cell lines and tissue samples. a panels) Q-PCR for these receptors was performed on cDNAs from cell lines derived from normal ovarian epithelium, and from serous, endometrioid, clear cell and mucinous EOCs (see Figure 1C legend for details). Bars represent the mean of the relative mRNA expression for each receptor normalized to the control gene *ERK1*. Q-PCR measurements were repeated 3-4 times for each receptor and each cell line. Vertical arrows indicate clear cell and mucinous cell lines having low mRNA expression of

these receptors. b panels) Normalized mRNA expression levels for steroid receptors determined by Q-PCR on cDNAs from benign tumors (white bars), and from serous (dotted bars), endometrioid (hatched bars), clear cell (shaded bars) and mucinous (black bars) EOC tissue samples from patients. Q-PCR measurements were performed at least three times for each receptor and each tissue sample, and bars represent the mean \pm SEM of the relative mRNA expression for each receptor normalized to the control gene *ERK1* in each tissue category. c panels) Normalized values for hybridization of PR, ER α and ER β probes of the Affymetrix HG_U133A array (see Material and Methods for details) on RNA samples of normal ovarian tissues (white bars), and of serous (dotted bars), endometrioid (hatched bars), clear cell (shaded bars) and mucinous (black bars) EOCs. Bars represent the mean \pm SEM of the normalized raw values for the expression of each receptor in each tissue category. * denotes $P < 0.05$ on Mann Whitney test.

Figure 3. Correlation of *HYAL-1* expression with those of estrogen receptor alpha (A) and progesterone receptor (B). Points represent relative mRNA expression values for each tissue sample. Top graphs for each receptor correlation are from Q-PCR and bottom graphs are from the microarray dataset (GSE6008). Left panels are correlations for clear cell tissue samples and right panels for mucinous tissue samples. Significance ($P < 0.05$) was analysed by the Pearson coefficient test.

Figure 4. Secreted HYAL-1 protein as a potential plasma biomarker for the identification of clear cell and mucinous EOC. A) Hyaluronan zymogram of cell lysates (lanes 1, 4 and 5) and concentrated conditioned culture media (lanes 2 and 3) from serous (TOV1946) and clear cell (TOV21G) ovarian cancer cell lines. Note the clear band of digested hyaluronan specifically with the TOV21G samples. The image is representative of three independent experiments. B) HYAL-1 enzymatic activity of plasma samples were assayed quantitatively by a modified Reissig method^{36,37}. Bars represent the mean \pm SEM of HYAL-1 activity measured in plasma samples of patients with benign ovarian tumor (white bar), or with serous (dotted bar), endometrioid (hatched bar), clear cell (shaded bar) or mucinous (black bar) EOCs. The value for each plasma sample is the mean of 3-4 measurements performed independently. * denotes $P < 0.05$ on Mann Whitney test.

Table I - Samples and clinical data of ovarian cancer patients for each analysis dataset

Dataset	Samples	Grade 1			Grade 2			Grade 3			
		Stage	1-2	3-4	n.a	1-2	3-4	n.a	1-2	3-4	n.a
Q-PCR (n=53)	Benign (n=15)										
	Serous (n=10)					2		2	2	4	
	Endometrioid (n=9)			1	1	1	1	1	4		
	Clear cell (n=11)				1	1		2	5	1	
	Mucinous (n=6)	3	1	1					1		
Microarray ^(a) (n=99)	Normal (n=4)										
	Serous (n=41)	1	4		3	10		4	19		
	Endometrioid (n=37)	10	1		10	3		3	10		
	Clear cell (n=8)							6	2		
	Mucinous (n=13)	8	1		1	1		1	1		

^(a) From publicly available dataset (Wu *et al.* 2007)

n.a – denotes not available

Table II - Correlation coefficient for *HYAL-1* mRNA expression with those of progesterone receptor (PR), or estrogen receptors alpha (ER α) or beta (ER β)

		<i>Pearson R value for HYAL-1 expression correlation</i>			
		<i>Serous</i>	<i>Endometrioid</i>	<i>Clear cell</i>	<i>Mucinous</i>
PR	Q-PCR	0.2907	0.7374*	-0.3475	-0.5166
	Microarray	0.1348	-0.1454	-0.5247	-0.4920
ER α	Q-PCR	0.0534	0.5203	-0.3199	-0.4033
	Microarray	0.1543	-0.1361	-0.7105*	-0.5538*
ER β	Q-PCR	0.6160	0.3449	0.2938	-0.1241
	Microarray	0.0076	-0.3660*	0.0341	0.5120

Figure 1. HYAL-1 expression in ovarian cancer tissue samples and cell lines.

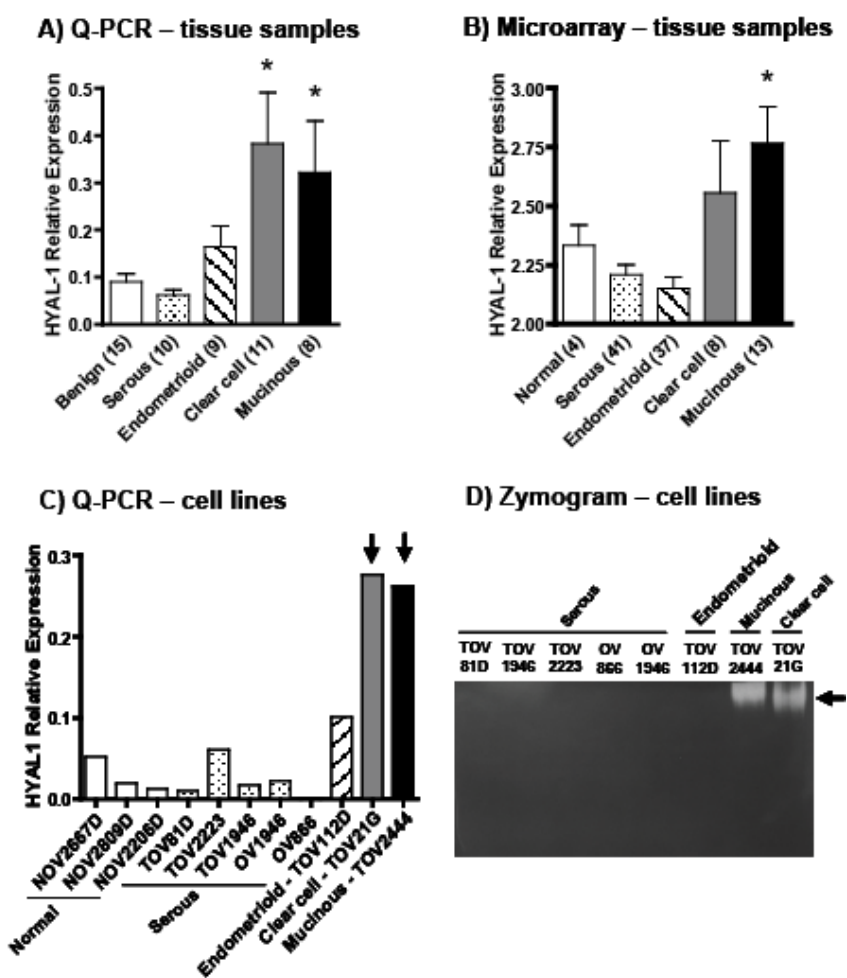


Figure 2. Expression of progesterone receptor (A), and estrogen receptors alpha (B) and beta (C) in ovarian cancer cell lines and tissue samples

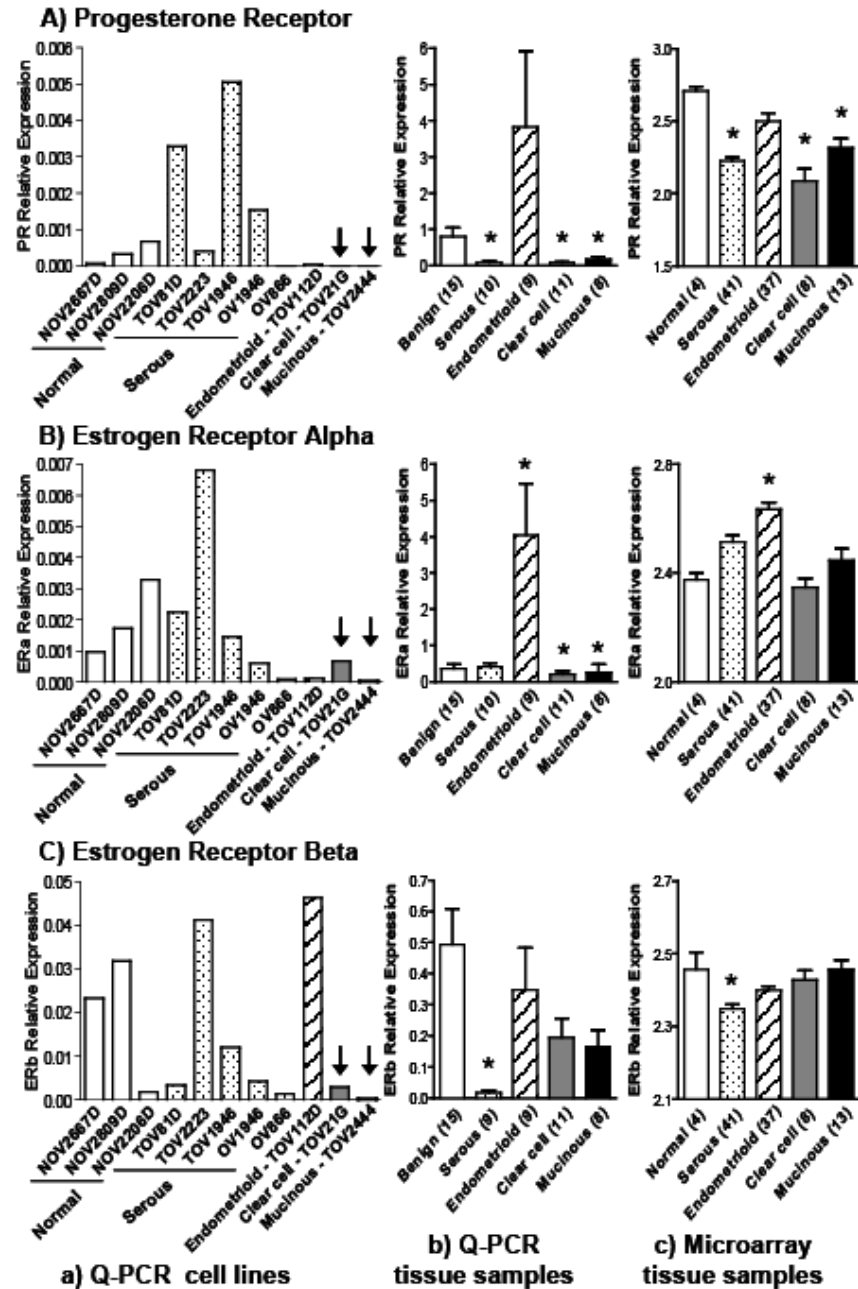


Figure 3. Correlation of HYAL-1 expression with those of estrogen receptor alpha (A) and progesterone receptor (B)

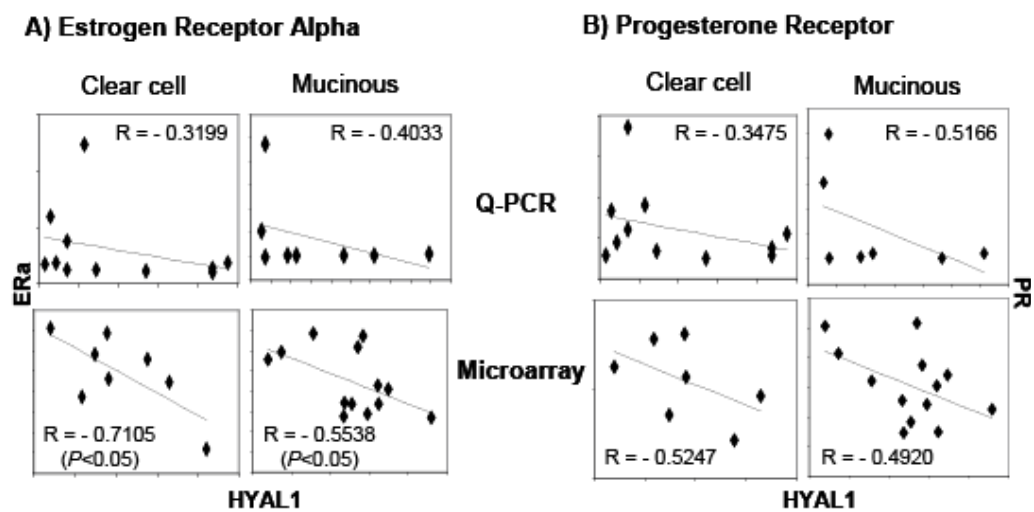
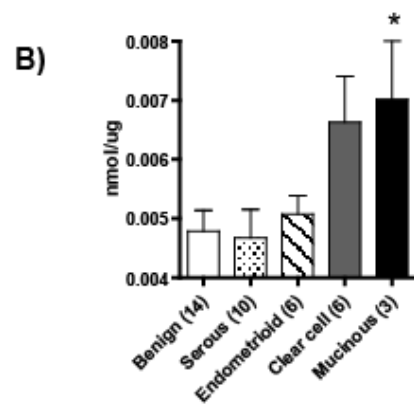
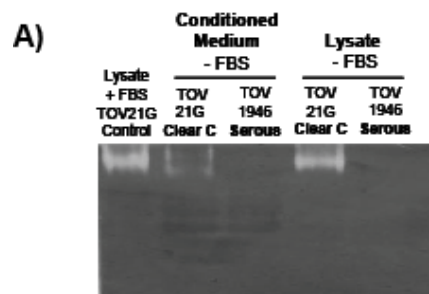


Figure 4. Secreted HYAL-1 protein as a potential plasma biomarker for the identification of clear cell and mucinous EOC.



8. Discussion

Les gènes hyaluronidases (*HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3*), localisés sur le chromosome 3p21.3, ont été identifiés comme étant des gènes suppresseurs de tumeurs. En effet cette région du chromosome 3 est sujet à des délétions fréquentes aussi bien dans les carcinomes du poumon, du rein, du sein (Senchenko *et al.* 2004), que dans le cancer épithélial des ovaires (Hoglund *et al.* 2003; Tuhkanen *et al.* 2004). Cependant, il y a une série d'autres candidats déjà assimilés à des gènes suppresseurs de tumeur dans cette même région, incluant *SEMA3B* et *SEMA3F* (Tse *et al.* 2002; Xiang *et al.* 2002), et *RASSF1* (Famille de gène s'associant au domaine 1 de RAS). En effet, il a été démontré que l'inactivation de ce dernier était impliqué dans le développement de plus de 40 types de cancers sporadiques humains (van der Weyden & Adams 2007; Donniger *et al.* 2007 review). Ainsi, il est possible que les hyaluronidases ne soient pas les principaux gènes suppresseurs de tumeur dans cette région, mais ils pourraient être affectés par des mécanismes par défaut dans certains types de tumeur.

La théorie qui présente les hyaluronidases comme étant des gènes suppresseurs de tumeur semble attirer l'attention puisqu'il existe une vaste littérature attestant que son substrat, l'acide hyaluronique ou hyaluronan, joue un rôle dans la progression et la survie des tumeurs, et dans le phénomène de métastase (Bourguignon 2008; Toole & Slomiany 2008; Tammi *et al.* 2008 review). En effet le rôle de l'acide hyaluronique (HA) a largement été étudié, de ce fait il est bien accepté

que le HA sert d'ancrage aux cellules tumorales en interagissant avec les récepteurs CD44 ou RHAMM (Toole *et al.* 2004; Turley *et al.* 2002). Dans le cancer des ovaires, l'adhésion des cellules tumorales à la couche péricellulaire formée par le HA autour des cellules mésothéliales, est une étape déterminante dans la propagation du carcinome ovarien. Or il a été montré que CD44 et l'intégrine β -1 sont également impliquées dans ce processus (Skubitz 2002). De plus, les traitements réalisés à l'aide d'oligosaccharides de petits poids moléculaire de HA (6 à 18 sucres résultant de la dégradation du HA par les hyaluronidases) a pour effet de retarder la croissance des tumeurs en faisant particulièrement en faisant concurrence au HA de haut poids moléculaire afin de se lier au récepteur CD44 (Zeng *et al.* 1998; Ghatak *et al.* 2002). Toutefois un certains nombre d'études ont également révélé que HA joue un rôle dans la progression des tumeurs. Ainsi, il a été montré que des concentrations élevées de HA et de HYAL-1 dans le cancer de la vessie, du sein, de la prostate et de la tête, contribue à la progression des tumeurs et des métastases (Delpech *et al.* 2002; Lokeshwar *et al.* 2000). Les hyaluronidases sécrétées digèrent le HA extracellulaire en générant des oligosaccharides (6-20 sucres de 10-100 kDa) stimule l'angiogénèse en induisant la prolifération des cellules endothéliales et la formation des capillaires. Par ailleurs, le HA de haut poids moléculaire (supérieur à 1000kDa) est un inhibiteur de ces même processus physiologiques (West *et al.* 1989; Takahashi *et al.* 2005). De façon cohérente, il faut savoir qu'un rôle oncologique ces hyaluronidases a également été mis en évidence (Lokeshwar & Selzer 2008; Stern 2008 review). Ces études ont

montré que la régulation positive des hyaluronidases pouvait favoriser l'activation du cycle cellulaire et induire la dégradation de la matrice extracellulaire pour conduire à la formation de fragments de hyaluronan angiogéniques. En d'autres termes, les hyaluronidases sont également associées à la croissance tumorale, à l'invasion, et aux mécanismes de récurrence dans plusieurs types de cancers (Lokeshwar & Selzer 2008; Stern 2008). Nos travaux supportent ces résultats en montrant pour la première fois que le niveau de l'ARNm de HYAL-1 est élevé dans le cancer épithélial des ovaires, et spécifiquement dans les sous type à cellules claires et mucineux (Fig. 1).

Nous avons obtenus des résultats similaires à l'aide de deux techniques différentes (Q-PCR et Microarray) avec comme support des cohortes d'échantillons de tissus provenant de deux institutions différentes. Ce qui nous a permis de valider de façon indépendante nos observations. Des études précédentes n'ont montré aucun changement ou régulation négative dans l'expression de cette enzyme dans le cancer des ovaires lorsque les échantillons cancéreux étaient comparé aux ovaires sains (Hiltunen *et al.* 2002; Tuhkanen *et al.* 2004; Nykopp *et al.* 2009). Cependant, toutes ces études ont toujours été réalisées avec des échantillons du CEO de type séreux. De façon intéressante, nos résultats ont également montré que des tumeurs de types séreux avaient des niveaux d'expression d'ARNm de HYAL-1 équivalent ou plus faible que les tumeurs bénignes et les tissus d'ovaires normaux (Fig. 1). En combinant le fait que la fréquence d'instabilité chromosomique est plus élevée dans le CEO de type séreux que dans tous les autres sous types et le fait que les anomalies

structurales du chromosome 3 interviennent fréquemment dans le CEO, sachant que l'on peut perdre jusqu'à la totalité de la région 3p et gagner des fragments sur le bras 3q (Manderson *et al.* 2002; Hoglund *et al.* 2003; Birch *et al.* 2008), il est fortement plausible que l'expression de HYAL-1 dans le CEO de type séreux soit affectée par cette instabilité chromosomique dans la région 3p. Dans le CEO de type mucineux et à cellules claires, les niveaux élevés de HYAL-1 pourrait être impliqués dans la progression des tumeurs et des métastases comme cela a déjà été démontré dans le cancer de la vessie, la prostate et du sein (Delpach *et al.* 2002; Lokeshwar *et al.* 2005a, b). En effet, il est bien connu que les niveaux d'expression élevés d'acide hyaluronique et de HYAL-1 sont associés avec à des grades avancés dans le cancer de la vessie et de la prostate (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008). Toutefois, nos travaux n'ont pas permis d'établir une corrélation évidente entre les niveaux d'ARNm de HYAL-1 et un grade ou un stade de tumeur dans aucun des sous types du CEO. Cette observation est cohérente car les tumeurs cancéreuses du CEO à cellules claires et de type mucineux exprimant des concentrations élevées de HYAL-1 sont associées à des grades avancés (G-3) et faibles (G-1) respectivement (Tableau I). Néanmoins, il est possible que les niveaux de HYAL-1 soient associés avec des paramètres autres que le grade ou le stade de la maladie dans les CEO de type mucineux et à cellules claires. Il faut noter qu'une des caractéristiques qui différencie le CEO à cellules claires du type séreux est sa mauvaise réponse aux thérapies disponibles actuellement (Sugiyama *et al.* 2000; Pectasides *et al.* 2006), et par

conséquent, son taux de récurrence est bien trop élevé (Sugiyama *et al.* 2000). De façon intéressante, une étude récente a montré qu'une concentration élevée de HYAL-1 mais non de hyaluronan permettent d'établir de meilleure prédiction quant à la récurrence du cancer de la vessie (Gomez *et al.* 2009). Dans le cas du CEO de type mucineux également, bien qu'étant fréquemment détecté à un faible grade de malignité, ce type de tumeur est aussi associé à une mauvaise réponse au traitement et donc à un risque élevé (Hess *et al.* 2004; Shimada *et al.* 2009). Ainsi, Pisano et son équipe avaient traité avec une combinaison de chimiothérapie 225 patientes atteintes du CEO dont 21 patientes étaient atteintes du type mucineux. 76% des tumeurs de ces patientes étaient de grade 2, soit plus faible que le grade des autres sous-types généralement évalué au grade 3. En fin d'étude, 60% des patientes atteintes du CEO de type mucineux étaient réfractaires ou résistantes au traitement reçu. Cette étude a montré que le cancer des ovaires de type mucineux à une mauvaise réponse aux différentes combinaisons de chimiothérapie disponible sur le marché (Pisano *et al.* 2005). De façon intéressante, dans notre étude les échantillons de CEO de types mucineux et à cellules claires réagissent faiblement à la chimiothérapie. Ce qui nous permet ainsi d'associer une concentration élevée de HYAL-1 avec la récurrence de la maladie et/ou avec le manque de réponse au traitement dans les CEOs de type mucineux et à cellules claires. Il est donc important d'élaborer des études approfondies sur la question pour vérifier et confirmer cette interprétation.

Par ailleurs, il est bien connu que dans les cancers du seins et de type gynécologiques, les niveaux d'expression des récepteurs hormonaux, particulièrement ER (récepteur d'estrogène) et PR (récepteur de progestérone), sont associés à la survie des patientes, au pronostic, et au taux de récurrence de la maladie (Ho 2003; Chen *et al.* 2008; Yamashita 2008). Des travaux ont démontré de façon cohérente que l'absence d'ER dans le cancer du sein était liée à la progression des tumeurs, à la récurrence de la maladie et aux métastases. C'est pourquoi malgré des avancées majeures en chirurgie et des thérapies adjuvantes, dans le contexte du cancer du sein dans lequel les ER ne sont pas exprimés, le traitement est difficile (Yamashita 2008). De façon intéressante, des lignées cellulaires du cancer du sein qui n'expriment pas d'ER ont un niveau d'expression de hyaluronidases plus élevé que dans le cas des lignées cellulaires qui expriment les ER (Wang *et al.* 2009). Une autre étude a révélé que lorsque l'on bloquait l'expression de HYAL-1 avec la technique de l'interférence à l'ARN, on inhibait la prolifération cellulaire et on arrêtait le cycle cellulaire dans certaines des lignées cellulaires du cancer du sein (Tan *et al.* 2006). De façon similaire, dans nos expériences, nous avons analysé le profil d'expression de HYAL-1, PR, ER α et ER β dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses dérivées des quatre sous types morphologiques du CEO. Notre analyse de l'activité enzymatique montre que les lignées cellulaires dérivées du CEO à cellules claires (tov21g) et de type mucineux (tov2444) ont un niveau d'expression d'ARNm et de protéines HYAL-1 plus élevé que dans celles dérivées des échantillons de type séreux

(TOV81D, TOV2223, TOV1946, OV886, OV1946) ou endométrioïdes (TOV112D) (Fig. 1). Les niveaux d'expression de l'ARNm de ces trois récepteurs d'hormone étaient très faibles dans les CEOs à cellules claires et de types mucineux mais ils étaient variables dans les autres sous types (Fig.2). En conséquence, comme pour les lignées cellulaires du cancer du sein, l'expression de HYAL-1 est plus élevée dans les lignées cellulaires du CEO qui n'expriment pas d'ER. Par la suite, nous avons donc approfondi notre analyse et avons comparé les niveaux d'ARNm de HYAL-1 avec ceux de PR, ER α et ER β dans des échantillons de tissus de tumeur provenant de la cohorte de patientes obtenue par l'intermédiaire du Dr Mes-Masson et les cohortes disponibles en ligne sous forme de base de données résultant d'une expérience de Microarray (Fig. 3). Nous avons observé une corrélation inverse entre l'expression de HYAL-1 et celle de PR et ER α , spécifiquement dans les sous types à cellules claires et de mucineux (Table II, Fig. 4), cette observation montre la possibilité que HYAL-1, tout comme PR, soit une cible de ER α . C'est donc la première fois qu'une corrélation entre les niveaux d'ARNm de HYAL-1 et d'ER α est démontrée dans le cancer des ovaires, non seulement dans des échantillons de tissus de tumeurs mais aussi dans des lignées cellulaires. Une série d'études a démontré que des patientes atteintes du cancer des ovaires qui n'exprimaient pas de PR et ER α avaient un très faible pronostic. Conséquemment, il est possible que HYAL-1 joue un rôle dans la progression tumorale et le cycle cellulaire dans les CEOs du type mucineux et à cellules claires qui n'exprimaient des ER et/ou PR comme c'est le cas dans le cancer

du sein négatif pour ER (Wang *et al.* 2009) et dans les lignées cellulaires du cancer de la vessie et de la prostate (Lokeshwar *et al.* 2005a,b).

En outre, HYAL-1 est connu pour être présent dans les fluides biologiques tels que le plasma et l'urine (Fischer- Szafarz *et al.* 1990; Fischer-Szafarz *et al.* 1995). De façon intéressante, il a été rapporté que les niveaux d'acide hyaluronique et de HYAL-1 étaient élevés dans l'urine des patientes atteints du cancer de la vessie (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008). Il a également été montré que HYAL-1 était sécrété par des lignées cellulaires du cancer de la vessie et de la prostate dans leur milieu de culture (Lokeshwar *et al.* 2005a,b). Mieux encore, des patients ayant des carcinomes de la tête et du cou ont révélé une activité enzymatique élevée de hyaluronidases dans leur salive (Franzmann *et al.* 2003). De façon similaire, nos travaux montrent que HYAL-1 est sécrétée par les lignées cellulaires du cancer des ovaires originaires dérivées de CEO à cellules claires comparativement à celles provenant du CEO du type séreux (Fig. 5). Ainsi, nous avons également examiné l'activité de HYAL-1 dans des échantillons de plasma prélevés à partir de patientes ayant le cancer ovarien à cellules claires et de type mucineux pour identifier d'éventuelles différences. Effectivement, nos travaux ont montré que l'activité de HYAL-1 était 37-45% plus élevée dans les plasmas des patientes atteintes du CEO à cellules claires et de type mucineux comparativement à celles mesurée dans le type séreux, endométrioïde ou ayant des tumeurs bénignes (Fig. 5). Pour se faire, nous avons eu recours à une méthode conventionnelle par

colorimétrie pour mesurer l'activité enzymatique de HYAL-1 dans les échantillons de plasma (Reissig *et al.* 1955; Sharma *et al.* 2009). Il serait indispensable par la suite d'avoir recours à une technique permettant de mesurer l'activité enzymatique plus précise telle que l'ELISA. Pour se faire une quantité précédemment déterminée d'HA est fixée dans une plaque de 96 puits. Ensuite HYAL-1 préalablement couplée à une protéine biotynilée est ajoutée dans les puits de la plaque. La réaction de la dégradation du HA par HYAL-1 dégage un signal coloré et est quantifiée par colorimétrie (Stern & Stern 1992). Cette méthode a été utilisée pour détecter l'activité enzymatique différentielle de HYAL-1 dans l'urine des patients ayant des tumeurs dans la vessie (Lokeshwar *et al.* 2000; Lokeshwar & Selzer 2008).

Toutefois, les échantillons de plasma sont plus complexes que l'urine car ils contiennent un niveau de protéines très élevé qui pourrait perturber la prise de mesure de l'activité de HYAL-1. Par exemple, l'albumine présente dans le sérum interfère avec le processus de dégradation du hyaluronan. À ce sujet, un papier récent a montré qu'une concentration convenable d'albumine et du substrat, l'acide hyaluronique, était indispensable pour induire une activité enzymatique adéquate de HYAL-1 (Lenormand *et al.* 2009). C'est pourquoi un test d'ELISA typique pour la détection de la protéine HYAL-1 par des anticorps anti-HYAL-1 serait une meilleure alternative pour détecter la concentration de cette enzyme dans le plasma des patientes atteintes du CEO, indépendamment de son activité enzymatique. Néanmoins, aucun test d'ELISA n'est présentement disponible pour mesurer les

niveaux de HYAL-1. Pour cette raison, de futures études seront nécessaires pour développer et standardiser cette technique. De plus, il est important de savoir que seulement 20-30% des patientes atteintes du CEO à cellules claires et de type mucineux présentent un niveau élevé de CA 125 dans le sérum (le biomarqueur sérique le plus fiable actuellement pour le CEO), contre 60-80% de patientes atteintes du CEO de type endométrioïde et séreux (Meyer & Rustin 2000). En d'autres termes, CA125 peut devenir moins utile dans les sous types à cellules claires et mucineux. Ainsi, l'utilisation de HYAL-1 en tant que biomarqueur plasmatique pour ces deux sous types contribuerait assurément au progrès des analyses cliniques réalisées pour dépister le cancer des ovaires.

En conclusion, nous avons montré que HYAL-1 s'exprime de façon différentielle dans les CEOs de morphologie distinctes, en étant plus élevé dans les types mucineux et à cellules claires aussi bien dans les tissus extraits de tumeurs de patientes que dans le plasma de ces mêmes patientes. Nous avons également montré que les niveaux élevés de HYAL-1 dans les échantillons de tumeur étaient inversement corrélés avec ceux de PR et ER α respectivement. Pour le futur, il serait impératif d'analyser la présence de HYAL-1 dans le plasma des patientes atteintes du CEO de type mucineux et à cellules claires en fonction du pronostic et du taux de récurrence de la maladie. Il serait également important de vérifier si les niveaux de cette enzyme pourraient servir de biomarqueur dans le sérum/plasma des patientes

atteintes du CEO à cellules claires et de type mucineux reconnus comme étant les sous-types à risque élevé.

9. Perspectives

Nos résultats ont montré que l'expression de l'ARNm de *HYAL-1* était inversement corrélée à celle d'ER α dans les échantillons de tissus et de lignées cellulaires de type mucineux et à cellules Claires. De ce fait, nous suggérons que *HYAL-1* serait un gène cible participant à la répression du gène ER α . L'analyse de la séquence du promoteur le plus proche du gène *HYAL-1* (-93 to +17) a révélé un site consensus de liaison pour Sp1, Egr-1, AP-2 and NF κ B (Lokeshwar *et al.* 2008), mais non pour l'élément de réponse à l'estrogène (ERE). Cependant, basé sur des analyses de localisation génomique à grande échelle réalisées à partir d'expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) qui permettent d'identifier un nombre présumé de EREs (Caroll *et al.* 2006 ; Kwon *et al.* 2007 ; Hua *et al.* 2008), un des EREs a été localisé à 104pb du site de départ de la transcription. De plus, mis à part l'interaction directe qui existe entre les ER et l'ERE relié aux promoteurs cibles, il est largement connu que les ER interviennent aussi bien dans des mécanismes qui font intervenir des gènes ERE-dépendant, telles que la régulation de AP-1 et Sp1 via des interactions protéiques (Chen *et al.* 2008). Une telle régulation devient importante dans un contexte où l'expression d'ER est inhibée et donc où la transcription via les éléments AP-1/Sp1 devrait prévaloir par opposition aux gènes ERE dépendant (Paech *et al.* 1997 ; Batistuzzo *et al.* 1997 ; Saville *et al.* 2000). De façon intéressante, Sp1 se lie au promoteur proximal de *HYAL-1* dans les cellules du cancer de la vessie et de la prostate qui n'expriment pas *HYAL-1* (Lokeshwar *et al.*

2008). Nous proposons donc d'étudier la régulation de l'expression de HYAL-1 et l'activité du promoteur proximal dans les cellules du cancer des ovaires via des expériences de ChIP. Nous nous concentrerons dans un premier temps sur les sites de NFkB et SP1, connus pour être régulés par les estrogènes (Chen *et al.* 2008).

Par ailleurs, puisque nous avons été les premiers à démontrer que les niveaux d'HYAL-1 sont élevés dans les cancers ovariens de type mucineux et à cellules claires, et qu'il n'y a toujours pas d'informations disponibles concernant l'implication de l'inhibition de HYAL-1 dans ces deux sous types du CEO, nous nous proposons d'inhiber l'expression de HYAL-1 à partir de sh-ARNs dirigés contre HYAL-1 humain et d'étudier l'effet de la régulation négative de ce dernier sur la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et la croissance des tumeurs dans les lignées cellulaires du CEO du type mucineux et à cellules claires. Il est important de noter que les lignées qui seront utilisées n'expriment pas d'ER et ces expériences aideront également à élucider le rôle potentiel des gènes cible de ER dans la tumorigénicité.

De plus, nous avons montré que l'activité de HYAL-1 était de 37-45% plus élevée dans le plasma des patientes étant atteintes du CEO de type mucineux et à cellules claires comparativement à celle mesurée dans le plasma des patientes atteintes du CEO de type séreux, endométrioïde et des tumeurs bénignes. Bien que le CEO à cellules claires soit en général de grade élevé et celui de type mucineux soit de grade faible (Cho *et al.* 2009), les deux types ont un risque élevé de récurrence (Sugiyama *et al.* 2000; Pectasides *et al.* 2006; Heints *et al.* 2006 ; Hess *et al.* 2004 ; Shimada *et*

al. 2009). De façon intéressante, les niveaux d'expression de HYAL-1 ont été rapportés comme permettant de faire des prédictions effectives sur la récurrence du cancer de la vessie (Gomez *et al.* 2009. Étant donné ces observations, nous proposons d'analyser les niveaux d'expression de HYAL-1 dans le plasma des patientes atteintes du CEO du type mucineux et à cellules claires en accord avec les données de récurrence et de pronostic, et de vérifier si les niveaux de cette enzyme pourraient être utilisés comme un biomarqueur du sérum/plasma des CEOs de type mucineux et à cellules claires présentant un risque élevé. Pour ce faire, nous utiliserons une technique plus sensible de détection telle que l'ELISA. Les niveaux d'expression de HYAL-1 dans le plasma seront corrélés par régression logique avec les paramètres cliniques, tels que la récurrence, la réponse au traitement, et la survie. Seulement 20-30% des patients ayant le CEO de type mucineux et à cellules claires montrent des niveaux élevés de CA125 dans le sérum (le biomarqueur le plus communément utilisé pour le CEO) par opposition à 60-80% pour les sous type endométrioïde et séreux (Lepage *et al.* 2006 ; Lepage *et al.* 2008 ; Meyer *et al.* 2000). Ainsi l'utilisation de HYAL-1 comme biomarqueur du CEO à cellules claires et de type mucineux permettrait d'améliorer le dépistage des différents sous-types du cancer de l'ovaire.

10. Références

Afify, A. M., Stern, M., Guntenhoner, M., and Stern, R. 1993. Purification and characterization of human serum hyaluronidase, *Arch Biochem Biophys* **305** :434-441

Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV & Kosma VM 2000. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Research* **60** 150-155.

Batistuzzo de Medeiros SR, Krey G, Hiji AK, Wahli W 1997. Functional interactions between the estrogen receptor and the transcriptional activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 *in vivo* promoter. *Journal of Biological Chemistry* **272**:18250-18260

Birch AH, Quinn MC, Filali-Mouhim A, Provencher DM, Mes-Masson AM & Tonin PN 2008. Transcriptome analysis of serous ovarian cancers identifies differentially expressed chromosome 3 genes. *Molecular Carcinogenesis* **47** 56-65.

Bell DA. 2005. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod. Pathol.* **18** (Suppl. 2):S19–32

Bonome T, Lee JY, Park DC, Radonovich M, Pise-Masison C, et al.. 2005. Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res.* **65**:10602–12

Bourguignon LY 2008. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signalling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Seminars in Cancer Biology* **18** 251-259.

Burges A, Brüning A, Dannenmann C, Blankenstein T, Jeschke U, Shabani N, Friese K, Mylonas I. 2010, Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Arch Gynecol Obstet.*, **281**:511-7.

Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* **38**:1289-1297

Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY 2008 Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol* **111**: 144-151.

Chao, K. L., Muthukumar, L., and Herzberg, O. 2007. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis, *Biochemistry* **46**:6911-6920

Chen GG, Zeng Q & Tse GM 2008. Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal Research Reviews* **28** 954-974.

Cherr, G. N., Yudin, A. I., and Overstreet, J. W. 2001. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling, *Matrix Biol* **20**: 515-525

Cisneros MT, 1999. Situacion epidemiologica del cancer mamario. In: Sanchez Basurto C, editor. Compendio de patologia mamaria. 1st ed. Mexico, DF: Ciencia y Cultura Latinoamerica, SA de CV;. p. 91-4

Cho KR & Shih IeM 2009. Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology* **4** 287-313.

Csóka TB, Frost GI, Stern R 1997. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion Metastasis* **17**:297-311

Csoka, A. B., Frost, G. I., Wong, T., and Stern, R. 1997. Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine, *FEBS letters* **417** : 307-310

Csoka, A. B., Frost, G. I., Heng, H. H., Scherer, S. W., Mohapatra, G., and Stern, R. 1998. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus, *Genomics* **48**: 63-70

Csoka AB, Scherer SW & Stern R 1999. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* **60** 356-361

Csoka AB, Frost GI & Stern R 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* **20** 499-508

Csóka TB, Frost GI, Heng HH, Scherer SW, Mohapatra G, Stern R. 1998. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics* **48**:63-70

Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, Bertrand P & Freger P. 2002. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Research* **22** 2423–2427

Dent J, Hall GD, Wilkinson N, Perren TJ, Richmond I, et al. 2003. Cytogenetic alterations in ovarian clear cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. *Br. J. Cancer* **88**:1578–83

DePriest PD, Banks ER, Powell DE, van Nagell JR Jr, Gallion HH, et al. 1992. Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women. *Gynecol. Oncol.* **47**:71–75

Donninger H, Vos MD, Clark GJ 2007. The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science* **120** 3163-3172

Dubeau L. 1999. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: Does the emperor have no clothes? *Gynecol. Oncol.* **72**:437–42

Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K. et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977;**82**:4258–65

Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM. 1991. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Am.J. Pathol.* **139**:777–85

Erzen M, Rakar S, Klancnik B, Syrjanen K, Klancar B. 2001. Endometriosis-associated ovarian carcinoma (EAOC): an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study. *Gynecol. Oncol.* **83**:100–8

Feeley KM, Wells M. 2001. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* **38**:87–95

Fischer-Szafarz B, Szafarz D & Vannier P 1990. Polymorphism of hyaluronidase in serum from man, various mouse strains and other vertebrate species revealed by electrophoresis. *Biology of the Cell* **68** 95-100

Fischer-Szafarz B, Vannier P, Lityńska A, Zou L, Czartoryska B & Tyłki-Szymańska A 1995. Hyaluronidase in human somatic tissues and urine: polymorphism and the activity in diseases. *Acta Biochimica Polonica* **42** 31-33

Flannery, C. R., Little, C. B., Hughes, C. E., and Caterson, B. 1998. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases, *Biochemical and biophysical research communications* **251**: 824-829

Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, Weed DT, Fisher P & Lokeshwar VB 2003. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *International Journal of Cancer* **106** 438–445

Frost GI, Csóka TB, Stern R. 1996. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci Glycotech* **8**:419-434

Frost GI, Csóka TB, Wong T, Stern R. 1997. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun* **236**:10-15

Fukunaga M, Nomura K, Ishikawa E, Ushigome S. 1997. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology* **30**:249–55

Ghatak S, Misra S, Toole BP 2002. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*; **277**: 38013–20

Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, Barakat RR, Lin O, et al.. 2003. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **90**:378–81

Gmachl, M., and Kreil, G. 1993. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3569-3573

Gomez CS, Gomez P, Knapp J, Jorda M, Soloway MS & Lokeshwar VB 2009. Hyaluronic acid and HYAL-1 in prostate biopsy specimens: predictors of biochemical recurrence. *The Journal of Urology* **182** 1350-1356

Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24–q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43:218–220.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986, **320**:134-139

Greer JB, Modugno F, Allen GO, Ness RB, 2005. Androgenic progestins in oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* **105**:731-40

Hemming R, Martin DC, Slominski E, Nagy JL, Halayko AJ, Pind S & Triggs-Raine B 2008. Mouse Hyal-3 encodes a 45-56 kDa glycoprotein whose overexpression increases 22 hyaluronidase 1 activity in cultured cells. *Glycobiology* **18** 280-289

Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S, Beller U. 2006. Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet.*, **95** Suppl 1: S161-192.

Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, Scolyer RA, et al.. 2006. A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **94**:904–13

Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DP, Shepherd JH, Ind T, Bridges J, Harrington K, Kaye SB & Gore ME 2004. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *Journal of Clinical Oncology* **22** 1040-1044

Hiltunen EL, Antilla M, Kultti A, Ropponen K, Penttinen J, Yliskoski M, Kuronen AT, Juhola M, Tammi R, Tammi M & Kosma VM 2002. Elevated hyaluronan concentration without hyaluronidase activation in malignant epithelial ovarian tumors. *Cancer Research* **62** 6410- 6413

Ho SM 2003. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 73

Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sall T & Mitelman F 2003. Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer Research* **63** 3378-3385

Hua S, Kallen CB, Dhar R, Baquero MT, Mason CE, Russell BA, Shah PK, Liu J, Khramtsov A, Tretiakova MS, Krausz TN, Olopade OI, Rimm DL, White KP 2008. Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst Biol* **4**:188

Ichikawa Y, Nishida M, Suzuki H, Yoshida S, Tsunoda H, et al.. 1994. Mutation of K-ras protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors. *Cancer Res.* **54**:33–35

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T & Thum MJ 2008. Cancer statistics, 2008. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* **58** 71-96

Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S & Baba T 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 18028- 18033

Kreil G. 1995. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci* **4**:1666-1669

Kwon YS, Garcia-Bassets I, Hutt KR, Cheng CS, Jin M, Liu D, Benner C, Wang D, Ye Z, Bibikova M, Fan JB, Duan L, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu XD 2007. Sensitive ChIP-DSL technology reveals an extensive estrogen receptor alpha-binding program on human gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:4852-4857

Lacey JV Jr, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, Schatzkin A, Schairer C. 2002. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA*, **288**:334-41.,

Landen CN Jr, Birrer MJ, Sood AK. 2008. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**:995–1005

Lathrop, W. F., Carmichael, E. P., Myles, D. G., and Primakoff, P. 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals, *J Cell Biol* **111**: 2939-2949

Leitao MM, Soslow RA, Baergen RN, Olvera N, Arroyo C, Boyd J. 2004. Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **93**:301–6

Lenormand H, Tranchepain F, Deschrevel B & Vincent JC 2009. The hyaluronan-protein complexes at low ionic strength: how the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin. *Matrix Biology* **28** 365-372

Le Page C, Ouellet V, Quinn MC, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM 2008. BTF4/BTNA3.2 and GCS as candidate mRNA prognostic markers in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **17**: 913-920

Le Page C, Ouellet V, Madore J, Hudson TJ, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM 2006. From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.*, **118**: 1750-1758

Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. 1998. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* **273**:22466-22470

Lepperdinger, G., Mullegger, J., and Kreil, G. 2001. Hyal2--less active, but more versatile?, *Matrix Biol* **20**: 509-514

Lin G & Stern R 2001. Plasma hyaluronidase (Hyal-1) promotes tumor cell cycling. *Cancer Letters* **163** 95–101

Liu CM 2005. Cancer of the ovary. *New England Journal of Medicine* **352** 1268-1269

Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, Soloway MS & Block NL 2000. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *Journal of Urology* **163** 348–356

Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Isoyama T & Lokeshwar BL 2005. a HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer: a tumor promoter and suppressor. *Cancer Research* **65** 7782–7789

Lokeshwar VB, Cerwinka WH & Lokeshwar BL 2005. b HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Research* **65**: 2243–2250

Lokeshwar VB & Selzer MG 2008. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. Review. *Seminars in Cancer Biology* **18** 281-287

Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, Fregien N, Dhir N, Scherer S, Klumpp DJ, Manoharan M, Soloway MS, Lokeshwar BL 2008. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. Identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem.*, **283**: 29215-29227

Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot MJ & Mes-Masson AM 1994. Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Experimental Cell Research* **215** 303-309

Magrath I, Litvak J. Cancer in developing countries. Opportunity and challenge. *J Natl Cancer Inst.* 1993;**85**:862-74

Manderson EN, Mes-Masson AM, Novak J, Lee PD, Provencher D, Hudson TJ & Tonin PN 2002. Expression profiles of 290 ESTs mapped to chromosome 3 in human epithelial ovarian cancer cell lines using DNA expression oligonucleotide microarrays. *Genome Research* **12** 112-121

Martin, D. C., Atmuri, V., Hemming, R. J., Farley, J., Mort, J. S., Byers, S., Hombach-Klonisch, S., Stern, R., and Triggs-Raine, B. L. 2008. A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis, *Hum Mol Genet* **17** : 1904-1915

Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold J. 2006. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol.Oncol.* **103**:883–87

Marquez RT, Baggerly KA, Patterson AP, Liu J, Broaddus R, et al. 2005. Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon. *Clin. Cancer Res.* **11**:6116–26

Martin-DeLeon PA 2006. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Molecular Cellular Endocrinology* **250** 114-121

Masood S, Heitman J, Nuss RC, et al. 1989, Clinical correlation of hormone receptor status in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, **34**:57-60

Meyer T & Rustin GJ 2000. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer* **9** 1535-1538

Mok CH, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, et al.. 1993. Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignanc.

Cancer Res. **53**:1489–92

Mørch LS, Løkkegaard E, Andreasen AH, Krüger-Kjaer S, Lidegaard O. 2009.

Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA*, **302**:298-305

Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptors: how do they control reproductive and non reproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 2000 , **270**:1-10

Nykopp TK, Rilla K, Sironen R, Tammi MI, Tammi RH, Hämäläinen K, Heikkinen A-M, Komulainen M, Kosma V-M & Anttila M 2009. Expression of hyaluronan synthases (*HAS1-3*) and hyaluronidases (*HYAL1-2*) in serous ovarian carcinomas: inverse correlation between *HYAL1* and hyaluronan content. *BMC Cancer* **9** 143

Oettl, M., Hoehstetter, J., Asen, I., Bernhardt, G., and Buschauer, A. 2003.

Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations, *Eur J Pharm Sci*

18 : 267-277

Orimoto AM, Dumaresq-Doiron K, Jiang JY, Tanphaichitr N, Tsang BK & Carmona E 2008. Mammalian hyaluronidase induces ovarian granulosa cell apoptosis and is involved in follicular atresia. *Endocrinology* **149** 5835-5847

Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM, Le Page C, Ren F, Lussier C, Novak J, Ge B, Hudson TJ, Tonin PN & Mes-Masson AM 2005. Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* **24** 4672-4687

Ouellet V, Zietarska M, Portelance L, Lafontaine J, Madore J, Puiffe ML, Arcand SL, Shen Z, Hébert J, Tonin PN, Provencher DM & Mes-Masson AM 2008. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer* **8** 152

Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-Å, Kushner PJ, Scanlan TS 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* **277**:1508-1510

Parrott, J.A., Doraiswamy, V., Kim, G., Mosher, R. and Skinner, M.K., 2001 Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol. Cell*

Endocrinol, **172**, 213–222.

Pectasides D, Fountzilas G, Aravantinos G, Kalofonos C, Efstathiou H, Farmakis D, Skarlos D, Pavlidis N, Economopoulos T & Dimopoulos MA 2006. Advanced stage clear-cell epithelial ovarian cancer: the Hellenic Cooperative Oncology Group experience. *Gynecologic Oncology* **102** 285-291

Pisano C, Greggi S, Tambaro R, Losito S, Iodice F, Di Maio M, Ferrari E, Falanga M, Formato R, Iaffaioli VR, Pignata S 2005. Activity of chemotherapy in mucinous epithelial ovarian cancer: a retrospective study. *Anticancer Res.*; **25**:3501–3505

Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tétrault M, Manderson EN, Wang JC, Eydoux P, Savoie R, Tonin PN & Mes-Masson AM 2000. Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology, Animal* **36** 357-361

Ravdin PM. Prognostic factors in breast cancer. ASCO Education Book 1997; Spring: 217–27.

Reissig JL, Strominger JL & Leloir LF 1955. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *Journal of Biological Chemistry* **217** 959-966

Roden, L., Campbell, P., Fraser, J. R., Laurent, T. C., Pertoft, H., and Thompson, J. N. 1989. Enzymic pathways of hyaluronan catabolism, *Ciba Found Symp* **143**, 60-76; discussion **76-86** : 281-285

Sainz de la Cuesta R, Eichhorn JH, Rice LW, Fuller AF Jr, Nikrui N, Goff BA. 1996. Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **60**:238-44

De Salegui M & Pigman W 1967. The existence of an acid-active hyaluronidase in serum. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **120** 60-67

Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S 2000. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* **275**:5379-5387

Schildkraut JM, Calingaert B, Marchbanks PA, Moorman PG, Rodriguez GC, 2002. Impact of progestin and estrogen potency in oral contraceptives on ovarian cancer risk. *J Natl Cancer Inst.*, **94**:32-8.

Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, et al.. 2002. Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **62**:4722–29 www.annualreviews.org

Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ & Ronnett BM. 2004. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *International Journal of Gynecological Pathology* **23** 41–44

Senchenko VN, Liu J, Loginov W, Bazov I, Angeloni D, Seryogin Y, Ermilova V, Kazubskaya T, Garkavtseva R, Zabarovska VI, Kashuba VI, Kisselev LL, Minna JD, Lerman MI, Klein G, Braga EA & Zabarovsky ER 2004. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene* **23** 5719-5728

Sharma R, Mahadeswaraswamy YH, Harish Kumar K, Devaraja S, Kemparaju K, Vishwanath BS & Girish KS 2009. Effect of anticoagulants on the plasma hyaluronidase activities. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **23** 29-33

Shih IeM, Sheu JJ, Santillan A, Nakayama K, YenMJ, et al.. 2005. Amplification of a chromatin remodeling gene, Rsf-1/HBXAP, in ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:14004–9

Shimada M, Kigawa J, Ohishi Y, Yasuda M, Suzuki M, Hiura M, Nishimura R, Tabata T, Sugiyama T & Kaku T 2009. Clinicopathological characteristics of mucinous adenocarcinoma of the ovary. *Gynecologic Oncology* **113** 331-334

Singer G, Stohr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, et al.. 2005. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am. J.Surg. Pathol.* **29**:218–24

Skubitz AP 2002 Adhesion molecules. *Cancer Treat Res*, **107**: 305-329

Stern M & Stern R 1992. An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Matrix* **12** 397-403

Stern, R. 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *Eur J Cell Biol* **83**: 317-325

Stern R, Asari AA & Sugahara KN 2006. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European Journal of Cell Biology* **85** 699-715

Stern R 2008. Association between cancer and “mucopolysaccharides”: An old concept comes of age, finally. *Seminars in Cancer Biology* **18** 238-243

Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I & Taguchi K 2000. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* **88** 2584-2589

Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H & Heldin P 2005. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **280** 24195–24204

Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P & Tammi MI 2008. Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology* **18** 288-295

Tan JX, Ren GS, Tu G, Li XT, Wang XY & Ran L 2006. Effect of silencing of hyaluronidase gene HYAL1 by RNA interference on proliferation of human breast cancer cells. *Ai Zheng* **25** 844-8. Chinese.

Tapper J, Butzow R, Wahlstrom T, Seppala M, Knuutila S. 1997. Evidence for divergence of DNA copy number changes in serous, mucinous and endometrioid ovarian carcinomas. *Br. J. Cancer* **75**:1782-87

Thomas EJ, Campbell IG. 2000. Molecular genetic defects in endometriosis. *Gynecol. Obstet. Investig.* **50**(Suppl.1):44-50

Toole BP & Slomiany MG 2008. Hyaluronan: A constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. *Seminars in Cancer Biology* **18** 244-250

Tse C, Xiang RH, Bracht T & Naylor SL 2002. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Research* **62** 542-546

Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, et al.. 2003. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-

1 β as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **163**:2503–12

Tuhkanen H, Anttila M, Kosma VM, Yla-Herttuala S, Heinonen S, Kuronen A, Juhola M, Tammi R, Tammi M & Mannermaa A 2004. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *International Journal of Cancer* **109** 247-252

van der Weyden L & Adams DJ 2007. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1776** 58-85

Walton TJ, Li G, McCulloch TA, Seth R, Powe DG, Bishop MC & Rees RC 2009. Quantitative RT-PCR analysis of estrogen receptor gene expression in laser microdissected prostate cancer tissue. *The Prostate* **69** 810-819

Wang F, Grigorieva EV, Li J, Senchenko VN, Pavlova TV, et al. 2008. *HYAL1* and *HYAL2* Inhibit Tumour Growth *In Vivo* but Not *In Vitro*. *PLoS ONE* 3(8): e3031. doi: 10.1371/journal.pone.0003031

Wang X-Y, Tan J-X, Vasse M, Delpech B & Ren G-S 2009. Comparison of hyaluronidase expression, invasiveness and tubule formation in ER(-) and ER(+) breast cancer cell lines in vitro. *Chinese Medical Journal (Engl)* **122** 1300-1304

West DC, Kumar S 1989. Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found Symp*; **143**:187–201

Willner J, Wurz K, Allison KH, Galic V, Garcia RL, et al.. 2007. Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Hum. Pathol.* **38**:607–13

Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, et al. 2007. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/ β -catenin and PI3K/PTEN signaling pathways. *Cancer Cell* **11**:321–33

Yamashita H, 2008. Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol*; **13**: 380-383

Yoshikawa H, Jimbo H, Okada S, Matsumoto K, Onda T, et al.. 2000. Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecol. Obstet. Invest.* **50**(Suppl.1):11–17

Zeng C, Toole BP, Kinney SD, Kuo JW, Stamenkovic I 1998. Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer*; **77**: 396–401.

Zheng, Y., Deng, X., Zhao, Y., Zhang, H., and Martin-DeLeon, P. A.
2001. Spam1 (PH-20) mutations and sperm dysfunction in mice with the Rb(6.16) or Rb(6.15) translocation, *Mamm Genome* **12** : 822-8