

Université de Montréal

**Caractérisation de nouvelles lignées cellulaires
pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie
du cancer épithélial de l'ovaire**

par

Lu-Lin Wang

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

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

Avril, 2011

© Lu-Lin Wang, 2011

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation de nouvelles lignées cellulaires
pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie
du cancer épithélial de l'ovaire**

présenté par :

Lu-Lin Wang

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Isabelle Royal
président-rapporteur

Dre Anne-Marie Mes-Masson
directrice de recherche

Dre Diane Provencher
co-directrice

Dre Euridice Carmona
Membre du jury

RÉSUMÉ

Le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO) est le cancer gynécologique le plus létal. Le CéO de type séreux, la forme la plus commune avec plus de 50% des cas, est souvent diagnostiqué tardivement et associé à un mauvais pronostic. Le CéO avancé, surtout traité par chimiothérapie, va devenir chimiorésistant chez la majorité des patientes traitées. Bien que des lignées cellulaires du CéO aient été dérivées à partir de tumeurs solides et d'ascites de patientes ayant ou non subi une chimiothérapie, aucune des lignées cellulaires du CéO provenant d'une même patiente avant et après ses traitements de chimiothérapie n'ont été établies précédemment. Notre laboratoire est le premier à développer de telles lignées cellulaires. Nos nouvelles lignées cellulaires sont dérivées de trois patientes différentes (1369, 2295 et 3133) et classées selon leur provenance, soit la tumeur solide (TOV) ou l'ascite (OV). Nous avons donc caractérisé ces nouvelles lignées de cellules pré-chimiothérapie (TOV1369TR, OV2295, TOV3133D et TOV3133G) et post-chimiothérapie (OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 et OV3133(2)) par diverses approches. Par immunohistochimie et immunobuvardage de type Western, nous avons caractérisé les niveaux d'expression de marqueurs épithéliaux typiques de kératines (KRT7, KRT8, KRT18, KRT19, KRT20) pour confirmer l'origine épithéliale et ovarienne des cellules. Nous avons également analysé le niveau d'expression de HER2 et p53, deux marqueurs importants dans le CéO. Cependant, il ne semble pas y avoir d'expression différentielle évidente de ces marqueurs entre les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie. Plus encore, nous avons étudié plusieurs caractéristiques tumorigéniques des lignées cellulaires, dont la prolifération cellulaire (par compte cellulaire), la migration cellulaire (par recouvrement de plaie), la capacité à former des sphéroïdes en 3D (par la méthode des gouttelettes inversées), et la formation de tumeurs *in vivo* dans des souris SCID (xénogreffes sous-cutanées). En général, il ne semble pas y avoir de différences claires entre les cellules pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie au niveau du comportement cellulaire, à l'exception du fait qu'aucune des lignées post-chimiothérapie semblent être en mesure de former des structures tridimensionnelles compactes, contrairement à certaines lignées post-chimiothérapie. Nos résultats pourront servir à mieux comprendre les différents mécanismes régissant les tumeurs malignes du CéO de type séreux et à mieux comprendre la progression de la maladie à travers les différents traitements, ce qui nous permettra d'acquérir des informations essentielles pour mieux évaluer et traiter différentes patientes.

Mots clés : cancer épithélial de l'ovaire (CÉO), modèle cellulaire, caractéristiques tumorigéniques, lignées cellulaires pré-chimiothérapie, lignées cellulaires post-chimiothérapie, chimiorésistance

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the deadliest of all gynecologic cancers. The serous type of EOC is the most common form of the disease, and it accounts for more than 50% of the cases. It is often diagnosed at advanced stages where its prognosis is poor. Advanced EOC is treated mainly with chemotherapy. However, chemoresistance development eventually impedes the success of the treatments for most patients. Researchers have derived cell lines from EOC from solid tumors or from ascites. So far, there has not been EOC cell lines established from samples taken before and after chemotherapy treatments within the same patient. Our laboratory is thus the first to develop a new and powerful model of pre-chemotherapy and post-chemotherapy cell lines. All cell lines were derived sequentially from 3 different patients (1369, 2295 and 3133), from either solid tumors (TOV) or ascites (OV). We therefore characterized these new pre-chemotherapy cell lines (TOV1369TR, OV2295, TOV3133D and TOV3133G) and post-chemotherapy cell lines (OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 and OV3133(2)) through several approaches. Using immunohistochemistry and Western blot, we have characterized the level of expression of typical epithelial keratin markers (KRT7, KRT8, KRT18, KRT19, KRT20) to confirm the epithelial and ovarian nature of the cells. We have also analysed the expression level of important EOC markers, such as that of HER2 and p53, and found no clear difference between the pre-chemotherapy and post-chemotherapy EOC cells. Moreover, we have studied various tumorigenic features of the cell lines, such as cell proliferation (by cell count), cell migration (by the wound healing assay), 3D spheroid formation (by the hanging drop method), *in vivo* tumor formation in SCID mice (subcutaneous xenografts). In general, there were no notable differences between the two categories of cell lines at the cellular level, except that post-chemotherapy cell lines seemed to be unable to form compact 3D structures, contrary to some pre-chemotherapy cell lines. The obtained results would aid in better understanding the different mechanisms that malignant serous EOC tumors undergo and the progression of the disease with respect to the different treatments. Such study would allow us to gain valuable insight into the optimal treatment decisions to take for different EOC patients.

Keywords: epithelial ovarian cancer (EOC), cell model, tumorigenic features, pre-chemotherapy cell lines, post-chemotherapy cell lines, chemoresistance

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
<u>1.1 L’ovaire normal</u>	2
1.1.1 L’ovaire : anatomie et structure de base	2
1.1.2 L’ovaire : double fonctionnalité	3
1.1.3 Contrôle du fonctionnement ovarien	5
<u>1.2 L’ovaire anormal</u>	7
1.2.1 Qu’est-ce que le cancer de l’ovaire?.....	7
1.2.2 Épidémiologie : le cancer de l’ovaire en chiffres	8
1.2.3 Les anomalies de l’ovaire : tumeurs et kystes	10
1.2.4 Classification des tumeurs ovariennes : BOV, LMP et TOV.....	10
1.2.4.1 Les tumeurs bénignes (BOV).....	10
1.2.4.2 Les tumeurs borderline (LMP)	11

1.2.4.3 Les tumeurs invasives (TOV)	11
1.2.5 Classification histopathologique	11
1.2.5.1 Les types histopathologiques.....	12
1.2.5.1.1 Les tumeurs stromales.....	12
1.2.5.1.2 Les tumeurs germinales.....	12
1.2.5.1.3 Les tumeurs épithéliales	12
1.2.5.2 Les sous-types histopathologiques.....	13
1.2.5.2.1 Les tumeurs séreuses.....	13
1.2.5.2.2 Les tumeurs endométrioides	13
1.2.5.2.3 Les tumeurs mucineuses.....	14
1.2.5.2.4 Les tumeurs à cellules claires.....	14
1.2.6 Classification par stade et grade	14
1.2.6.1 Le stade	14
1.2.6.2 Le grade.....	17
1.2.7 Étiologie du cancer de l'ovaire.....	17
1.2.7.1 Les facteurs de risques.....	17
1.2.7.1.1 L'âge, l'alimentation et les habitudes de vie	18
1.2.7.1.2 Les facteurs liés aux hormones et à l'activité de reproduction.....	18
1.2.7.1.3 Les facteurs familiaux et héréditaires.....	19
1.2.7.2 Le cancer épithélial de l'ovaire et ses origines	19
1.2.8 Le cancer de l'ovaire au niveau clinique	20
1.2.8.1 Les manifestations : signes et symptômes	20

1.2.8.2 Le dépistage et le diagnostic.....	21
1.2.8.3 Le traitement : chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie	23
1.2.8.4 Le suivi et le pronostic	23
<u>1.3 La chimiothérapie et la chimiorésistance</u>	<u>25</u>
1.3.1 Qu'est-ce que la chimiothérapie?.....	25
1.3.2 Chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire.....	26
1.3.2.1 Le paclitaxel	26
1.3.2.2 La carboplatine	28
1.3.3 Chimiorésistance dans le cancer ovarien.....	29
1.3.3.1 Mécanismes de résistance et voies impliquées.....	29
1.3.3.2 Chimiorésistance innée versus chimiorésistance acquise	31
<u>1.4 Les modèles d'étude</u>	<u>32</u>
1.4.1 La banque de tumeurs	32
1.4.2 La culture primaire	33
1.4.3 Les lignées cellulaires	33
1.4.4 Les xénogreffes	34
<u>1.5 Les objectifs de mon projet de maîtrise</u>	<u>35</u>

Chapitre 2 : Matériel et méthodes	36
2.1 Échantillons et données cliniques.....	37
2.2 Lignées cellulaires et conditions de culture	40
2.3 Approches moléculaires.....	41
2.3.1 Extraction d'ARN.....	41
2.3.2 Extraction de protéines et immunobuvardage de type Western	42
2.3.3 Immunohistochimie	42
2.4 Essais fonctionnels <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	43
2.4.1 Essais de prolifération <i>in vitro</i>	43
2.4.2 Essais de migration <i>in vitro</i>	44
2.4.3 Formation de sphéroïdes en 3D <i>in vitro</i>	45
2.4.4 Xénogreffes dans des souris immunodéficientes <i>in vivo</i>	46
Chapitre 3 : Résultats	47
3.1 Les lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO	48
3.2 Qualité de l'ARN des tumeurs solides et des lignées cellulaires.....	50
3.3 Expression des kératines, HER2 et p53 dans les tumeurs solides et les lignées cellulaires dérivées.....	51
3.3.1 Expression des kératines.....	51
3.3.2 Expression de HER2 et de p53	55
3.4 Taux de croissance cellulaire des lignées du CÉO	57
3.5 La capacité de migration cellulaire des lignées.....	59
3.6 La capacité des lignées du CÉO à former des sphéroïdes en 3D	63
3.7 Capacité des lignées à former des tumeurs dans les souris immunodéficientes	65

Chapitre 4 : Discussion	67
4.1 L'importance de l'établissement des lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO.....	68
4.2 Évaluation de l'expression des kératines, de HER2 et de p53 dans les tumeurs solides d'origine et les lignées cellulaires dérivées.....	69
4.3 Croissance cellulaire de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie	72
4.4 Capacité de migration de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie.....	73
4.5 Capacité de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie à former des structures tridimensionnelles	74
4.6 Capacité de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie à former des tumeurs dans les souris SCID	75
Conclusions	77
Perspectives	78
Chapitre 5 : Références	xvii
Chapitre 6 : Annexes	xxix

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1	La stadification du cancer de l’ovaire selon la FIGO	16
------------------	--	----

Chapitre 2

Tableau 2	Paramètres cliniques.....	37
------------------	---------------------------	----

Chapitre 3

Tableau 3	RIN pour les tumeurs initiales et les lignées dérivées.....	50
------------------	---	----

Tableau 4	Tableau récapitulatif des essais de culture cellulaire <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	66
------------------	--	----

Annexe

Tableau supplémentaire	Mutation <i>TP53</i> dans les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie des patientes 1369, 2295 et 3133 présentant un CÉO.....	xxxiv
-------------------------------	---	-------

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1	Le système reproducteur de la femme	2
Figure 2	Structure de l’ovaire humain adulte	3
Figure 3	Les cycles ovariens et utérin	5
Figure 4	Contrôle du cycle ovarien.....	6
Figure 5	Les grandes marques du cancer.....	7
Figure 6	Distribution en pourcentage des taux d’incidence et de mortalité par cancer chez les femmes au Canada	9
Figure 7	Origine des trois types de tumeurs ovariennes et leurs sous-types	12
Figure 8	Les sous-types histologiques majeurs du CÉO	13
Figure 9	Patron de dissémination du carcinome ovarien	15
Figure 10	Cycle cellulaire et action du paclitaxel	27
Figure 11	Structures des molécules cisplatine et carboplatine	28
Figure 12	Modèle hypothétique de chimiorésistance dans des cellules du cancer de l’ovaire humain	30
Figure 13	Construction d’un microétalage de tissus.....	32

Chapitre 2

Figure 14	Variation du taux de CA125 au cours de divers traitements pour les trois patientes 1369 (A), 2295 (B), et 3133(C)	39
Figure 15	Extraction de l’ARN et analyse du RIN	41
Figure 16	Création d’une strie sur une monocouche de cellules confluentes.....	44
Figure 17	Représentation schématique de la formation de sphéroïdes.....	45

Chapitre 3

Figure 18	Morphologie cellulaire des nouvelles lignées du CÉO	49
Figure 19	Expression <i>in situ</i> des kératines dans les tumeurs solides du CÉO	52
Figure 20	Expression <i>in vitro</i> des kératines dans les lignées cellulaires du CÉO.....	54
Figure 21	Expression <i>in situ</i> de HER2 et p53 dans les tumeurs solides du CÉO.....	56
Figure 22	Expression <i>in vitro</i> de HER2 et p53 dans les lignées cellulaires du CÉO	56
Figure 23	Taux de croissance des lignées des patientes 1369 (A), 2295 (B) et 3133 (C)	58
Figure 24	Capacité de migration cellulaire des lignées 1369 et de la lignée TOV1946	60
Figure 25	Capacité de migration cellulaire des lignées 2295 et de la lignée TOV1946	61
Figure 26	Capacité de migration cellulaire des lignées 3133 et de la lignée TOV1946	62
Figure 27	Formation de structures tridimensionnelles pour les lignées cellulaires du CÉO...	64

Annexe

Figure supplémentaire 1 : Comparaison de l'expression <i>in situ</i> de KRT7 et de KRT20 dans des tumeurs du CÉO et du carcinome du côlon	xxx
Figure supplémentaire 2 : Expression <i>in vitro</i> des kératines dans les lignées de la patiente 1369	xxxi
Figure supplémentaire 3 : Taux de croissance des lignées contrôles du CÉO	xxxii
Figure supplémentaire 4 : Suivi tumoral dans les souris SCID suite à des xéno greffes de lignées spécifiques du CÉO.....	xxxiii

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AKT	oncogène viral v-akt du thymome murin (v-akt murine thymoma viral oncogene)
ARN	acide ribonucléique
BOV	tumeur ovarienne bénigne (benign ovarian tumor)
BRAF	homologue B1 de l'oncogène viral v-raf du sarcome murin (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
BRCA1	gène du cancer du sein 1 (breast cancer 1 gene)
BRCA2	gène du cancer du sein 2 (breast cancer 2 gene)
CA125	antigène de cancer 125 (cancer antigen 125)
CÉO	cancer épithélial de l'ovaire (epithelial ovarian cancer, EOC)
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CIPA	Comité institutionnel sur la protection des animaux
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CT	tomodensitométrie (computed/computerized tomography)
COX	cyclooxygenase
DAB	diaminobenzidine
DFS	survie sans maladie (disease-free survival)
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique (ethylene diaminetetraacetate)
EMT	transition épithéliale-mésenchymateuse (epithelial-mesenchymal transition)
FBS	sérum bovin foetal (fetal bovine serum)
FFPE	tissu fixé à la formaline, enrobé de paraffine (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue)
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FLIP	protéine inhibitrice semblable à FLICE (FLICE-like inhibitory protein)
GnRH	gonadolibérine (gonadotrophin-releasing hormone)

FSH	hormone folliculo-stimulante (follicule-stimulating hormone)
G	grade tumoral
HER2	homologue 2 de l'oncogène viral v-erb-b2 de la leucémie érythroblastique (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)
HRT	hormonothérapie de remplacement (hormone replacement therapy)
IHC	immunohistochimie (immunohistochemistry)
IBS	syndrome du côlon irritable (<i>irritable bowel syndrome</i>)
IKK	IkappaB protéine kinase (IkappaB protein kinase)
IL	interleukine (interleukin)
KRT	kératine ou cytokératine (keratin or cytokeratin)
KRAS	homologue de l'oncogène viral v-Ki-ras2 du sarcome de rat Kirsten (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
LH	hormone lutéinisante (luteinizing hormone)
LHRH	gonadolibérine (luteinizing hormone-releasing hormone)
LMP	tumeur à faible potentiel de malignité (low malignant potential tumor; borderline tumor)
MPSC	carcinome micropapillaire séreux (micropapillary serous carcinoma)
MRI	imagerie par résonance magnétique (magnetic resonance imaging)
MyD88	protéine adaptatrice intracellulaire associée aux récepteurs TLR (myeloid differentiation primary response gene (88))
NF-κB	facteur de transcription nucléaire de kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK	lymphocytes/cellules tueuses naturelles (natural killer cell)
NOD	diabétique non obèse (non obese diabetic)
OCT	température optimale de coupe (optimal cutting temperature)
OMS	Organisation mondiale de la santé (World Health Organization, WHO)
OSE	épithélium de surface ovarien (ovarian surface epithelium)
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase (poly (ADP-ribose) polymerase)

PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
PCR	réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PET	tomographie à émission de positrons (positron emission tomography)
PI	inhibiteur de protéases (protease inhibitor)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PCOS	syndrome des ovaires polykystiques (polycystic ovarian syndrome)
PTEN	homologue de phosphate et de tensine (phosphatase and tensin homolog: a human tumor suppressor gene on chromosome 10)
RIN	score de l'intégrité de l'ARN (RNA integrity number)
SCID	immunodéficience combinée sévère (severe combined immunodeficiency)
TOV	tumeur ovarienne invasive (invasive ovarian tumor)
TP53	protéine tumorale de 53 kDa (53 kDa tumor protein; p53)
TRAIL	ligand inducteur d'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale (tumor-necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)
XIAP	protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

REMERCIEMENTS

J'aimerais, tout d'abord, remercier profondément Dre Anne-Marie Mes-Masson, ma directrice de recherche, côté fondamental, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir fourni le nécessaire pour mener à bien mon projet. Je la remercie aussi pour tout le soutien et les conseils qu'elle m'a apportés au cours de mes études en maîtrise. Je remercie également Dre Diane Provencher, ma co-directrice du côté clinique, qui nous a, entre autres, fourni les échantillons de départ pour l'élaboration du présent projet. Je vous remercie toutes deux pour votre temps, coopération et grande générosité.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont collaboré au projet. Je remercie tout particulièrement Lise Portelance qui a veillé à nous fournir les lignées utilisées dans ce projet. Je remercie également Isabelle Létourneau qui m'a plus aidé en début de projet. J'aimerais remercier grandement Philippe Gannon, Cécile Le Page et Michael Quinn pour leur patience ainsi que leurs très bons conseils en cours de route. Un merci tout spécial à Benjamin Péant qui m'a beaucoup aidé en général, surtout lors de la révision du présent manuscrit.

Je tiens à remercier les personnes qui ont fourni du soutien technique et/ou du soutien administratif, comme Kim Leclerc Desaulniers, Jason Madore, Manon de Ladurantaye, Louise Champoux et Suzanna Arcand du laboratoire de Dre Patricia Tonin. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire qui m'ont offert aide et support, de même que les anciens et les nouveaux, qui ont enrichi davantage mon expérience au laboratoire. J'en profite également pour remercier les membres des autres laboratoires, de l'Institut du cancer de Montréal et du Centre de recherche du CHUM, dont j'ai eu la chance de côtoyer.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 L'ovaire normal

1.1.1 L'ovaire : anatomie et structure de base

L'ovaire est une glande sexuelle (ou gonade) du système reproducteur féminin, homologue au testicule mâle. Le système reproducteur de la femme comprend également les trompes de Fallope, l'utérus, et le vagin (Figure 1). L'ovaire a une forme ovale et a l'apparence d'une amande en un peu plus large. Plus précisément, il mesure 3.0-5.0 centimètres de long, 1.5-3.0 centimètres de large, et 0.6-1.5 centimètres d'épaisseur [1], avec un poids qui se situe entre 2 et 4 grammes [2]. Les ovaires sont au nombre de deux, dissimulés dans la région pelvienne de l'abdomen, de part et d'autre de l'utérus (Figure 1). Chacun des ovaires est maintenu en place par des replis péritonéaux du ligament large et par divers ligaments ; le ligament propre de l'ovaire (utéro-ovarien) lie ce dernier directement à l'utérus, le ligament tubo-ovarien (infundibulo-ovarien) le lie à la trompe de Fallope, et le ligament suspenseur de l'ovaire (infundibulo-pelvien) le lie indirectement à la paroi du bassin [1].

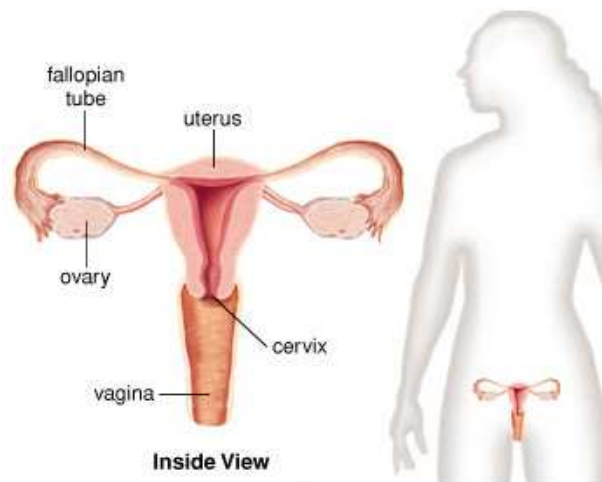


Figure 1 : Le système reproducteur de la femme

(adaptée de [<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/498625/human-reproductive-system>])

Chaque ovaire comporte trois zones distinctes : l'épithélium, la zone médullaire et la zone corticale (Figure 2). L'épithélium de surface ovarien (*ovarian surface epithelium* ou *OSE*) est composé d'une seule couche de cellules cuboïdes et constitue une capsule protectrice entourant l'ovaire. C'est un épithélium simple qui est caractérisé par l'expression des kératines 7, 8, 18 et 19 [3]. Cet épithélium est en continuité avec le péritoine, un tissu recouvrant et reliant entre eux les organes dans l'abdomen. Par ailleurs, une membrane qui provient d'un repli du péritoine, appelée mésovarium, sert de lien entre l'ovaire et la paroi de la cavité abdominale [1].

L'OSE présente de nombreuses microvillosités à sa surface lui permettant de jouer un rôle essentiel dans le transport de molécules et métabolites entre l'ovaire et la cavité péritonéale [2]. De plus, l'OSE renferme des lysosomes dans ses inclusions qui ont pour fonction de produire des enzymes protéolytiques et contribuer à la rupture folliculaire lors de l'ovulation chaque mois [4]. La zone corticale (ou le cortex ovarien), située dans la région périphérique, contient plusieurs follicules à différents stades de maturation (Figure 2) [5]. La zone médullaire, quant à elle, située dans la région centrale, est d'aspect plutôt spongieux et contient du tissu conjonctif largement vascularisé par un réseau complexe de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques (Figure 2) [5].

L'ovaire prend différents aspects au cours d'une vie. Il est lisse de l'enfance jusqu'à la puberté, puis accumule, au cours de l'âge adulte, diverses marques et cicatrices causées par les ovulations répétées et par la dégénérescence des follicules ovariens. Finalement, à la ménopause, où il y a l'arrêt des ovulations, l'ovaire s'atrophie, devient fibreux et plus difficilement discernable.

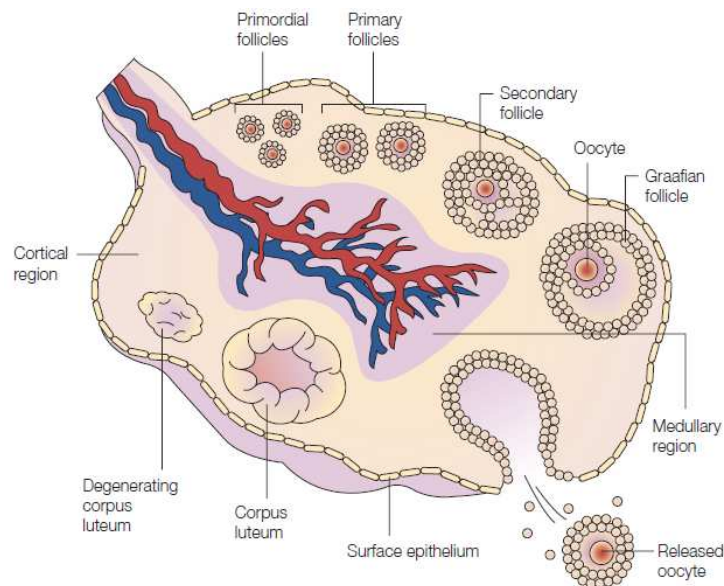


Figure 2 : Structure de l'ovaire humain adulte

Avec la permission de Macmillan Publishers Ltd, de Nature Reviews Cancer [5] © 2005

1.1.2 L'ovaire : double fonctionnalité

L'ovaire est une glande à la fois exocrine et endocrine. La fonction première des ovaires est la production des gamètes appelés ovules ou ovocytes. La seconde fonction, étroitement liée à la première, est la sécrétion d'hormones sexuelles stéroïdiennes, l'œstrogène et la progestérone.

Les ovocytes sont produits dans un processus appelé ovogenèse qui se déroule durant l'embryogenèse. C'est à cette étape de la croissance que les deux millions de follicules ovariens primordiaux sont créés. Un follicule consiste en un ovocyte entouré par des cellules folliculaires, dont le rôle est d'alimenter et protéger l'ovocyte en développement. Au début des cycles menstruels (ou puberté), les ovaires ne possèdent plus que 400 000 follicules, le reste étant résorbés durant l'enfance. Par la suite, chaque mois, certains follicules entament leur cycle de maturation. Plus spécifiquement, les follicules ovariens passent progressivement de follicules primordiaux, en follicules primaires et secondaires pour finalement aboutir en follicules tertiaires matures communément appelés follicules De Graaf (Figure 2) [5]. Lors de l'ovulation, un seul ovocyte est généralement libéré par rupture folliculaire à la surface de l'ovaire et devient ainsi disponible pour la fertilisation. Les follicules en trop dégènèrent et sont réabsorbés par le corps. Dès qu'une femme atteint la ménopause, ses ovaires cessent de libérer des ovocytes et produisent aussi moins d'hormones.

La fonction hormonale de l'ovaire, c'est-à-dire la sécrétion des hormones sexuelles stéroïdiennes, joue un rôle important dans la régulation du fonctionnement de l'ovaire. En effet, l'ovaire est au cœur du cycle ovarien ainsi que du cycle menstruel. Le cycle ovarien (au niveau des ovaires) est rigoureusement régulé, principalement par des hormones sécrétées par l'hypothalamus, par l'hypophyse, ainsi que par les ovaires eux-mêmes, afin de synchroniser la phase folliculaire (le développement et la maturation des follicules ovariens), l'ovulation (l'expulsion de l'ovule par rupture folliculaire) et la phase lutéale (phase post-ovulatoire) (Figure 3). Le cycle utérin (au niveau de l'utérus), communément appelé le cycle menstruel, survient en tandem avec le cycle ovarien et consiste en une série d'évènements (menstruation, phase proliférative et phase sécrétoire) menant à la préparation de la paroi intérieure de l'utérus (l'endomètre) pour une éventuelle implantation d'un ovule fécondé (Figure 3). La phase proliférative (*proliferative phase*) du cycle utérin fait référence à la période correspondante à la fin de la menstruation jusqu'au moment de l'ovulation, où il y a épaissement de l'endomètre. La phase sécrétoire (*secretory phase*), quant à elle, survient entre l'ovulation et le début des menstruations, où des peptides sont sécrétés par des glandes en vue de la fixation possible d'un embryon. Tous les 28 jours en moyenne, si la fertilisation n'a pas lieu, la paroi utérine préalablement préparée est détruite, provoquant l'apparition des saignements menstruels (Figure 3).

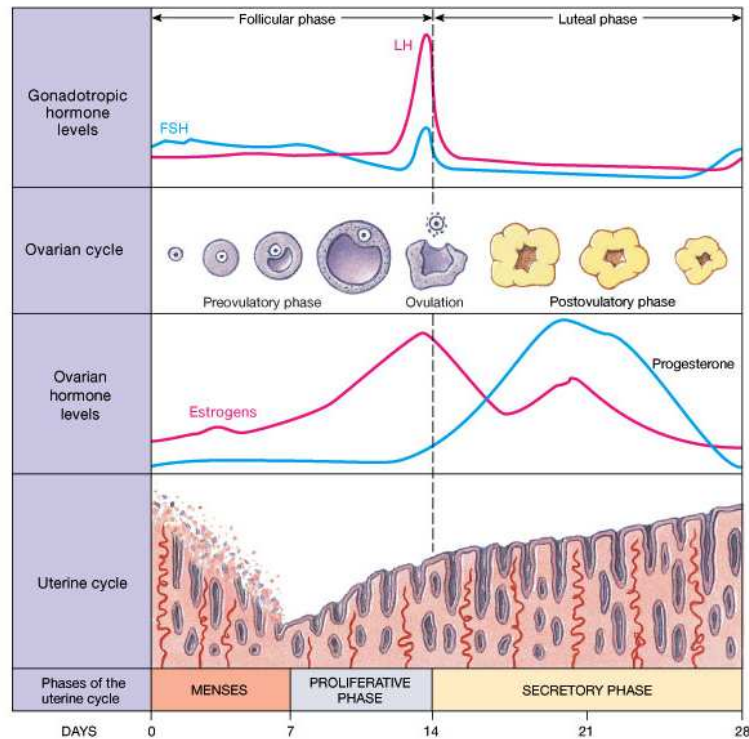


Figure 3 : Les cycles ovarien et utérin

(tirée de [<http://drfiona.whitelotusclinic.ca/2010/03/hormones-and-mood-pms/>])

1.1.3 Contrôle du fonctionnement ovarien

Les principaux messagers chimiques, les hormones, impliqués dans la régulation des cycles ovariens et menstruels incluent l'estrogène et la progestérone, mais également la gonadolibérine (*gonadotrophin-releasing hormone* ou *GnRH*) et les gonadotrophines. Ces dernières incluent l'hormone folliculo-stimulante (*follicule-stimulating hormone* ou *FSH*) et l'hormone lutéinisante (*luteinizing hormone* ou *LH*), des neurohormones sous le contrôle du système hypothalamo-hypophysaire.

Pendant la phase folliculaire, les follicules ovariens synthétisent des estrogènes, plus particulièrement de l'estradiol, et ce, de plus en plus jusqu'à l'ovulation (Figures 3 et 4). Lors de l'ovulation, la synthèse d'estradiol diminue, ce qui enclenche une signalisation au niveau de l'hypothalamus dans le cerveau, menant à une hausse de la production de la GnRH. De fortes quantités de GnRH vont alors stimuler la glande pituitaire antérieure (ou adénohypophyse) pour augmenter la sécrétion de la FSH. Cette dernière provoque la croissance des follicules ovariens, et stimule la synthèse d'estradiol, qui va à son tour réguler positivement la sécrétion de FSH. Les quantités élevées d'estradiol qui en résultent vont stimuler l'hypophyse et entraîner un pic de LH (*LH surge*) qui va induire la maturation ovocytaire et l'ovulation (Figures 3 et 4). La LH en phase

lutéale transforme les follicules inutilisés à l'intérieur de l'ovaire en des structures appelées corps jaunes (*corpus luteum*). Le corps jaune stimulé par la LH synthétise essentiellement de la progestérone, mais aussi de l'estrogène, causant un rétrocontrôle négatif sur la production de la FSH et la LH par l'hypophyse (Figures 3 et 4). La progestérone en grande quantité agit en synergie avec les estrogènes afin de préparer l'endomètre à l'implantation de l'embryon. Les estrogènes sécrétés par les follicules ovariens sont responsables du développement du revêtement intérieur de l'utérus et de l'enrichissement de l'apport sanguin pour l'éventuelle implantation d'un embryon, tandis que les progestérones sécrétées par le corps jaune permettent la fixation de l'embryon à la paroi utérine. S'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune se met à dégénérer et les taux élevés d'estrogènes et de progestérones produits par l'entremise de l'hypothalamus et de l'hypophyse commencent à chuter, alors que les productions de FSH et LH augmentent de nouveau pour permettre le développement de nouveaux follicules ovariens (Figures 3 et 4). Cette dernière étape coïncide avec le début d'un nouveau cycle ovarien. S'il y a fécondation et formation d'un zygote puis implantation de l'embryon, ce dernier va sécréter de la gonadotrophine chorionique (*human chorionic gonadotropin* ou *hCG*) pour maintenir la grossesse. Cette hormone agit comme la LH et a pour effet de stimuler le corps jaune et d'empêcher sa régression et sa dégradation (ou lutéolyse) qui suit normalement une chute du LH.

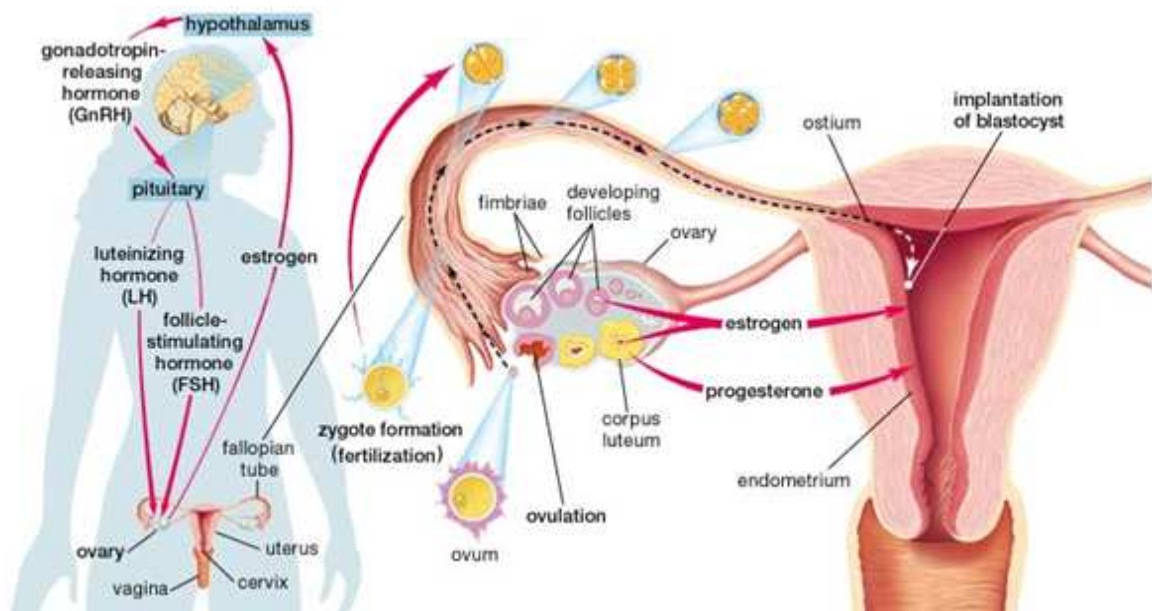


Figure 4 : Contrôle du cycle ovarien

(adaptée de [<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/435788/ovary>])

1.2 L'ovaire anormal

1.2.1 Qu'est-ce que le cancer de l'ovaire?

Le cancer est un terme médical qui désigne un groupe de cellules ayant acquis une transformation et une instabilité génétique lui conférant la capacité de croissance et de prolifération anormales et incontrôlées. Ces cellules anormales possèdent différentes caractéristiques telles que la capacité à produire leurs propres facteurs de croissance (autosuffisance), l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, et/ou l'évasion au processus de mort cellulaire contrôlée appelé apoptose (Figure 5) [6]. De plus, les cellules cancéreuses peuvent acquérir la capacité d'invasion et de destruction de tissus adjacents, avec possibilité de métastases à d'autres endroits du corps via les systèmes sanguins et lymphatiques (Figure 5) [6]. D'autres caractéristiques du cancer peuvent aussi être considérées, telles que l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) (Figure 5) [6], ou bien encore la capacité d'échapper à la surveillance immunologique [7]. L'apparition et la progression du cancer peuvent être attribuables à des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux ou une combinaison de ces facteurs. De plus, plusieurs voies de signalisation peuvent être dérégulées dans un cancer, comme le cycle cellulaire, et la signalisation intracellulaire et extracellulaire, et la signalisation liée aux hormones ou aux facteurs de croissance.

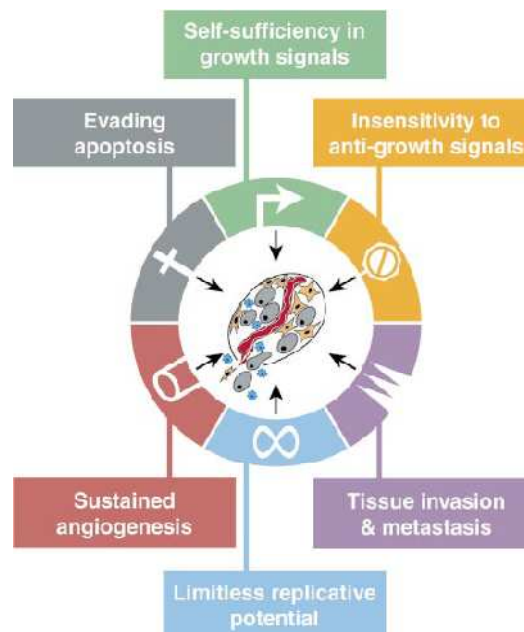


Figure 5 : Les grandes marques du cancer
Avec la permission de Elsevier, de Cell [6] © 2000

Le cancer de l'ovaire fait référence à une tumeur maligne qui atteint soit un ou les deux ovaires. Les cellules cancéreuses ovariennes ont une prépondérance à se détacher aisément de la lésion initiale et à se répandre au niveau du péritoine et des différents organes dans la cavité péritonéale [8, 9]. Ceci explique, entre autres, la découverte souvent tardive de ces cancers qui sont dès lors à un stade évolué, où il y a déjà présence de dissémination tumorale.

1.2.2 Épidémiologie : le cancer de l'ovaire en chiffres

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus létal en Amérique du Nord. Les cancers gynécologiques regroupent les cancers du système reproducteur de la femme (Figure 1), incluant entre autres le cancer de l'endomètre, le cancer de l'utérus, le cancer du col de l'utérus (cervix), et le cancer du vagin. Dans les pays occidentaux, le cancer de l'ovaire se situe au cinquième rang en ce qui concerne le nombre de décès par cause de cancers chez les femmes, et ce, après les cancers du poumon, du sein et du côlon. Au Canada, c'est plus de 2500 femmes qui sont diagnostiquées avec un cancer de l'ovaire et autour de 1700 femmes qui en meurent chaque année. Concrètement, une femme a environ une chance sur 70 de développer la maladie au cours de sa vie. Plus précisément, le cancer de l'ovaire représentera environ 3.0% des nouveaux cas de cancers féminins diagnostiqués au Canada en 2010, ce qui le place au septième rang en termes d'incidence (Figure 6) [10]. Malgré son taux d'incidence assez faible, son taux de mortalité est relativement plus élevé, autour de 4.9%, le plaçant ainsi au cinquième rang des cancers les plus meurtriers chez la femme (Figure 6) [10]. En comparaison, le cancer du sein sera diagnostiqué dans environ 23 200 cas (27.6%) avec plus de 5300 décès (14.8%) annuellement (Figure 6) [10].

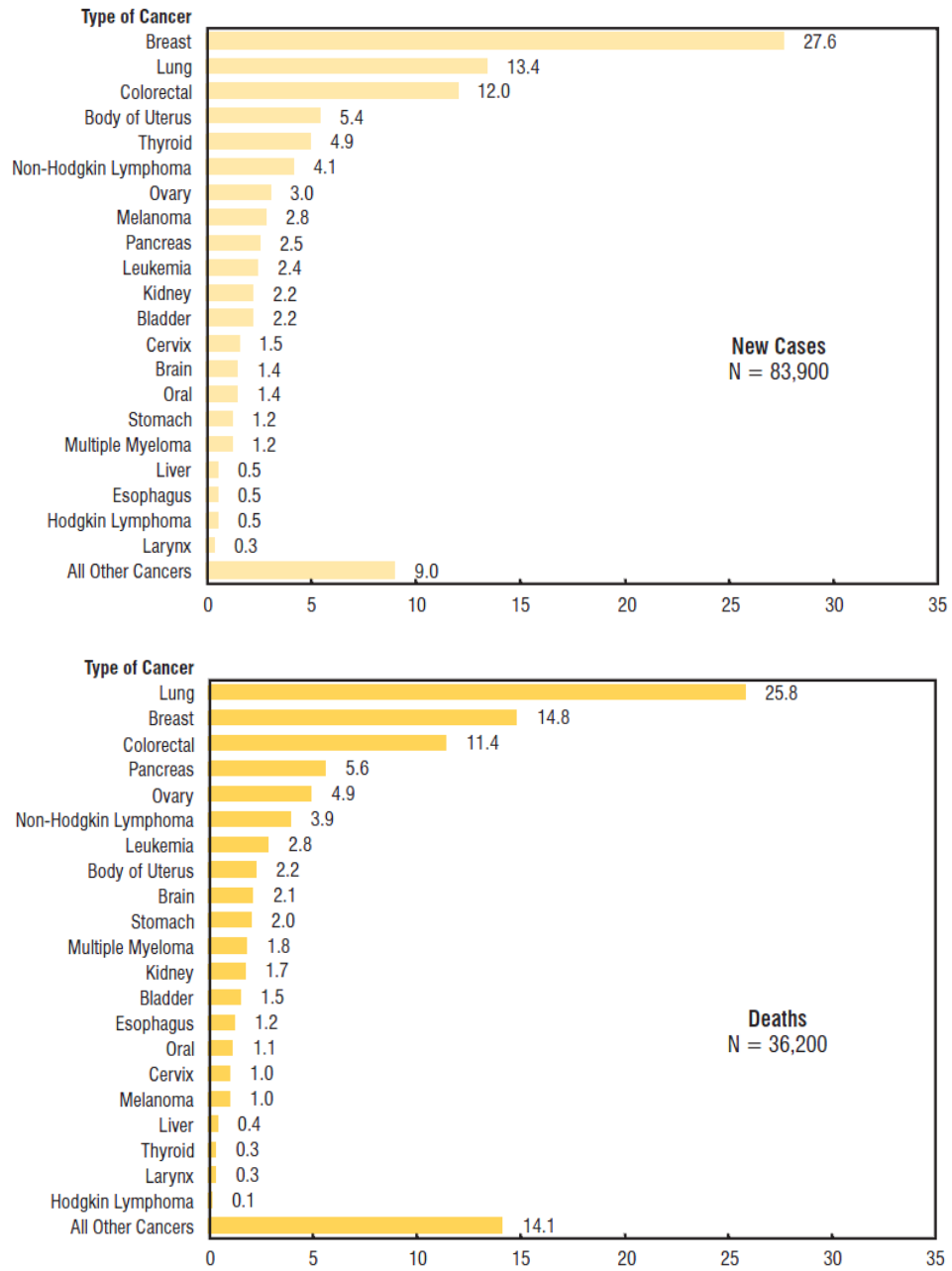


Figure 6 : Distribution en pourcentage des taux d'incidence et de mortalité par cancer chez les femmes au Canada [10]

1.2.3 Les anomalies de l'ovaire : tumeurs et kystes

Les tumeurs de l'ovaire sont des excroissances qui dérivent le plus souvent des cellules épithéliales à la surface de l'ovaire. Ces tumeurs peuvent être bénignes ou bien malignes, et peuvent souvent former des kystes. Un kyste ovarien est une poche ou cavité remplie de substance liquide. Il existe deux formes de kystes : les kystes fonctionnels et les kystes organiques [11].

Les kystes fonctionnels sont les kystes les plus fréquents et se développent en général suite à une stimulation excessive au niveau de l'ovaire lors du cycle menstruel causant une maturation anormale d'un ou de plusieurs ovocytes amenant un follicule ou un corps jaune à se transformer en kyste. Les kystes fonctionnels peuvent apparaître et régresser spontanément au cours de la vie d'une femme, surtout durant la période entre la puberté et la ménopause. Une surveillance échographique s'impose jusqu'à qu'ils aient complètement disparu au bout d'un à trois cycles ovariens. En outre, le syndrome des ovaires polykystiques (*polycystic ovarian syndrome* ou *PCOS*), lié également à un dysfonctionnement hormonal, cause l'apparition de plusieurs petits kystes (polykystique) à la surface ovarienne pouvant entraîner des troubles menstruels, l'hypofertilité ou même la stérilité. Les kystes organiques, quant à eux, ne sont pas dus à un dysfonctionnement hormonal. Ils se caractérisent plutôt par leur nature partiellement liquidienne, par une paroi plus épaisse et par la présence de végétations (ou excroissances intrakystiques) qui ne disparaissent pas spontanément. Les kystes, quels qu'ils soient, peuvent subir des changements au niveau de la morphologie et de la consistance. Ils peuvent grossir, se tordre, se rompre et saigner, et entraîner des complications nécessitant une urgence chirurgicale.

1.2.4 Classification des tumeurs ovariennes : BOV, LMP et TOV

Selon la Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique (FIGO), les trois classes tumorales majeures incluent les tumeurs bénignes (BOV), les tumeurs borderline dites à faible potentiel de malignité (LMP), et les tumeurs invasives (TOV).

1.2.4.1 Les tumeurs bénignes (BOV)

Les tumeurs BOV sont caractérisées par une prolifération épithéliale de l'OSE sans stratification cellulaire [12, 13]. Ces tumeurs ne présentent pas d'atypie cellulaire, ne constituent pas des cancers, et sont alors généralement bénignes et inoffensives [12]. Elles ne sont pas invasives et ne peuvent pas s'étendre à d'autres tissus, ce qui fait en sorte qu'elles peuvent être enlevées avec peu de risque de récurrence. C'est le cas par exemple des kystes fonctionnels et organiques bénins.

1.2.4.2 Les tumeurs borderline (LMP)

Les tumeurs LMP sont des tumeurs à faible potentiel de malignité. Elles présentent une prolifération épithéliale avec stratification sur plusieurs couches, certaines atypies cellulaires et un indice mitotique plus élevé que les tumeurs BOV [13, 14]. Ces tumeurs se développent en général à un âge plus précoce et progressent très lentement. Elles sont souvent limitées aux ovaires et sont liées habituellement à un bon pronostic. Ces tumeurs sont majoritairement bénignes avec certaines caractéristiques malignes, et peuvent à l'occasion progresser et se propager pour envahir d'autres tissus par microinvasions via des implants péritonéaux [15, 16]. Cependant, la survie après le diagnostic de cette classe de cancer ovarien demeure très bonne et peut atteindre 95% sur cinq ans [2].

Depuis une quinzaine d'années, un nouveau sous-ensemble de tumeurs LMP a été décrit puis reconnu par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) : les carcinomes micropapillaires séreux (MPSC) [17]. Les LMP typiques présentent des papilles plus étroites à la base qui se terminent par un bourgeonnement épithélial à l'extrémité, tandis que les MPSC présentent des papilles atypiques de largeur égal sur toute leur longueur [17]. Les MPSCs sont souvent associés à des stades avancés de la maladie avec implants péritonéaux invasifs, ayant donc un plus mauvais pronostic que les LMP typiques [2, 14, 15].

1.2.4.3 Les tumeurs invasives (TOV)

Les tumeurs TOV invasives, quant à elles, sont cancéreuses et plus agressives, pouvant s'étendre au-delà des ovaires et former des métastases à distance. Ces tumeurs sont souvent bilatérales et se caractérisent par de l'invasion stromale avec présence de larges zones nécrotiques [13]. Aussi, elles présentent une prolifération épithéliale avec stratification, un plus grand nombre d'atypies cellulaires et un index mitotique élevé [13]. Ce sont ces tumeurs qui sont les plus létales, avec un taux de survie à cinq ans d'environ 30% [18].

1.2.5 Classification histopathologique

Le cancer de l'ovaire est une maladie hétérogène qui présente une grande diversité de malignités. C'est une maladie de nature complexe qui peut être classée présentement selon sa morphologie et selon son histopathologie.

1.2.5.1 Les types histopathologiques

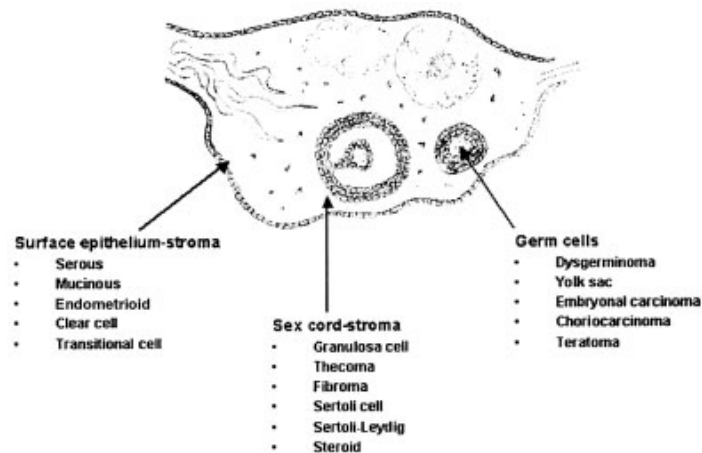


Figure 7 : Origine des trois types de tumeurs ovariennes et leurs sous-types [2]

1.2.5.1.1 Les tumeurs stromales

Les cancers ayant pour origine des cellules stromales ou des cordons sexuels sont dérivés du mésenchyme et peuvent produire des hormones menant au développement de traits masculins ou féminins chez les patientes [2]. Ce sont les plus rares et représentent de 5-10% de toutes les tumeurs malignes de l'ovaire [2]. La plupart de ces tumeurs proviennent des cellules stromales dérivées de la granulosa, avec généralement un bon pronostic à long terme [2].

1.2.5.1.2 Les tumeurs germinales

Les tumeurs des cellules germinales, quant à elles, représentent 10-15% des cancers ovariens [2]. Elles sont dérivées des cellules productrices d'ovocytes, et affectent plus particulièrement les enfants et les jeunes adultes [2].

1.2.5.1.3 Les tumeurs épithéliales

Les tumeurs épithéliales sont les tumeurs ovariennes les plus fréquentes. Il s'agit du type de cancer de l'ovaire prédominant représentant plus de 80% de tous les cas. Il semblerait que ce cancer ait pour origine la surface épithéliale de l'ovaire dérivée de l'épithélium cœlomique [3]. La surface épithéliale de l'ovaire, ou l'OSE, est histologiquement similaire au mésothélium, un épithélium tapissant l'intérieur des cavités au niveau du pelvis et de l'abdomen, également dérivé de l'épithélium cœlomique primitif [2].

1.2.5.2 Les sous-types histopathologiques

Selon l'OMS, il existe une variété de sous-types histologiques tumoraux déterminés selon le tissu auquel les tumeurs s'apparentent le plus. Plus spécifiquement, pour le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO), les sous-types sont : séreux, endométriode, mucineux, à cellules claires, à cellules transitionnelles (ou de Brenner), mixtes, et indifférenciées. Les quatre sous-types histopathologiques du CÉO les plus communs sont décrits ci-dessous.

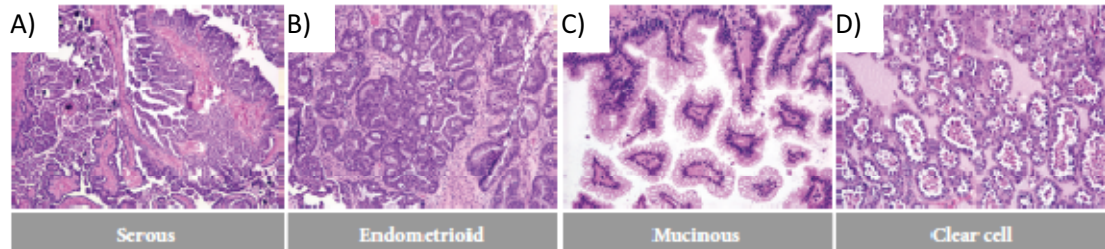


Figure 8 : Les sous-types histologiques majeurs du CÉO [19]. Coupes histologiques de sections tumorales, suite à la coloration H&E, représentatives des quatre sous-types majeurs du cancer ovarien, qui sont respectivement de gauche à droite : séreux, endométriode, mucineux, cellules claires.

1.2.5.2.1 Les tumeurs séreuses

Le sous-type séreux est le plus fréquent et représente plus de 50% des tumeurs épithéliales de l'ovaire, ce qui correspond à plus de 80% de tous les cas de cancers ovariens [2]. Les cellules cancéreuses de type séreux ressemblent à celles qui tapissent la paroi interne des trompes de Fallope (Figure 8A). Dans la majorité des cas, elles sont bénignes et peuvent se présenter sous forme de kystes. Les tumeurs séreuses borderline représentent une plus petite proportion. Par contre, plus du quart des tumeurs de type séreux sont malignes et la majorité d'entre elles sont bilatérales [2].

1.2.5.2.2 Les tumeurs endométrioides

Les tumeurs de sous-type endométriode possèdent des cellules qui s'apparentent à l'endomètre (paroi intérieure de l'utérus) (Figure 8B). Elles représentent environ 10-25% de tous les cancers ovariens [2]. Elles se présentent surtout sous forme maligne et unilatérale, et sont associées à un meilleur pronostic que les tumeurs malignes de sous-type séreux ou mucineux [2].

1.2.5.2.3 Les tumeurs mucineuses

Les tumeurs ovariennes de sous-type mucineux se composent de cellules qui ont l'aspect de cellules de l'épithélium intestinal ou de l'épithélium endocervical (Figure 8C), et représentent environ 5-10% des tous les cas de cancers de l'ovaire [2]. Elles aussi peuvent être bénignes, borderline ou malignes.

1.2.5.2.4 Les tumeurs à cellules claires

Les tumeurs à cellules claires, quant à elles, représentent seulement environ 4-5% de tous les carcinomes de l'ovaire [2]. La plupart de ces tumeurs sont malignes et associées à un taux de survie assez faible. Elles sont caractérisées par des cellules en forme polygonale possédant un cytoplasme riche en glycogènes et lipides (Figure 8D) [20].

1.2.6 Classification par stade et grade

Les tumeurs ovariennes sont également classifiées selon leur grade histologique et leur stade tumoral. Il est important d'assigner correctement le bon stade et le bon grade, car ceux-ci peuvent avoir une conséquence non négligeable sur les décisions concernant les traitements à prescrire pour chaque patiente. Plus précisément, de telles informations peuvent avoir des implications sur le pronostic et la survie de la patiente, et servir en tant qu'indice de prédiction dans la réponse tumorale à certains agents chimiothérapeutiques dans le but de choisir ceux qui conviendraient mieux [21].

1.2.6.1 Le stade

Le stade d'une tumeur de l'ovaire est déterminé souvent suite à une chirurgie effectuée par un gynécologue oncologue. En cancer de l'ovaire, le système de stadification le plus utilisé est la classification FIGO (stades I à IV). La détermination du stade du cancer ovarien permet d'avoir une indication du degré de l'étendue de la tumeur cancéreuse (Figure 9) [5]. Au stade I, la tumeur ovarienne est confinée aux ovaires. Au stade II, il y a extension de la tumeur, par exemple au niveau du bassin, aux trompes de Fallope et à l'utérus. Les stades III et IV constituent des cancers de l'ovaire plus avancés. Au stade III, la tumeur s'étend au-delà du bassin et est accompagnée de métastases intrapéritonéales et extrapelviennes et/ou de métastases aux ganglions lymphatiques. Finalement, au stade IV, la tumeur se propage davantage, et il y a invasion et métastase à distance aux organes plus éloignés. Plus encore, ces quatre stades sont divisés en sous-catégories pour mieux apprécier les détails et précisions sur l'étendue de la maladie (Tableau 1) [22].

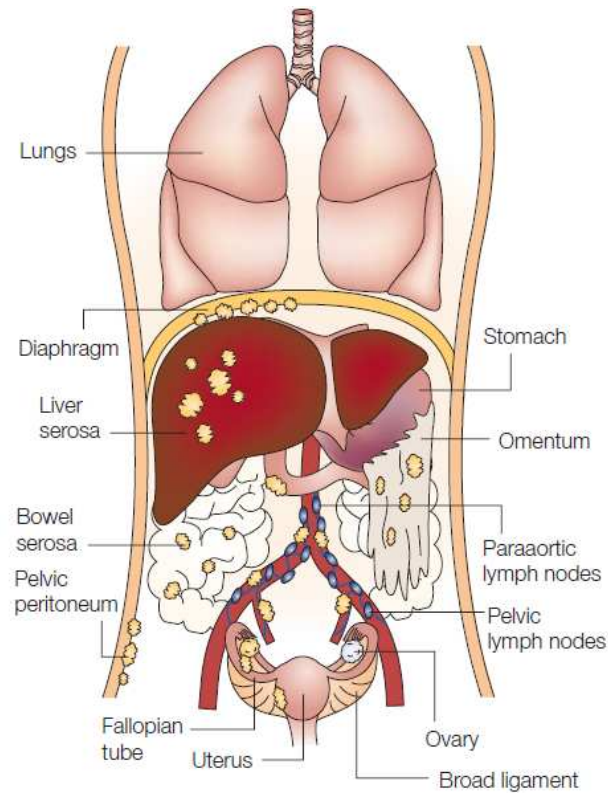


Figure 9 : Patron de dissémination du carcinome ovarien. Au stade précoce de la maladie (stade I), les tumeurs ovariennes (représentées par des masses jaunes sur la figure) sont limitées aux ovaires, la capsule ovarienne est intacte et aucune tumeur n'est observée sur la surface de l'ovaire ou dans le lavage péritonéal. Dès que la capsule ovarienne est rompue, les tumeurs de l'ovaire peuvent s'étendre au-delà de la cavité pelvienne et créer des métastases à proximité et à distance dans le corps. L'affectation lymphatique et la dissémination péritonéale avec production d'ascite sont courantes aux stades évolués du CÉO. Avec permission de Macmillan Publishers Ltd, de Nature Reviews Cancer [5] © 2005

Stade	Description et caractéristiques FIGO
Stade I	Le cancer est confiné aux ovaires
IA	La tumeur est limitée à un seul ovaire, avec capsule intacte, et absence de tumeur à la surface ovarienne et absence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavage péritonéal
IB	La tumeur est présente dans les deux ovaires, avec capsule intacte, et absence de tumeur à la surface ovarienne et absence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavage péritonéal
IC	La tumeur est limitée à un ou deux ovaires, avec en plus une des caractéristiques suivantes : capsule rompue, présence de tumeur sur la surface ovarienne, présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le lavage péritonéal
Stade II	Le cancer implique un ou les deux ovaires avec extension et/ou implants dans la région pelvienne, soit à l'utérus, aux trompes, à la vessie, au côlon ou au rectum
IIA	La tumeur implique un ou les deux ovaires avec extension pelvienne à l'utérus et/ou aux trompes de Fallope, et avec l'absence de cellules malignes dans l'ascite et dans le lavage péritonéal
IIB	La tumeur implique un ou les deux ovaires avec extension pelvienne à d'autres tissus et organes de la cavité pelvienne, et avec l'absence de cellules malignes dans l'ascite et dans le lavage péritonéal
IIC	La tumeur implique un ou les deux ovaires avec extension pelvienne (IIA ou IIB), en plus de la présence de cellules malignes dans l'ascite et dans le lavage péritonéal
Stade III	Le cancer implique un ou les deux ovaires et s'est propagé au-delà du pelvis, avec des métastases confirmées à l'extérieur de la région pelvienne, jusqu'à l'abdomen ou au péritoine et/ou aux ganglions lymphatiques proximaux
IIIA	La tumeur implique un ou les deux ovaires avec métastase péritonéale microscopique au-delà de la cavité pelvienne
IIIB	La tumeur implique un ou les deux ovaires avec métastase péritonéale macroscopique au-delà de la cavité pelvienne, mesurant 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension
IIIC	La tumeur implique un ou les deux ovaires avec métastase péritonéale macroscopique au-delà de la cavité pelvienne, mesurant 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension, avec ou sans dissémination tumorale régionale aux ganglions lymphatiques
Stade IV	Ceci est la forme de cancer de l'ovaire le plus avancé, avec présence de métastase à distance aux organes à l'extérieur de la région pelvienne tels que le foie, la rate ou les poumons

Tableau 1 : La stadification du cancer de l'ovaire selon la FIGO (adapté de [22])

1.2.6.2 Le grade

Le grade (G) est assigné suite à l'examen histopathologique et permet l'évaluation de la progression tumorale, en donnant une indication du degré de différenciation et de malignité des cellules tumorales, soit du plus différencié à faible malignité au moins différencié à malignité élevée (G0 à G3). Plusieurs systèmes d'assignation de grades ont été utilisés par des pathologistes pour classer les tumeurs de l'ovaire, toutefois des problèmes de reproductibilité, de cohérence et de constance y sont fréquemment observés [21]. Le nouveau système universel, proposé et validé par la FIGO, inclut trois critères principaux : l'architecture histologique, le polymorphisme nucléaire et l'activité mitotique [21]. L'architecture histologique est évaluée en assignant à la tumeur un score qui varie de 1 à 3 selon la morphologie prédominante rencontrée (1= glandulaire, 2= papillaire, ou 3= solide). De manière similaire, le polymorphisme nucléaire est évalué selon l'importance d'atypies nucléaires, correspondant également à un score variant de 1 à 3. Finalement, l'activité mitotique est évaluée selon un indice mitotique du plus faible au plus élevé pour un score de 1 à 3 respectivement. Par la suite, les scores sont cumulés afin d'assigner à la tumeur un grade qui se situe sur une échelle unitaire de 0 à 3. Un score totalisant 3-5 équivaut à un grade 1 (G1), celui totalisant 6-7 équivaut à un grade 2 (G2), tandis que celui totalisant 8-9 équivaut à un grade 3 (G3).

Nous pouvons ainsi attribuer les différents grades aux tumeurs invasives (G1-G3). Plus encore, les tumeurs invasives peuvent être davantage séparées selon leur grade [21, 23]. De plus en plus, les tumeurs invasives y sont classées dans deux catégories distinctes, soit 'bien différencié' ou bas grade (G1), soit 'modérément ou faiblement différencié' ou haut grade (G2 et G3) [24, 25]. Le grade 0 (G0), quant à lui, correspond à une tumeur borderline qui est bien différenciée, et dont les cellules sont semblables morphologiquement aux cellules normales de l'ovaire [26].

1.2.7 Étiologie du cancer de l'ovaire

1.2.7.1 Les facteurs de risques

Les causes du cancer de l'ovaire demeurent mal connues. Cependant, certaines observations ont été mises en avant, dont l'âge, l'alimentation et les habitudes de vie, des facteurs liés aux hormones et à l'activité de reproduction, et des facteurs familiaux et héréditaires.

1.2.7.1.1 L'âge, l'alimentation et les habitudes de vie

Le risque de développer un cancer de l'ovaire augmente généralement avec l'âge. Plus spécifiquement, le taux d'incidence augmente à chaque tranche de 10 ans jusqu'à 75-80 ans [27]. Néanmoins, peu d'entre eux surviennent avant l'âge de 40 ans [28], à l'exception des formes héréditaires de la maladie. Une grande consommation de graisses et de protéines animales et/ou l'obésité augmenteraient le risque de développer la maladie. À l'opposé, l'activité physique et la consommation de fruits et légumes en diminueraient le risque [29, 30]. Les agents infectieux et divers polluants pourraient également constituer des facteurs de risque liés à l'inflammation [3]. Par exemple, les femmes fumeuses ont un plus grand risque de développer des tumeurs mucineuses, au niveau des cellules sécrétrices de mucus [31, 32]. L'utilisation dans la région génitale de poudre de talc, un cosmétique composé de minéral de silicate similaire à l'amiante, a aussi été évoquée comme facteur de risque [33-35].

1.2.7.1.2 Les facteurs de risque liés aux hormones et à l'activité de reproduction

Il y aurait un rapport entre la fréquence d'ovulation et l'apparition du cancer de l'ovaire [36, 37]. Plus le nombre d'ovulations est élevé, plus les risques de développer la maladie sont élevés. Ceci peut s'expliquer par le fait que chaque mois, lors de l'ovulation, l'épithélium de l'ovaire subit un traumatisme lors de la rupture du follicule pour libérer l'ovocyte et doit donc être réparé et cicatrisé à répétition, augmentant à chaque fois les risques d'induction de la carcinogenèse. Les risques de développer un cancer ovarien sont alors plus grands pour les nullipares ou les femmes n'ayant pas eu de grossesses, ainsi que pour celles ayant une puberté (apparition des premières menstruations) précoce ou une ménopause (cessation permanente des menstruations) tardive. De plus, les risques de développer ce cancer pourraient également augmenter avec l'utilisation encore controversée des traitements hormonaux substitutifs ou de l'hormonothérapie de remplacement (*hormone replacement therapy* ou *HRT*) contre l'infertilité ou les effets de la ménopause. Par contre, le nombre de grossesses menées à terme, l'allaitement et la prise de contraceptifs oraux, périodes durant lesquelles il n'y a pas d'ovulations, en diminueraient les risques.

1.2.7.1.3 Les facteurs familiaux et héréditaires

Les prédispositions génétiques peuvent influencer sur le développement du cancer de l’ovaire. Entre 5-10% de ces cancers ont une origine héréditaire et surviennent généralement à un âge plus précoce [38]. Autrement dit, certains cancers ovariens sont associés à des mutations dans la structure génétique des cellules du corps humain et peuvent se transmettre d’une génération à une autre. Une famille peut donc être porteuse d’une anomalie chromosomique commune sur des gènes particuliers, notamment *BRCA1* et *BRCA2*, deux suppresseurs de tumeurs associés à certains cancers du sein et de l’ovaire [39-42]. Une femme dont la mère, une fille ou une sœur est atteinte d’un cancer de l’ovaire court un plus grand risque de développer la maladie. De plus, l’incidence pour ce cancer est plus élevée pour les Caucasiennes dans les pays occidentaux, plus particulièrement pour les femmes d’origine ethnique juive, surtout celles de descendance Ashkénaze [43]. L’association de plusieurs cancers dans la famille, tels que le cancer du sein, de l’utérus, de l’ovaire ou du côlon, pourrait aussi entraîner un risque accru de développer un cancer de l’ovaire. Les femmes ayant certains antécédents familiaux pourraient se voir proposer une analyse de leur séquence ADN pour la recherche d’une anomalie chromosomique et pourraient même éventuellement se voir proposer une opération prophylactique ou préventive, telle qu’une ablation bilatérale des ovaires avec ligature des trompes de Fallope (salpingo-ovariectomie) avec ou sans ablation de l’utérus (hystérectomie totale).

1.2.7.2 Le cancer épithélial de l’ovaire et ses origines

L’hypothèse généralement acceptée est que le cancer de l’ovaire provient de la transformation et la prolifération des cellules épithéliales à la surface de l’ovaire (OSE), ou bien de ses invaginations ou kystes d’inclusion [3, 44, 45]. Cette hypothèse se base principalement sur le fait que la rupture et le remodelage répétitifs de la surface épithéliale de l’ovaire lors de l’ovulation pourraient former des lésions précurseurs du cancer ovarien via un processus de réparation, qui peut impliquer certaines transitions épithéliales-mésenchymateuses [36, 46]. Une hypothèse plus controversée suggère que le cancer de l’ovaire se forme et se développe par une progression en continuum entre les tumeurs bénignes, les tumeurs borderline et les tumeurs invasives (BOV-LMP-TOV) [13]. Cependant, puisque le cancer de l’ovaire est très complexe de par sa nature et son évolution, il peut en fait comprendre plusieurs maladies distinctes les unes des autres [21, 47]. Par ailleurs, il se peut que les tumeurs se développent *de novo* à des sites divers pour ensuite progresser au niveau des ovaires. Ces tumeurs, aussi appelées tumeurs de Krukenberg, correspondent à des tumeurs secondaires métastatiques dont le site primaire est autre que

l'ovaire [48]. Il existe en fait d'autres sites d'origine possibles du CÉO, tels que la trompe de Fallope ou bien encore le péritoine. Certains chercheurs suggèrent la possibilité que les trompes de Fallope soient à l'origine de certains cancers de l'ovaire. En effet, les analyses microscopiques et histologiques montrent que les cancers des trompes de Fallope s'apparentent à ceux des cancers épithéliaux de l'ovaire de type séreux (Figure 8A), et ceux-ci semblent avoir le même comportement tumoral ainsi que le même pronostic. En fait, le tissu de la paroi intérieure des trompes de Fallope et celui de la surface de l'ovaire sont dérivés du même tissu embryologique : l'épithélium cœlomique [3]. Par ailleurs, pour certaines femmes ayant des mutations aux gènes *BRCA1/2* et considérées comme prédisposées à développer un cancer de l'ovaire, il leur est recommandé de subir, à titre préventif, une ablation des ovaires ainsi que celle des trompes utérines (salpingo-ovariectomie bilatérale). L'examen détaillé des structures prélevées lors de ces opérations a permis de révéler certaines anomalies liées aux événements précoces de la carcinogenèse, ce qui ne peut se faire avec les cancers ovariens non génétiques (sporadiques) qui ne sont détectés souvent que tardivement dans la progression de la maladie. Des scientifiques ont ainsi pu déceler des lésions précancéreuses au niveau des trompes de Fallope, plus précisément aux extrémités des trompes (*fimbriae*) en contact avec l'ovaire [49, 50]. Ces découvertes nous laissent croire que le cancer de l'ovaire pourrait dériver des trompes de Fallope lorsque des mutations *BRCA* sont impliquées. Certaines études semblent aussi indiquer qu'il pourrait y avoir un avantage de survie pour les patientes ayant subi la résection complète des trompes de Fallope en même temps que celles des ovaires lors d'une hystérectomie prophylactique, une procédure qui pourrait procurer un effet protecteur contre le cancer épithélial ovarien de type séreux, celui qui correspond au plus agressif et létal des cancers de l'ovaire.

1.2.8 Le cancer de l'ovaire au niveau clinique

1.2.8.1 Les manifestations : signes et symptômes

Au début de la maladie, les signes et symptômes peuvent souvent être vagues et considérés comme anodins : fatigue constante, prise ou perte de poids, ballonnements et flatulences, troubles de menstruations ou saignements vaginaux en dehors des règles, douleurs pelviennes ou sensation de pesanteur au niveau de l'abdomen, compression vésicale ou rectale entraînant des troubles urinaires, et troubles digestifs tels que la constipation, la diarrhée, et des nausées. Les problèmes cliniques mentionnés ci-dessus sont non spécifiques et souvent associés et confondus à tort à d'autres affectations, maladies, et pathologies plus courantes. Par exemple, il est commun pour des patientes présentant des symptômes du cancer de l'ovaire au niveau digestif de recevoir

un diagnostic initial du syndrome du côlon irritable (*irritable bowel syndrome* or *IBS*). Des erreurs de diagnostic de ce genre peuvent retarder le diagnostic du cancer de l’ovaire et peuvent avoir des conséquences dramatiques quant aux chances de survie de la patiente concernée. Le fait est que les signes cliniques du cancer de l’ovaire apparaissent souvent que lorsque la maladie se trouve déjà à un stade avancé, où le taux de survie est plutôt faible. Le cancer de l’ovaire peut alors se manifester par un gonflement de l’abdomen dû à un épanchement d’ascite ou à la présence d’un kyste pathologique volumineux, par des métastases révélatrices et par des altérations significatives de l’état général de la patiente.

1.2.8.2 Le dépistage et le diagnostic

À cause de la méconnaissance de ses symptômes annonciateurs, de sa symptomatologie tardive et non spécifique ainsi que de la relative inaccessibilité des ovaires à l’examen physique, le cancer de l’ovaire est considéré comme une maladie redoutable souvent diagnostiquée tardivement, où les chances de survie sont plutôt faibles. En fait, c’est seulement 25-30% des femmes atteintes qui sont diagnostiquées à un stade précoce, lorsque la tumeur cancéreuse est encore limitée à l’ovaire, et où le taux de survie à cinq ans est aux environs de 90% [51]. Une grande majorité des femmes présentant un cancer de l’ovaire, environ 70%, sont donc diagnostiquées à un stade avancé (III/IV) de la maladie [22], où le taux de survie à cinq ans chute aux environs de 30% [51]. Il n’est donc pas étonnant que le cancer de l’ovaire soit reconnu comme étant ‘la maladie silencieuse’ ou bien encore ‘la maladie sournoise’. En outre, il n’existe à ce jour aucun test de dépistage systématique spécifique et sensible de cette maladie. Les femmes plus à risque devraient néanmoins être examinées et suivies plus régulièrement par leurs médecins, plus particulièrement pour les femmes ayant des antécédents familiaux et une prédisposition héréditaire impliquant les mutations aux gènes *BRCA 1/2* [41].

Les circonstances de la découverte d’un cancer de l’ovaire sont variées et la plupart des détections cliniques de cette maladie se font de façon fortuite lors d’un examen médical souvent pour un autre type de pathologie. Un examen gynécologique de routine incluant le toucher vaginal et pelvien, une échographie (examen aux ultrasons) pelvienne et abdominale ou une échographie endovaginale pourraient aider à déceler la maladie, ou du moins, à rechercher des caractéristiques qui pourraient orienter le clinicien vers la présence d’un cancer : taille, forme, contenu de la tumeur (solide ou liquidien), épaisseur de la paroi et présence ou non de végétations intrakystiques. Des examens complémentaires peuvent inclure la prescription d’une radiographie pulmonaire pour vérifier la présence de métastases aux poumons, d’une tomographie par

émissions de positrons (*PET scan*), d'une tomodensitométrie (*CT scan*) ou d'une imagerie par résonance magnétique (*MRI scan*) de la région pelvienne et de l'abdomen pour déterminer l'étendue tumorale [52]. De plus, des biopsies de tumeurs et/ou des échantillons de fluides peuvent être prélevés (e.g. par frottis, excision tumorale, collecte d'ascites ou lavage péritonéal), puis envoyés au laboratoire pour analyse histopathologique par des pathologistes spécialistes. Une exploration radiologique du côlon ou un examen coloscopique peut aider dans la détection de métastases secondaires au côlon, et par la même occasion aider dans l'élimination de la possibilité de cancer primaire au côlon. Plus encore, la laparoscopie (par petites incisions) ou la laparotomie plus invasive (à ventre ouvert) sont de plus en plus recommandées dans le contexte d'une exploration chirurgicale pour mieux évaluer l'évolution du cancer ovarien.

De plus, le dosage de marqueurs tumoraux, notamment le CA125 (*Cancer Antigen 125*), à partir du plasma sanguin pourrait donner une indication quant à la présence du cancer de l'ovaire. En fait, le CA125 du sérum constitue l'unique marqueur actuellement utilisé en clinique pour la surveillance médicale en cancer de l'ovaire. Le CA125 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, qui est présente à la surface des cellules et est dérivée de l'épithélium cœlomique [53, 54]. C'est donc aussi un marqueur de différenciation épithéliale. Le CA125 n'est pas généralement exprimé à la surface de l'OSE, mais les cellules cancéreuses de l'OSE peuvent acquérir des caractéristiques épithéliales suite à une différenciation de type pathologique, et ainsi sécréter du CA125 en grandes quantités [3]. Toutefois, les cancers ovariens au stade précoce, de même que certains des cancers ovariens plus avancés, peuvent être associés à un taux de CA125 normal (<35U/ml). Le CA125 est élevé (>35U/ml) dans environ 50% des patientes atteintes de cancers ovariens de type séreux au stade I et dans environ 90% des patientes aux stades plus avancés de la maladie [55]. Le CA125 varie énormément selon le cycle ovarien et autres facteurs physiologiques lors de conditions bénignes ou d'évènements biologiques tels que menstruation et grossesse [56]. Il existe également d'autres sources de variabilité du niveau de CA125, comme la variabilité biologique individuelle chez différentes femmes ou la variabilité dans différentes méthodes du dosage, contribuant ainsi à un large éventail possible de faux positifs et de faux négatifs lors de l'interprétation du taux de CA125. L'analyse sanguine du CA125 n'est donc généralement pas très fiable, et ne peut servir qu'à titre indicatif, seulement lorsqu'elle est accompagnée d'autres examens pour le dépistage et le diagnostic du carcinome ovarien chez des femmes présentant des symptômes persistants.

1.2.8.3 Le traitement : chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie

La prise en charge des patientes se fait en fonction du diagnostic et comporte généralement une cytoréduction chirurgicale. Dans le cas de kystes qui nécessitent une opération, les ovaires seront préservés dans la mesure du possible chez les jeunes femmes en âge de procréer (approche conservatrice), tandis qu'ils seront en général enlevés avec le kyste chez les femmes proches de la ménopause ou ménopausées. Une surveillance régulière s'ensuivra par la suite. Dans le cas de tumeurs cancéreuses, il y a recours à une résection chirurgicale la plus optimale possible, où le maximum de tumeurs et de greffes cancéreuses, si présentes dans l'abdomen (péritoine, côlon, intestin), seront enlevées.

La chimiothérapie est un complément systématique de la chirurgie dans la majorité des cas de cancers de l'ovaire. Elle est souvent prescrite avant et/ou après le traitement chirurgical dans le CÉO. Nous verrons ceci plus en détail dans la section 1.3.

La radiothérapie, quant à elle, consiste en un traitement de consolidation par irradiation de l'abdomen comme complément à l'association chirurgie-chimiothérapie en cas de vestiges tumoraux. Aujourd'hui, cette méthode est moins utilisée, même avec les cancers ovariens de stades avancés, en raison de ses possibles effets néfastes majeurs et des résultats semblables ou meilleurs obtenus avec la chimiothérapie.

1.2.8.4 Le suivi et le pronostic

Les patientes sont suivies régulièrement lors de divers examens gynécologiques, d'échographies et de dosage du CA125 sérique [57, 58]. Même si le CA125 n'est pas un marqueur de dépistage assez sensible et spécifique pour le CÉO, il est utile et valorisé pour le suivi post-traitement (après une opération chirurgicale et/ou une chimiothérapie), pour la détection de récurrences et pour la détermination de la progression de la maladie. En d'autres termes, il est utile dans la détermination de la réponse à la cytoréduction chirurgicale et à la chimiothérapie. Cependant, il ne contribue pas à la stadification du cancer. Par exemple, si le taux de CA125 est élevé avant la chirurgie ou la chimiothérapie puis diminue significativement par la suite, c'est que ces traitements ont fonctionné. La majorité des patientes atteintes d'un adénocarcinome de type séreux répondent à la chimiothérapie en début du traitement (environ 70%), mais pas celles atteintes du carcinome à cellules claires [59, 60]. En fait, les carcinomes à cellules claires ont la particularité d'avoir un indice mitotique faible, les rendant relativement résistants à la thérapie à base de platine en association à un mauvais pronostic [60, 61]. Les efforts se sont alors concentrés

sur l'amélioration de l'efficacité des traitements de première ligne afin d'éviter les rechutes, en éradiquant les tumeurs résiduelles résistantes à la chimiothérapie : intensification des traitements chimiothérapeutiques de première ligne, addition de nouveaux médicaments anticancéreux à la thérapie standard, continuation de la thérapie standard sous forme de thérapie de consolidation ou de thérapie de maintenance [62-65]. La thérapie de consolidation est un traitement à court terme qui a pour but de consolider la réponse à la thérapie initiale. La thérapie de maintenance, quant à elle, consiste à administrer une dose moins élevée de chimiothérapie sur une plus longue période (6 cycles ou plus) et sert à maintenir la période exempte de maladie (*disease free period* ou *DFP*) le plus longtemps possible. Malgré une bonne réponse à la chimiothérapie initiale, la menace de chimiorésistance demeure réelle, avec une reprise de la maladie souvent létale chez la plupart des patientes.

1.3 La chimiothérapie et la chimiorésistance

1.3.1 Qu'est-ce que la chimiothérapie?

La chimiothérapie est une méthode de traitement systémique puissante, faisant usage de médicaments ou drogues cytotoxiques pour la destruction de la tumeur et la limitation de la croissance et de la propagation des cellules cancéreuses dans le corps. Avant la chirurgie, la chimiothérapie peut servir à réduire la masse tumorale pour faciliter son enlèvement par la suite, ou elle peut être proposée dans le cas où la chirurgie réductionnelle n'est pas envisageable (chimiothérapie néoadjuvante). Après la chirurgie, la chimiothérapie sert à détruire les cellules tumorales résiduelles, à gérer et réduire les symptômes associés au cancer, ainsi qu'à prévenir un risque sérieux de récurrence ou de métastase (chimiothérapie adjuvante). Le dosage, la fréquence, et le choix des drogues chimiothérapeutiques sont déterminés selon certains facteurs incluant le type du cancer, l'évolution du cancer, l'âge et l'état général de la patiente. Souvent, c'est une combinaison de drogues qui est administrée soit par la voie intraveineuse, la voie intrapéritonéale, la voie buccale ou la voie intramusculaire pour produire la meilleure réponse possible chez la patiente. La chimiothérapie est plus efficace pour tuer les cellules qui se multiplient plus rapidement. Cependant, elle ne distingue pas les cellules cancéreuses des cellules saines et inflige certains dommages collatéraux aux cellules saines du corps entraînant l'apparition de divers effets secondaires. Les cellules normales qui se divisent naturellement plus rapidement sont donc les plus souvent affectées par la chimiothérapie, et celles-ci incluent les cellules du sang, les cellules de la bouche, de l'estomac et des intestins, ainsi que les follicules pileux. Les effets secondaires qui en résultent peuvent donc inclure une chute des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes, des plaies buccales, des nausées, des diarrhées, et une perte de cheveux ou autres poils. Selon le type de chimiothérapie, ces effets se manifestent à différents degrés pour différentes patientes, et peuvent également inclure l'épuisement (asthénie), des troubles gastro-intestinaux, des douleurs abdominales, et la neuropathie. Néanmoins, ceux-ci peuvent être réversibles et se résorber après un certain temps suite à l'interruption ou la fin des traitements de chimiothérapie.

1.3.2 Chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire

Dans le cas du cancer épithélial avancé de l'ovaire, la chimiothérapie de première ligne constitue un standard suite à une exérèse tumorale initiale. Le régime de drogues de première ligne préconisé consiste en une combinaison de drogues à base de platine, comme la carboplatine ou la cisplatine, et avec des drogues à base de taxane, comme du paclitaxel (Taxol) ou du docétaxel. Puisque le principe de la chimiothérapie est de cibler le plus possible les cellules tumorales sans trop endommager les cellules normales, le dosage, la fréquence et le temps d'administration doivent être déterminés pour une attaque optimale des cellules cancéreuses. De plus, des séances de repos sont nécessaires pour permettre aux cellules normales endommagées de s'autoréparer et à la patiente de récupérer. C'est pourquoi les médicaments de chimiothérapie sont administrés selon des schémas établis par diverses études cliniques. Par exemple, dans le cancer de l'ovaire, la chimiothérapie de première ligne consiste souvent en 6 cycles de Taxol/carboplatine séparés par intervalles de trois ou quatre semaines [66].

1.3.2.1 Le paclitaxel

Le paclitaxel (nom générique), plus communément connu sous le nom de Taxol (nom commercial), est une substance anticancéreuse liquide dont la voie d'administration est par perfusion intraveineuse. La découverte du paclitaxel a été faite suite au vaste programme de recherche du *National Cancer Institute* amorcé dans les années 1960. Ce programme visait à analyser et étudier les propriétés anticancéreuses d'extraits de plantes du monde entier. Le paclitaxel a été isolé la première fois en 1971 à partir de l'écorce d'une plante conifère appelée l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) ou l'if de l'Ouest [67]. L'if est une plante alors connue pour la toxicité de ses feuilles et de son écorce. Durant les années 1980, afin de préserver les ifs qui ne contiennent du paclitaxel qu'en infime quantité pour des fins thérapeutiques (100mg/kg), ce composé a été rendu disponible sous forme semi-synthétique, dérivé à partir de son précurseur qui s'accumule dans les feuilles de l'if. Plus encore, la synthèse complète du paclitaxel depuis 1998 permet désormais son approvisionnement commercial sur une plus grande échelle.

Le paclitaxel fait partie de la classe des taxanes, tout comme le docétaxel, et sert en tant qu'inhibiteur mitotique. Contrairement à plusieurs agents anticancéreux, le paclitaxel n'agit pas directement sur la synthèse de l'ADN, mais plutôt sur la polymérisation des microtubules. Les microtubules, composés d'un assemblage de dimères de tubulines, font partie de la machinerie de la cellule pour la division et la répllication cellulaire. Les microtubules jouent un rôle important dans la forme et l'intégrité de la cellule, dans la migration de certains métabolites intracellulaires,

et plus important encore, dans la formation du fuseau mitotique pour la migration du matériel génétique le long des filaments lors de la division cellulaire [68]. Le paclitaxel inhibe la division des cellules et, par conséquent, la multiplication des cellules tumorales dont la croissance est plus rapide. Ce produit stabilise les microtubules, en empêchant ces derniers de se dépolymériser après la mitose (en phase M) du cycle cellulaire (Figure 10). De plus, le paclitaxel induit et accélère la polymérisation des microtubules juste avant la mitose, lors de la phase G2 du cycle cellulaire (Figure 10). La réorganisation du cytosquelette de microtubules par le paclitaxel va alors bloquer les cellules en phases G2 (*Gap Phase 2*) et M (*Mitosis*), entraînant la mort cellulaire par apoptose. Le mécanisme d'action du paclitaxel permet à celui-ci d'offrir une efficacité satisfaisante avec une toxicité tolérable actuellement bien contrôlée en clinique. En effet, le traitement par cette substance anticancéreuse donne des résultats assez remarquables, plus particulièrement dans les cancers de l'ovaire et du sein ainsi que dans des cancers devenus chimiorésistants [69, 70].

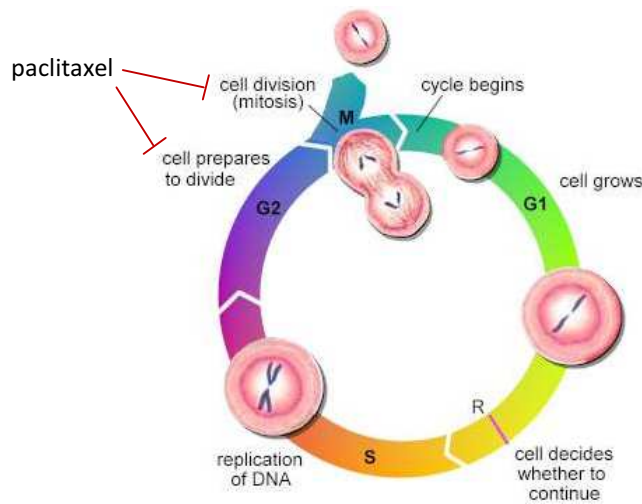


Figure 10 : Cycle cellulaire et action du paclitaxel. Le paclitaxel agit sur le cycle cellulaire, en causant un blocage en G2/M. Adaptée avec permission, de [http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cell_cycle.html]

1.3.2.2 La carboplatine

La carboplatine (nom générique) ou la Paraplatine (nom commercial) est un agent alkylant aux propriétés anticancéreuses, servant surtout dans le traitement du cancer ovarien mais aussi d'autres types de cancers. Comme le Taxol, elle est le plus souvent administrée par voie intraveineuse. La carboplatine fait partie de la famille des médicaments à base de platine. Ce produit interagit avec l'ADN pour inhiber la division cellulaire et causer la mort cellulaire, en formant des liens covalents avec l'ADN indépendamment de la phase du cycle cellulaire (Figure 10). C'est une drogue de deuxième génération et analogue à la cisplatine, sa parente (Figure 11) [71]. Malgré le fait que la carboplatine et la cisplatine sont toutes deux des alkylants, la carboplatine diffère par sa plus grande taille, ce qui rend sa dégradation plus lente. Autrement dit, la carboplatine demeure dans le corps plus longtemps que son analogue, avec une demi-vie de 30 heures plutôt que de 3 heures [71]. Moins de carboplatine est donc nécessaire lors du traitement comparativement à la cisplatine, réduisant ainsi la formation de sous-produits toxiques. Son plus grand désavantage cependant est la chute drastique des taux de globules blancs, causant une susceptibilité accrue pour les infections et autres complications associées.

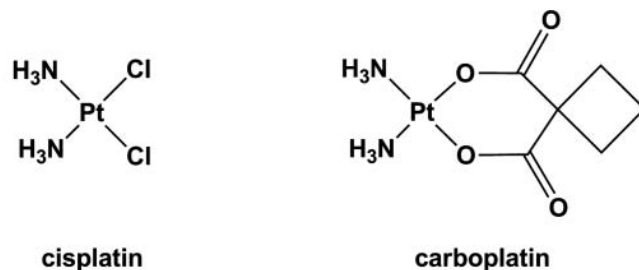


Figure 11 : Structures des molécules cisplatine et carboplatine

1.3.3 Chimiorésistance dans le cancer ovarien

La majorité des patientes avec cancer épithélial de l'ovaire répondent bien à la thérapie standard initiale comprenant la résection chirurgicale suivie de la chimiothérapie. Cependant, plus de 70% des patientes aux stades avancés de la maladie vont subir une rechute due principalement à l'acquisition de chimiorésistance [72]. La chimiorésistance a lieu lorsque les cellules cancéreuses reprennent leur croissance malgré les traitements de chimiothérapie. Dans un tel cas, plusieurs raisons peuvent être en cause et les drogues ont alors besoin d'être changées et/ou réajustées.

Même si le CÉO récurrent est typiquement multirésistant, la chimiothérapie à base de platine reste de mise. Les patientes en rémission ayant un intervalle sans maladie d'au moins 6 mois peuvent être considérées comme sensibles à la platine, tandis que celles ayant un intervalle sans maladie de moins de 6 mois seront considérées comme réfractaires aux traitements à base de platine [22]. Plus l'intervalle de non-exposition est long, plus les traitements futurs à base de platine pourraient de nouveau fonctionner de même que d'autres traitements de chimiothérapie en cas de réapparition de la maladie [73]. Lorsque le traitement de première ligne n'est plus efficace, des drogues de deuxième ligne pourront être administrées, telles que des drogues à base de platine couplées avec du paclitaxel ou de la gemcitabine [74]. D'autres drogues comme la gemcitabine, la doxorubicine liposomale, ou le topotécan pourront aussi être utilisées pour réduire la toxicité et prolonger la survie des patientes [74].

1.3.3.1 Mécanismes de résistance et voies impliquées

Il existe plusieurs hypothèses quant aux mécanismes de résistance rencontrés dans le CÉO. Par exemple, certaines des cellules cancéreuses qui n'ont pas été tuées par la chimiothérapie peuvent subir des modifications ou des mutations qui les rendent résistantes à la drogue utilisée. Ces cellules-là peuvent se multiplier et prendre le dessus sur les cellules sensibles à la chimiothérapie, menant alors à un cancer ovarien principalement résistant à la chimiothérapie. De plus, il est possible que ces cellules entreprennent l'amplification de certains gènes, provoquant une production excessive de protéines qui rendent l'agent anticancéreux en question inefficace. Les protéines de transport de drogues peuvent aussi être compromises, ne pouvant plus fonctionner normalement pour diriger les drogues vers leur site d'action à l'intérieur de la cellule. De plus, certaines cellules cancéreuses peuvent également acquérir des moyens pour expulser certaines drogues via une molécule appelée p-glycoprotéine. Plus encore, elles peuvent éventuellement acquérir la capacité d'inactiver les agents anticancéreux ou bien encore acquérir la capacité de réparer les dommages tels que des bris d'ADN causés par ceux-ci.

La réponse d'une cellule cancéreuse face à un agent chimiothérapeutique dépend, en partie, de sa capacité à entrer en apoptose. Ce phénomène de résistance peut provenir de mécanismes impliquant le cycle cellulaire (Figure 10), ou d'un défaut dans le mécanisme de l'apoptose [75]. Cette hypothèse implique des changements au niveau de l'expression de certains gènes afin de promouvoir la prolifération cellulaire ainsi que la survie tout en évitant l'apoptose. Il est donc normal de suspecter que la chimiorésistance puisse impliquer certains événements des voies apoptotiques et/ou des voies de pro-survie (Figure 12) [76]. Ainsi, la modulation des facteurs et gènes pro-apoptotiques (suppresseurs de tumeurs) et des gènes anti-apoptotiques (oncogènes) pourrait rendre une cellule cancéreuse de nouveau sensible à la chimiothérapie.

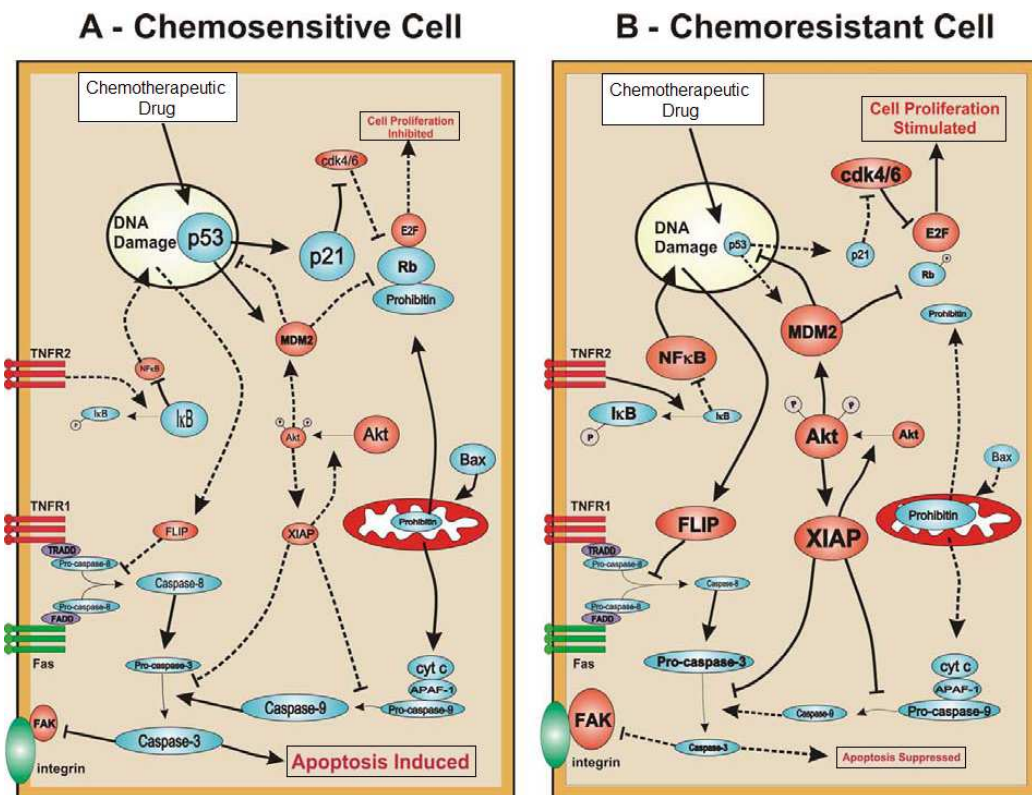


Figure 12 : Modèle hypothétique de chimiorésistance dans des cellules du cancer de l'ovaire humain (modifiée de [76])

1.3.3.2 Chimiorésistance innée versus chimiorésistance acquise

Il est important de pouvoir prédire le comportement d'un cancer ovarien pour pouvoir le soigner le plus rapidement et efficacement possible. La chimiorésistance peut être innée, c'est-à-dire qu'une cellule cancéreuse naïve pour la chimiothérapie peut intrinsèquement posséder des mécanismes de protection naturelle contre certains agents chimiothérapeutiques. Similairement, une cellule cancéreuse peut acquérir de la chimiorésistance suite à l'exposition aux traitements de chimiothérapie et s'adapter en conséquence afin de survivre, et ce, via des mécanismes de sélection qui demeurent encore obscurs et mal compris. Si des informations recueillies indiquent qu'un cancer ovarien est résistant à un agent chimiothérapeutique, ce dernier ne devra pas être utilisé pour la patiente concernée, car il serait inefficace, causerait inutilement des effets secondaires nuisibles et pourrait également être à l'origine de chimiorésistance croisée avec d'autres drogues de la même famille. De la même façon, si le cancer ovarien est sensible à la chimiothérapie, la meilleure combinaison d'agents chimiothérapeutiques sera adoptée pour donner à la patiente les meilleures chances de survie à court et plus long terme.

La chimiorésistance est aujourd'hui un problème thérapeutique qui limite sévèrement le succès qu'un traitement peut avoir sur le cancer épithélial de l'ovaire. Des interactions complexes entre différents éléments de différentes voies de signalisation, en amont comme en aval, pourraient être impliquées. Jusqu'à présent, la plupart des recommandations établies pour les traitements anticancéreux proviennent des résultats de multiples essais cliniques. Cependant, chaque patiente présente une maladie différente de celle d'une autre patiente. La thérapie personnalisée devra éventuellement être prise davantage en considération, car elle permettrait de faire des choix judicieux quant aux différents traitements disponibles, visant à améliorer la survie globale et la qualité de vie des différentes patientes.

1.4 Les modèles d'étude

Pour pouvoir étudier divers aspects du cancer épithélial de l'ovaire, nous avons recours à différents modèles : les cellules cancéreuses d'origine, la culture primaire, les lignées cellulaires et les xénogreffes.

1.4.1 La banque de tumeurs

Le tissu ovarien sain ou tumoral peut servir de modèle d'étude. Pour pouvoir l'utiliser à différents moments et pas seulement juste après la résection de la tumeur, le tissu original peut être conservé en paraffine (*formalin-fixed, paraffin-embedded tissue* ou *FFPE*) [77] ou en OCT (*optimal cutting temperature*), un composé servant à la fixation de spécimens par traitement à des températures cryogéniques. Une banque de tumeurs peut être ainsi établie, en incluant des annotations spécifiques de pathologistes certifiés. Un microétagage de tissus peut subséquentement être créé (Figure 13), puis utilisé pour diverses analyses, telles que l'évaluation de l'expression de différentes protéines et leur localisation cellulaire par la méthode de l'immunohistochimie. Même si le tissu d'origine est un des meilleurs modèles ayant subi un minimum de manipulation et d'altérations, le fait est que le matériel reste limité en quantité et ne peut être utilisé indéfiniment comme source pour diverses expérimentations.

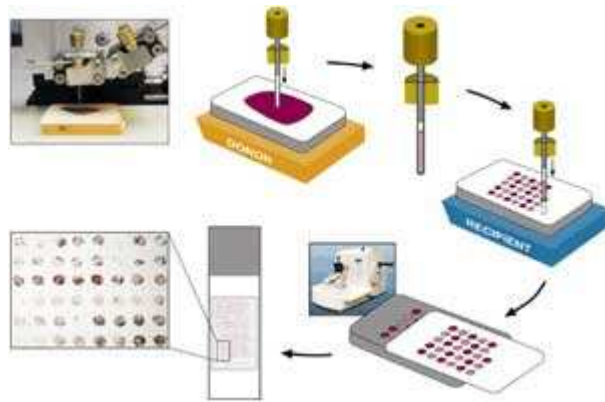


Figure 13 : Construction d'un microétagage de tissus. Un microétagage de tissus est assemblé en sélectionnant des carottes de biopsies de locations spécifiques de tissus en bloc de paraffine (bloc donneur), pour ensuite les placer dans un nouveau bloc de paraffine (bloc récipent). De fines couches en sont coupées, puis déposées sur des lames, en préparation pour l'immunohistochimie. Avec permission, de [<http://www.microarraystation.com/tissue-microarray/>]

1.4.2 La culture primaire

La culture primaire est établie par multiplication des cellules tumorales directement du tissu original, par repiquetages cellulaires successifs (passages) [78-80]. Les cellules cancéreuses contenues dans l'ascite, un liquide inflammatoire associé à la tumeur, peuvent aussi être répliquées. Le modèle de la culture primaire permet de faire des études basées sur les patientes, et peut régler partiellement le problème de limitations en quantité du tissu d'intérêt d'origine. Cependant, la production de cellules de culture primaire n'est pas toujours une réussite, puisqu'il est possible que les cellules puissent ne pas adhérer au pétri de culture. Lorsque la production de ces cellules s'avère efficace, ce modèle cellulaire ne peut cependant être utilisé que sur une courte période de temps, en l'espace de quelques passages seulement, à moins que les cellules soient ou deviennent immortelles en culture *in vitro*.

1.4.3 Les lignées cellulaires

Après un certain nombre de passages (soit un minimum d'environ 40-60 passages), il y a possibilité d'immortalisation spontanée des cellules tumorales précédemment dérivées à partir de tumeurs solides (TOV) ou d'ascites (OV). Les cellules immortalisées obtenues sont désignées en tant que lignées cellulaires [78]. Un énorme avantage est la grande polyvalence de cette source de matériel. Son utilisation prolongée pour une large variété de manipulations expérimentales devient désormais envisageable, avec entre autres la possibilité de faire des manipulations génétiques. La disponibilité en quantités quasi illimitées de ce matériel peut servir à des fins expérimentales sur courtes et plus longues périodes. Une des possibilités avec de telles cellules est de faire des cultures en trois dimensions (3D) *in vitro*, ce qui se rapproche du modèle 3D retrouvé *in vivo*. Pour se faire, l'utilisation de la culture cellulaire en gouttelettes inversées et suspendues est préconisée puisqu'elle représente une méthode simple et non dispendieuse se rapprochant du modèle réel. Le désavantage de ce modèle-ci se traduit par la possibilité de sélections ou d'altérations, au cours des passages, de certaines propriétés et caractéristiques propres aux cellules tumorales d'origine. Par conséquent, ce modèle d'étude ne peut pas refléter complètement la maladie *in vivo*.

1.4.4 Les xénogreffes

Les modèles de xénogreffes représentent une valeur ajoutée pour l'évaluation de la formation et de la progression de tumeurs *in vivo* dans un animal. Par exemple, les lignées cellulaires préalablement établies peuvent être injectées dans des souris immunodéficientes comme les souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) [81]. Ces dernières possèdent un dysfonctionnement au niveau des cellules immunitaires, lymphocytes T et lymphocytes B, donnant aux cellules cancéreuses humaines la possibilité de ne pas être rejetées par le système immunitaire de la souris. Le but des xénogreffes est donc d'essayer d'imiter un microenvironnement tumoral similaire à celui de l'humain et potentiellement favorable à la formation et progression tumorale.

1.5 Les objectifs de mon projet de maîtrise

Les patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire (CÉO), la plupart diagnostiquées tardivement et donc à des stades avancés de la maladie, seront traitées par la chimiothérapie standard. Cependant, le développement de la chimiorésistance pour la majorité d'entre elles constitue un sérieux problème qui peut limiter les chances de succès des traitements. Notre laboratoire a récemment réussi à développer des lignées cellulaires du CÉO provenant de différentes patientes avant et après leurs traitements de chimiothérapie. Le fait que les lignées cellulaires, qui vont être étudiées, sont dérivées de cellules cancéreuses prélevées à différents moments au cours du traitement de chimiothérapie chez une même patiente représente une première dans ce domaine. Ces lignées constitueront un nouveau modèle puissant pour révéler les modifications subies par les cellules du CÉO suite à la chimiothérapie. Nous voulons alors bien caractériser ce modèle cellulaire. Nous caractériserons dans un premier temps ces nouvelles lignées de cellules pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie par diverses approches moléculaires. Dans un deuxième temps, nous évaluerons certains aspects physiologiques de ces lignées *in vitro* et *in vivo*.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Échantillons et données cliniques

Les échantillons de tissus et de sang étudiés dans ce présent projet ont été prélevés sur trois patientes différentes (1369, 2295, 3133) présentant un cancer épithélial de l’ovaire (CÉO) de stade avancé (Stade III), lors de chirurgies effectuées dans le département de gynécologie obstétrique au Centre hospitalier de l’Université de Montréal (CHUM – Hôpital Notre-Dame). Les patientes ont préalablement signé un formulaire de consentement, en accord avec le Comité d’éthique institutionnel du CHUM, pour autoriser l’utilisation des échantillons biologiques à des fins de recherche. Le stade de la maladie a été déterminé au moment de la chirurgie par un gynécologue-oncologue. L’histopathologie ainsi que le grade des tissus tumoraux ont été évalués, par la suite, par des pathologistes certifiés et selon les critères de classification de la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO). Des données cliniques de ces patientes sont présentées ci-dessous (Tableau 2).

	Patientes		
	1369	2295	3133
Âge au diagnostic	58	59	52
Histopathologie	Cystadénocarcinome séreux papillaire	Cystadénocarcinome séreux papillaire	Cystadénocarcinome séreux papillaire
Grade	G3	G3	G3
Stade	IIIC	IIIC	IIIC
Survie (mois)	28	12	22
Chimiothérapie	Paclitaxel/carboplatine; Paclitaxel; Doxorubicine; Topotécan	Cisplatine/topotécan; Paclitaxel/carboplatine; Doxorubicine;	Paclitaxel/carboplatine; Doxorubicine; Carboplatine/gemcitabine

Tableau 2 : Paramètres cliniques. L’âge au diagnostic, l’histopathologie tumorale, le grade et le stade, ainsi que les traitements de chimiothérapies successivement suivis, et le temps de survie suite au diagnostic sont indiqués pour les trois patientes (1369, 2295, 3133).

Les trois patientes du CÉO (1369, 2295 et 3133) présentent toutes un cystadénocarcinome séreux papillaire de haut grade et de stade avancé (G3, IIIC). Celles-ci ont toutes suivi un traitement de chimiothérapie standard de première ligne, constitué d'une combinaison de paclitaxel et de carboplatine. Au début du traitement, les trois patientes ont bien répondu au traitement de chimiothérapie standard, si nous nous référons à la chute de leur taux de CA125 (Figure 14). Des traitements de deuxième ligne ont été, par la suite, utilisés (Figure 14). La période de survie, suite au diagnostic, pour les patientes 1369, 2295 et 3133 est relativement courte, soit de 28 mois, 12 mois et 22 mois respectivement. La patiente 1369 avait déjà été diagnostiquée pour un cancer du sein dans le passé pour lequel elle avait subi un traitement de chimiothérapie, et ce, 14 mois avant son diagnostic du cancer de l'ovaire.

Des cellules cancéreuses ont été prélevées chez les trois patientes (1369, 2295 et 3133), avant et après leurs traitements de chimiothérapie contre le CÉO, et ce, à partir de tumeurs solides (TOV) ou d'ascites (OV). Toutes les cellules cancéreuses pré-chimiothérapie pour le CÉO (TOV1369TR, OV2295, TOV3133D, TOV3133G) ont été prélevées peu de temps après le diagnostic. En plus d'avoir été exposées à la chimiothérapie de première ligne combinant paclitaxel et carboplatine, les cellules post-chimiothérapie (OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 et OV3133(2)) ont été exposées à d'autres traitements de chimiothérapie (Tableau 2 et Figure 14). Plus précisément, les cellules post-chimiothérapie OV1369(2) ont aussi été exposées à la doxorubicine (Figure 14). Les cellules post-chimiothérapie OV2295(2) et TOV2295 ont été exposées également à la combinaison de cisplatine/topotécan, puis à celle de paclitaxel/carboplatine (Figure 14). Les cellules post-chimiothérapie OV3133 ont été exposées à la chimiothérapie de première ligne paclitaxel/carboplatine, alors que les cellules post-chimiothérapie OV3133(2), collectées plusieurs mois plus tard, ont été exposées en plus à la doxorubicine et à la combinaison carboplatine/gemcitabine (Figure 14).

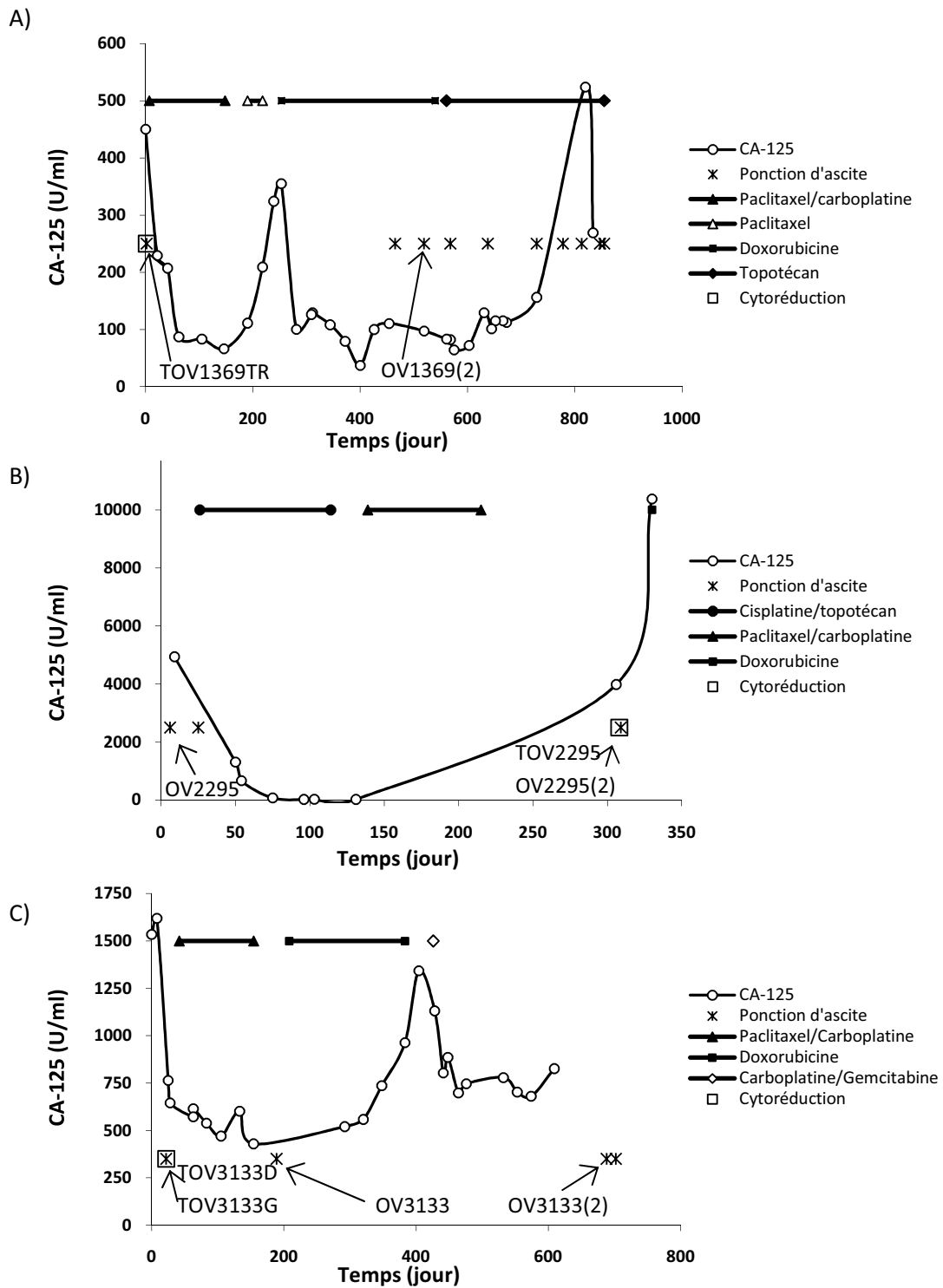


Figure 14 : Variation du taux de CA125 au cours de divers traitements pour les trois patientes 1369 (A), 2295 (B), et 3133 (C). Le temps 0 représente le moment de la prise en charge de la patiente suite au diagnostic de cancer de l'ovaire. Les échantillons à partir desquels les lignées cellulaires ont été dérivées sont aussi indiqués.

2.2 Lignées cellulaires et conditions de culture

Pour l'établissement des nouvelles lignées cellulaires, des échantillons de tissus ovariens, collectés pour notre banque de tumeurs, ont d'abord été placés en culture *in vitro*. Au début de la culture primaire, les cellules cancéreuses représentent une population de cellules plutôt hétérogène avec présence de quelques cellules fibroblastiques contaminantes. Après plusieurs divisions cellulaires *in vitro*, la population cellulaire devient de plus en plus homogène, les cellules cancéreuses étant plus résistantes à la mort cellulaire que les autres. Occasionnellement, les cellules tumorales peuvent se transformer, acquérir une activité proliférative illimitée *in vitro* et devenir immortelles. Dans une telle situation, il y a création d'une lignée de cellules cancéreuses.

Nos lignées cellulaires ont été établies comme décrit [79, 80], principalement par la méthode du grattage cellulaire, à partir de culture primaire des cellules cancéreuses de tumeurs solides (TOV) ou de l'ascite (OV) des trois patientes du CÉO (1369, 2295 et 3133). Les quatre lignées naïves pour la chimiothérapie, ou « pré-chimiothérapie », qui ont ainsi été établies sont : TOV1369TR, OV2295, TOV3133D et TOV3133G, où « TR », « D » et « G » désignent respectivement « la trompe (de Fallope) », « l'ovaire droit », et « l'ovaire gauche ». Les cinq lignées exposées à la chimiothérapie, ou « post-chimiothérapie », qui ont aussi été établies, sont : OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 et OV3133(2).

Nous avons observé, lors de la culture cellulaire, que la lignée pré-chimiothérapie OV2295 est sensible à un taux élevé d'oxygène (environ 20% O₂) et son homologue, la lignée post-chimiothérapie OV2295(2), l'est moins. Ces cellules ont tendance à mourir dans un environnement riche en oxygène contrairement aux cellules tumorales des autres nouvelles lignées, et ce, surtout suite à un récent passage de cellules, lorsque les cellules n'ont pas encore adhéré au pétri. Il a donc été déterminé que la lignée OV2295 se développe mieux dans des conditions hypoxiques à 5% O₂. Ainsi, pour la cohérence et la constance expérimentale, toutes les cultures primaires et lignées cellulaires de ce projet ont été étudiées dans de telles conditions hypoxiques. De plus, les cultures cellulaires ont été réalisées dans du milieu OSE (Wisent, Qc, Canada), supplémenté par une solution à 10% de sérum FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Wisent, Qc, Canada), et par des antibiotiques, soit 2.5 µg/ml d'amphotéricine B (Wisent, Qc, Canada) et 50 µg/ml de gentamicine (Gibco Invitrogen, ON, Canada). Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère humide, maintenue à 5% de CO₂ et 5% d'O₂.

2.3 Approches moléculaires

2.3.1 Extraction d'ARN

L'ARN (acide ribonucléique) total de chacun des tissus tumoraux collectés ainsi que l'ARN de chacune des lignées cellulaires, pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, dérivées des tissus, ont été extraits. Dans le cas des tissus tumoraux, le réactif TRIzol (Invitrogen) a été utilisé pour l'extraction de l'ARN. Puis, la purification de l'ARN a été réalisée via la colonne de RNeasy (Qiagen). Dans le cas des lignées cellulaires, l'extraction et la purification de l'ARN ont été réalisées à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen). Le contrôle de la qualité de l'ARN a été effectué grâce à l'appareil « *Agilent 2100 BioAnalyzer* » via la « *BioAnalyzer Nano chip* » (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) selon les instructions du manufacturier. La qualité de l'ARN est déterminée selon le RIN (*RNA Integrity Number*) et définie par un système numérique de 10 (ARN intact) à 1 (ARN complètement dégradé) [82]. L'évaluation de l'intégrité de l'ARN par le RIN est primordiale, car elle représente une première étape cruciale pour l'obtention de données valides sur l'expression génique (Figure 15).

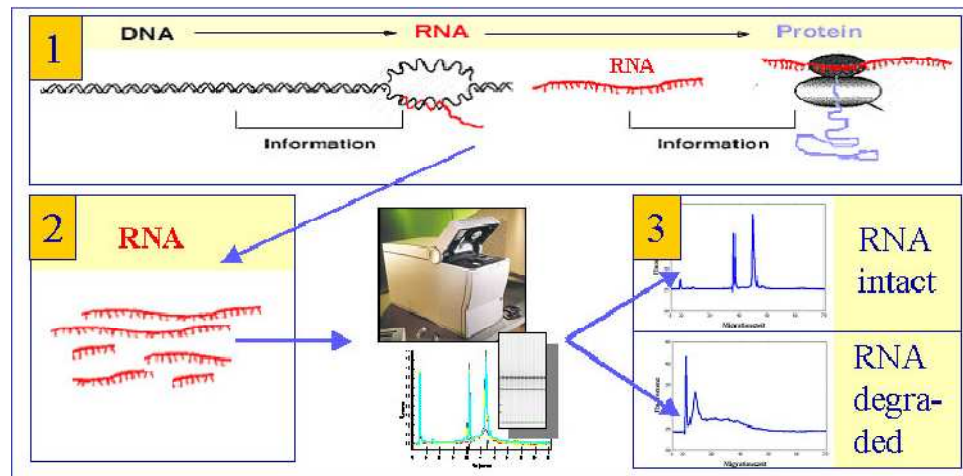


Figure 15 : Extraction de l'ARN et analyse du RIN (tirée de [82]). L'ARN et son rôle dans l'expression génique et la production protéique (1). Des brins d'ARN sont extraits (2), puis l'appareil « *Agilent 2100 BioAnalyzer* » est utilisé pour déterminer la qualité ou l'intégrité des molécules d'ARN présentes. Les échantillons d'ARN se voient ensuite attribués une catégorie d'intégrité de l'ARN appelé RIN (*RNA Integrity Number*), afin de refléter la qualité globale de l'ARN soumis (3).

2.3.2 Extraction de protéines et immunobuvardage de type Western

Les cellules ont été récoltées dans du PBS (*phosphate buffered saline*), puis centrifugées. Les culots de cellules ainsi obtenus ont été traités à l'aide d'un tampon de lyse (1% Igepal, 10% glycérol, 50 mM Tris-Base pH8, 2 mM EDTA, 5 mM NaF, 150 mM NaCl) supplémenté avec un cocktail d'antiprotéases 1X (*Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets*, Roche Diagnostics). Les échantillons préparés ont ensuite été centrifugés pendant 30 minutes à 13000 rpm (rotations par minute) à 4°C. Les surnageants ont alors été collectés et conservés à -80°C. La concentration de protéines a été déterminée par dosage colorimétrique grâce à la méthode de Bradford (Protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Un immunobuvardage de type Western s'ensuit avec l'utilisation de 30 µg d'extraits protéiques par échantillon. Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire via l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis transférées sur membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les anticorps utilisés lors de l'hybridation de la membrane sont : beta actine (AC-15) (ab6276 d'Abcam, Cambridge, UK), p53 (D0-1) (sc-126 de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Her2 ou Neu (C-18) (sc-284 de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Kératine 7 Ab-2 (MS-1352-P, NeoMarker, Medicorp, Qc, Canada), Kératine 8 Ab-4 (MS-997-P, NeoMarker, Medicorp, Qc, Canada), Kératine 18 (DC-10) (sc-6259 de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Kératine 19 Ab-1 (MS198-P, Lab Vision Corp., CA, USA), et Kératine 20 (SPM140) (ab15205 d'Abcam, Cambridge, UK). Les mêmes anticorps ont été utilisés pour les expériences d'immunohistochimie.

2.3.3 Immunohistochimie

Les tumeurs cancéreuses collectées ont été préalablement fixées dans la formaline et mises en paraffine selon la procédure standard. Les blocs de paraffine ainsi formés ont été coupés en de fines couches d'environ 4 µm, qui ont été fixées sur un support solide tel qu'une lame de microscope. Une coloration standard à l'hématoxyline et éosine (H&E) a été effectuée pour chacune des lames afin de cerner les zones tumorales. Pour les sections de tumeurs choisies, de nouvelles lames ont été préparées pour les traitements et colorations immunohistochimiques. Plus précisément, les sections de tissus fraîchement coupées ont été placées sur des lames, puis incubées à 37°C pendant une nuit ou à 60°C pendant 30 minutes, déparaffinées dans du toluène, puis réhydratées dans un gradient d'éthanol. Par la suite, les lames ont été chauffées dans un tampon de citrate (0.01 M acide citrique) en ébullition afin d'exposer les antigènes. Un traitement de 0.3% de H₂O₂ a subséquemment été réalisé pour éliminer l'activité endogène des peroxidases. Les sections de tissus ont été saturées avec un produit bloquant appelé «*protein blocking serum-free reagent*» (DakoCytomation Inc., ON, Canada), puis incubées avec un anticorps primaire,

pendant 60 minutes à température ambiante. Notons que la substitution de l'anticorps primaire avec du PBS a servi de contrôle négatif, afin de vérifier la spécificité de l'anticorps primaire. Les sections de tissus ont été ensuite incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé (DakoCytomation Inc., ON, Canada) pendant 20 minutes, suivi d'une incubation avec un complexe streptavidine-peroxidase (DakoCytomation Inc., On, Canada), pendant 20 minutes à température ambiante. La visualisation des produits, qui ont réagi, s'est faite via l'usage de la diaminobenzidine (DAB), une substance contenant un substrat de peroxidase (DakoCytomation Inc., ON, Canada). La contre-coloration avec de l'hématoxyline a ensuite permis le marquage des noyaux cellulaires. Toutes les sections ont été observées par microscopie optique à un grossissement de 400 x.

2.4 Essais fonctionnels *in vitro* et *in vivo*

2.4.1 Essais de prolifération *in vitro*

Les lignées cellulaires, immortalisées *in vitro*, peuvent se diviser indéfiniment, et ce, tant qu'il y a des facteurs de croissance présents dans son milieu et qu'il y a suffisamment d'espace dans la boîte de Pétri pour son expansion. Le taux de croissance ici réfère à la vitesse à laquelle les lignées de cellules cancéreuses peuvent se diviser *in vitro*. Les lignées cellulaires ont étéensemencées au jour 0 dans des plaques de six puits : 1×10^5 cellules par puits pour les lignées dérivées des patientes 1369 et 2295, et 2×10^5 cellules par puits pour les lignées dérivées de la patiente 3133. Le milieu OSE supplémenté en sérum et en antibiotiques (OSE complet) a été remplacé tous les trois jours pendant la durée de l'expérience de deux semaines. Toutes les 48 heures, à compter du jour 1, des plaques ont été retirées et les cellules ont été rincées au PBS, trypsinisées, et resuspendues dans du milieu, pour ensuite être comptées via le compteur cellulaire CASY (*CASY analyzer system*). Les expériences ont été répétées trois fois, en utilisant deux puits pour chaque lignée à chaque fois. Le temps de dédoublement a été mesuré en utilisant la pente de la portion linéaire de la courbe de croissance.

2.4.2 Essais de migration *in vitro*

Le potentiel migratoire des lignées cellulaires a été évalué par la méthode de recouvrement de plaie, communément connue sous le nom de « *Scratch Assay* » [83, 84]. Les cellules ont été cultivées dans des plaques de six puits. Dès que les cellules sont à l'état de confluence, une strie ou plaie est créée à différentes positions dans la monocouche de cellules, à l'aide d'un embout de pipette de 200 μ l (Figure 16). La monocouche de cellules adhérentes a été lavée avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes et les débris cellulaires générés, avant l'ajout goutte-à-goutte de milieu OSE complet. La même strie a été observée au cours du temps et des photos ont été prises à différents temps (0 h, 8 h, 24 h et 48 h), à un grossissement de 4X. Ces expériences ont été répétées au moins deux fois, en utilisant trois puits pour chaque lignée. Une estimation du niveau de recouvrement a été faite après 48 h. Les estimations du niveau de recouvrement ont été faites en évaluant visuellement le degré d'avancement relatif des deux lignes de front de cellules migrant vers le centre de l'espace de la plaie créée (Figures 24-26 et Tableau 4).

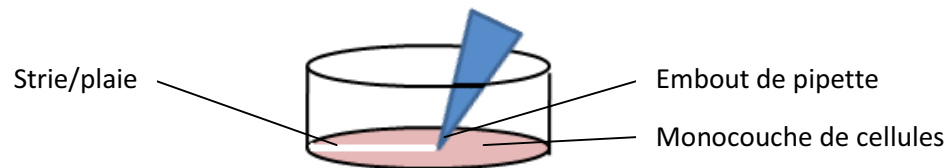


Figure 16 : Création d'une strie sur une monocouche de cellules confluentes. Une strie ou plaie a été effectuée en appuyant sur l'embout de pipette, avec force constante, en travers d'une monocouche de cellules confluentes.

2.4.3 Formation de sphéroïdes en 3D *in vitro*

La capacité des lignées cellulaires à produire des structures tridimensionnelles sous la forme d'agrégats ou de sphéroïdes a été évaluée selon les procédures de cultures telles que décrites précédemment [85]. Brièvement, des gouttelettes de 16 μl de milieu OSE complet, contenant chacune 4×10^3 cellules, ont été placées en suspension sur une surface non adhérente telle que l'intérieur du couvercle de boîtes de Pétri (Figure 17). Du PBS a été placé dans la partie inférieure du pétri, afin d'empêcher la déshydratation des gouttelettes suspendues. La capacité de former des sphéroïdes multicellulaires en 3D a été évaluée après 4 jours de culture, où les structures tridimensionnelles se définissent le mieux, moment auquel des photos ont été prises à un grossissement de 4X. Au moins deux expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque lignée.

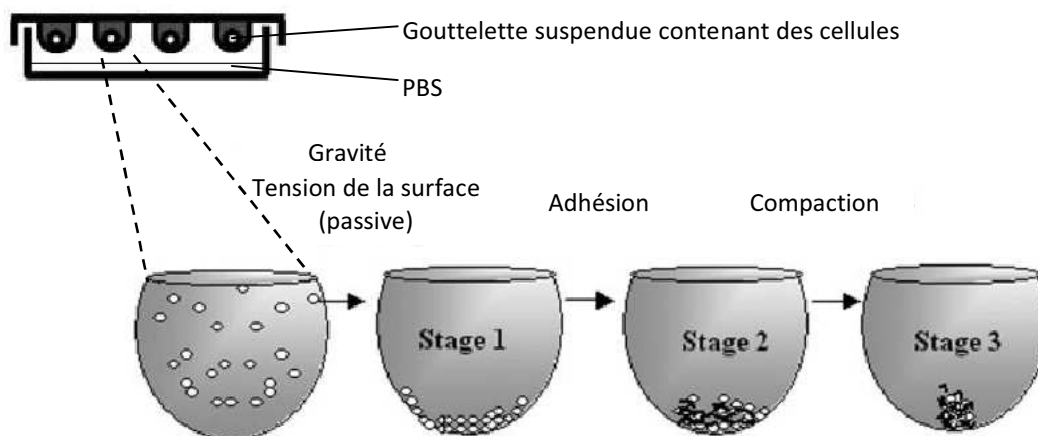


Figure 17 : Représentation schématique de la formation de sphéroïdes (adaptée de [86])

2.4.4 Xénogreffes dans des souris immunodéficientes *in vivo*

Selon un protocole préalablement approuvé par le Comité institutionnel sur la protection des animaux (CIPA), les lignées cellulaires à l'étude ont été greffées sous la peau de souris immunodéficientes, afin de contrôler la capacité des cellules tumorales à former des masses tumorales *in vivo*. Des souris femelles immunodéficientes, âgées d'environ 1-2 mois, fournies par la compagnie Charles River, ont été utilisées : six souris SCID CB17 et deux souris SCID NOD (*non obese diabetic severe combined immunodeficient*) pour chacune des neuf nouvelles lignées. La solution injectée en sous-cutanée est constituée de 5×10^6 cellules dans 100 μ l de D-PBS commercial (Gibco) et 100 μ l de Matrigel (BD Biosciences), une substance dégradable qui procure initialement aux cellules injectées une matrice favorisant la formation de tumeurs *in vivo*. Les souris ont été hébergées dans l'animalerie du Centre de recherche du CHUM, dans un environnement avec enrichissement et accès libre à l'eau et la nourriture. Les masses tumorales ont été mesurées pour leur volume et pesées deux fois par semaine. À l'issue de l'expérience, les souris ont été sacrifiées avant que la masse tumorale n'ait atteint les points limites, selon le CIPA et le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Il y a alors eu nécropsie et prélèvement chirurgical des xénogreffes.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Les lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO

Les cellules cancéreuses, dérivées à partir de tumeurs solides ou de cellules d'ascites, des trois patientes initiales (1369, 2295 et 3133) du CÉO, ont été mises en culture pour constituer les cultures primaires. Ces cellules se sont immortalisées en lignées cellulaires au cours du temps, après plusieurs divisions cellulaires *in vitro*. Ainsi, les quatre lignées établies pré-chimiothérapie sont TOV1369TR, OV2295, TOV3133D, TOV3133G et les cinq lignées post-chimiothérapie sont OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 et OV3133(2).

Lors de passages successifs, les cultures cellulaires s'enrichissent en cellules cancéreuses épithéliales de l'ovaire, donnant lieu à un tapis de cellules, peu différenciées, qui présente une structure en forme de pavé, typique des cellules épithéliales (Figure 18). Les nouvelles lignées présentent des tailles et morphologies distinctes les unes des autres, et ce, chez une même patiente (Figure 18). Toutes les lignées présentent une croissance cellulaire en monocouche (Figure 18). Toutefois, la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR peut poursuivre sa prolifération ou croissance par empilement des cellules lorsque celles-ci deviennent trop confluentes. Autrement dit, cette lignée a une capacité de croissance qui ne semble pas être inhibée par contact cellulaire.

De plus, les lignées cellulaires présentent différents degrés d'adhésion cellulaire, évalués d'après le temps de trypsinisation, une procédure chimique de détachement cellulaire. Plus le temps de trypsinisation requis est long, plus les cellules sont adhérentes à la boîte de Pétri utilisée en culture cellulaire. Ainsi, pour la patiente 1369, la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR est plus adhérente que la lignée post-chimiothérapie OV1369(2). Pour la patiente 2295, la lignée pré-chimiothérapie OV2295 et la lignée post-chimiothérapie OV2295(2) sont toutes deux moins adhérentes que la lignée post-chimiothérapie TOV2295. Similairement pour la patiente 3133, la lignée pré-chimiothérapie TOV3133D est moins adhérente que son homologue TOV3133G. Ces deux dernières lignées sont tout de même beaucoup moins adhérentes que les lignées post-chimiothérapie OV3133 et OV3133(2), issues de la même patiente.

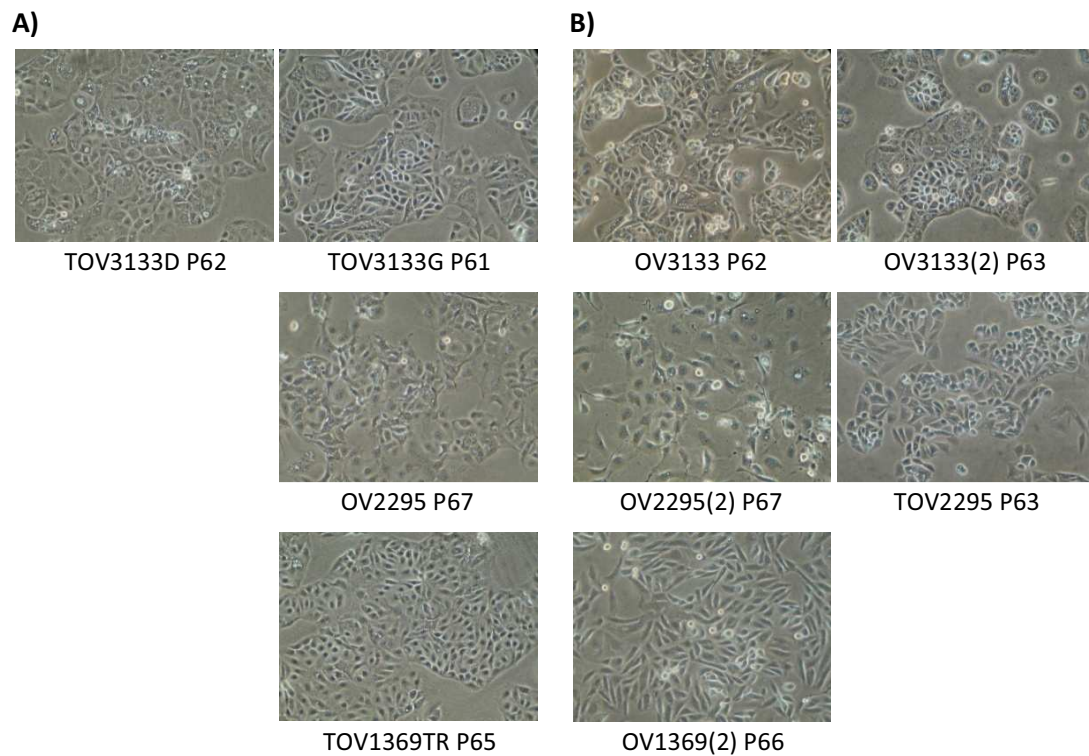


Figure 18 : Morphologie cellulaire des nouvelles lignées du CÉO. Les lignées cellulaires pré-chimiothérapie sont présentées à la figure A, et les lignées cellulaires post-chimiothérapie sont présentées à la figure B. Des photos ont été prises aux passages 60-70, où les cellules cancéreuses sont considérées comme ayant été immortalisées en lignées cellulaires. À des fins de référence, les termes « TOV », « OV », « TR », « D » et « G » désignent respectivement « la tumeur solide », « l'ascite », « la trompe (de Fallope) », « l'ovaire droit », et « l'ovaire gauche ».

3.2 Qualité de l'ARN des tumeurs solides et des lignées cellulaires

L'intégrité de l'ARN a été déterminée, suite à l'extraction et à la purification de l'ARN des tumeurs solides d'origine et des lignées cellulaires dérivées (Tableau 3). Le RIN (*RNA Integrity Number*) indique l'intégrité de l'ARN, qui reflète la qualité de l'ARN. En général, les lignées cellulaires *in vitro* semblent avoir un RIN un peu plus élevé que les tumeurs parentales *in vivo*. Pour les lignées cellulaires, la valeur du RIN est de 9.7-10, référant à une qualité de l'ARN qui est excellente. Pour les tumeurs solides, la valeur du RIN est de 8.1-9.4, ce qui reflète une très bonne qualité de l'ARN, peu dégradée lors des manipulations.

		Catégorie du RIN			
		Pré-chimiothérapie		Post-chimiothérapie	
Tumeurs	TOV1369TR	8.1	TOV2295		8.3
	TOV3133D	8.5			
	TOV3133G	9.4			
Lignées	TOV1369TR	10	OV1369(2)	10	
	OV2295	9.9	OV2295(2)	10	
			TOV2295	9.9	
	TOV3133D	10	OV3133	10	
	TOV3133G	10	OV3133(2)	9.7	

Tableau 3 : RIN pour les tumeurs initiales et les lignées dérivées. La qualité de l'ARN est déterminée par le RIN à l'aide de l'appareil « *Agilent 2100 BioAnalyzer* ». Plus le nombre assigné pour le RIN est grand (de 1 à 10), meilleure est l'intégrité ainsi que la qualité de l'ARN analysé. Le RIN a été déterminé pour chacune des tumeurs solides d'origine et des lignées cellulaires dérivées.

3.3 Expression des kératines, HER2 et p53 dans les tumeurs solides et les lignées cellulaires dérivées

3.3.1 Expression des kératines

Un cancer ovarien peut avoir pour origine l'ovaire même (cancer primaire) ou bien avoir pour origine un site autre que l'ovaire (cancer secondaire). La distinction histologique entre un carcinome primaire de l'ovaire et une métastase à l'ovaire peut être déterminée selon l'expression des cytokératines ou des kératines 7 et 20 [87]. Plus précisément, la kératine 7 est souvent utilisée comme un marqueur positif pour les cellules ovariennes. La kératine 20, quant à elle, est généralement présente dans les cellules tumorales du tractus gastro-intestinal ou du côlon, mais absente dans les cellules tumorales de l'ovaire. Comme la kératine 7, les kératines 8, 18, et 19 sont des protéines marqueurs de cellules épithéliales. La kératine 8, ou cytokératine de type I (acide), s'associe généralement avec son partenaire, la kératine 18, ou cytokératine de type II (basique), pour former l'hétérodimère le plus commun et abondant des filaments intermédiaires de kératines au niveau de l'épithélium simple. La kératine 19, quant à elle, est une kératine de type II (basique) qui est souvent exprimée seule, en absence d'un partenaire.

Grâce à la technique d'immunohistochimie, et l'utilisation des anticorps anticytokératines, nous avons montré que les tumeurs solides pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie TOV1369TR, TOV3133D, TOV3133G et TOV2295 présentent une coloration immunohistochimique positive pour les kératines 7, 8, 18 et 19 (Figure 19). De plus, les tumeurs solides n'expriment pas la kératine 20 en immunohistochimie (Figure 19 et Figure supplémentaire 1 en annexe).

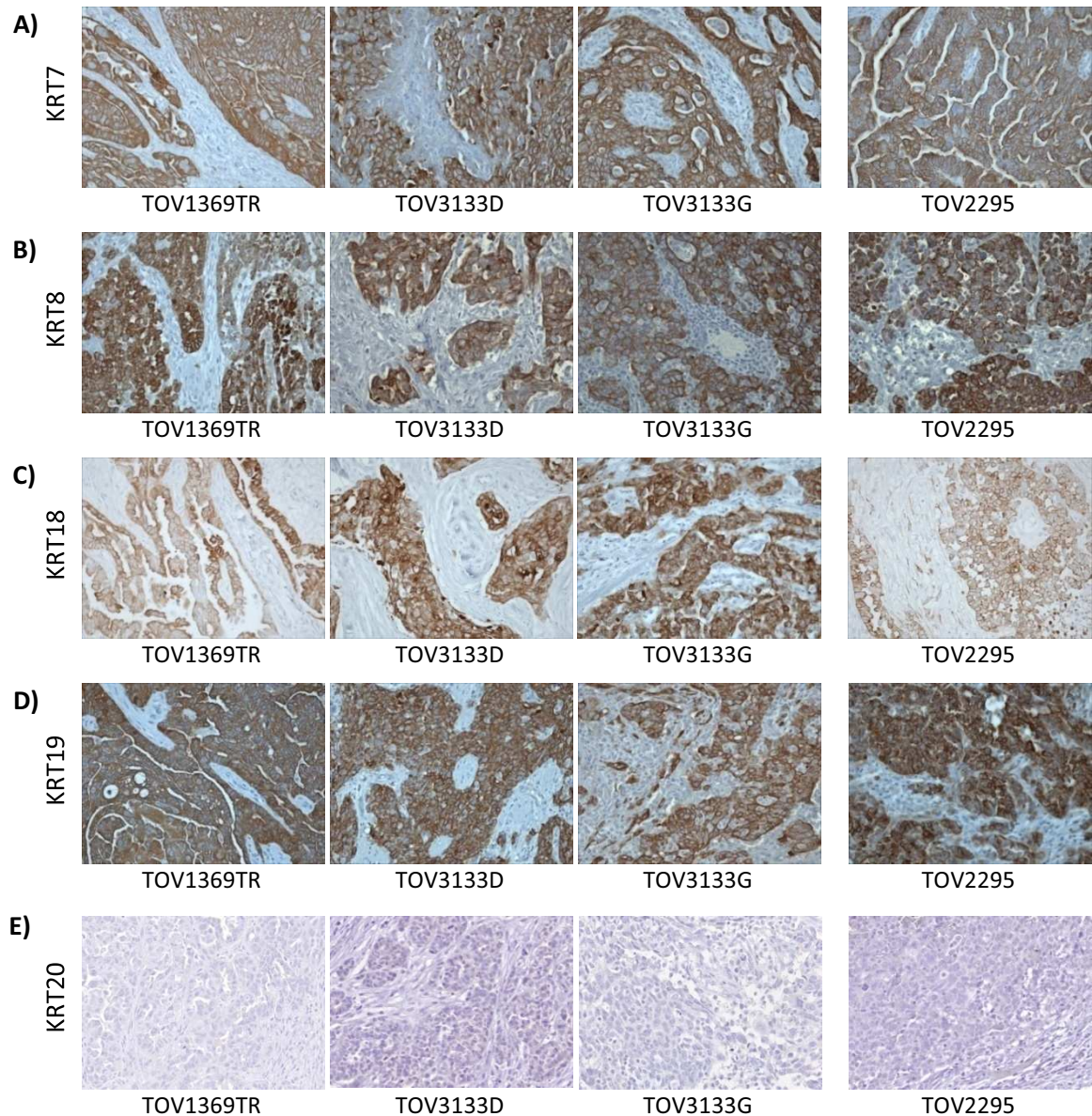


Figure 19 : Expression *in situ* des kératines dans les tumeurs solides du CÉO. Chacune des sections de tumeurs solides initiales pré-chimiothérapie (TOV1369TR, TOV3133D, TOV3133G) et post-chimiothérapie (TOV2295) ont été colorées, par immunohistochimie, pour les kératines KRT7 (A), KRT8 (B), KRT18 (C), KRT19 (D) et KRT20 (E). Les noyaux ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline. Les sections de tissu ont été observées à l'aide d'un microscope optique, à un grossissement de 400 x.

En immunobuvardage de type Western, la majorité des lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, dérivées des trois patientes 1369, 2295 et 3133, semble exprimer également les kératines 7, 8, 18 et 19 (Figure 20). Cependant, pour la patiente 1369, la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR semble exprimer beaucoup de ces kératines comparativement à la lignée post-chimiothérapie OV1369(2), qui semble en exprimer que peu ou pas (Figure 20). Une autre expérience effectuée plus tard, avec ces deux lignées de passage plus précoce, ont montré que la lignée post-chimiothérapie OV1369(2) exprime en fait les kératines testées, alors que la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR en exprime beaucoup plus (Figure supplémentaire 2 en annexe). Les bandes visibles en immunobuvardage de type Western sont généralement en doublet ou en bandes multiples pour les kératines 7, 8, 18 et 19 (Figure 20). Plus particulièrement, pour les kératines 8 et 18, plusieurs bandes sont observées (Figure 20). Celles-ci pourraient correspondre à des modifications post-traductionnelles telles que de la phosphorylation ou de la glycosylation [88].

Ces résultats confirment que les tumeurs solides initiales et les neuf lignées cellulaires dérivées sont d'origine ovarienne puisqu'elles expriment la kératine 7 mais pas la kératine 20. De plus, l'expression spécifique des kératines 7, 8, 18, 19, soit en immunohistochimie et en immunobuvardage de type Western, a permis l'identification de l'origine épithéliale des cellules cancéreuses de toutes les tumeurs solides ainsi que des neuf lignées cellulaires (Figures 19-20 et Figure supplémentaire 2 en annexe).

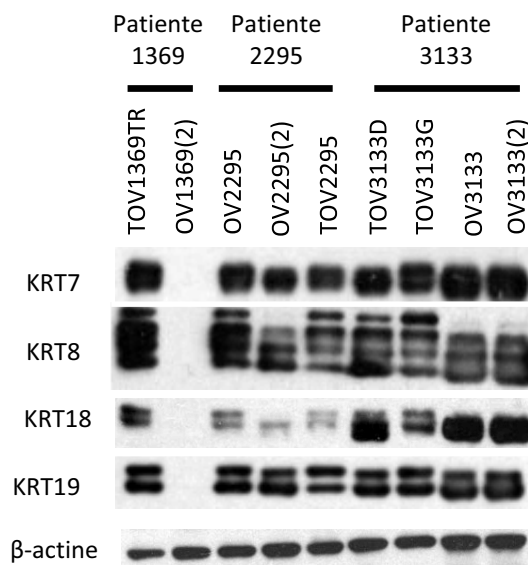


Figure 20 : Expression *in vitro* des kératines dans les lignées cellulaires du CÉO. L'expression des kératines KRT7, KRT8, KRT18 et KRT19 a été évaluée dans les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie dérivées de cellules cancéreuses des patientes 1369, 2295 et 3133. L'actine a été utilisée comme contrôle de chargement de protéine. Ces résultats ont été obtenus au cours d'une même expérience d'électrophorèse sur différents gels.

3.3.2 Expression de HER2 et de p53

La surexpression de HER2 et les mutations p53 sont très fréquentes dans le carcinome de l'ovaire en comparaison avec des lignées de tissu normal et de tissu bénin de l'ovaire [89, 90]. *HER2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), aussi connu sous les noms de *Neu* ou *ErbB-2*, est un gène qui code pour la protéine HER2, un récepteur transmembranaire tyrosine kinase qui intervient normalement dans la signalisation des facteurs de croissance, permettant à la cellule de se développer et de se diviser. *HER2* est aussi un oncogène cellulaire amplifié dans plusieurs types de carcinomes humains tels que les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon et du poumon [91]. Le gène *p53* (ou *TP53* pour *53 kDa Tumor Protein*) est un gène suppresseur de tumeurs localisé dans le petit bras du chromosome 17 (17p13.1). Ce gène code pour la protéine p53, un facteur de transcription de 53 kDa qui est activé en réponse à une multitude de stress cellulaires. Un large éventail de gènes est régulé par *TP53*, intervenant à la fois dans l'arrêt du cycle cellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN, et/ou dans d'autres changements au niveau du métabolisme, et ce, en fonction des conditions physiologiques ainsi que du type cellulaire. *TP53* est souvent muté ou inactivé dans les cancers humains, soit dans plus de 50% des cas [92].

Tant les tumeurs solides que les lignées cellulaires dérivées, pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, des patientes 1369, 2295 et 3133, expriment toutes HER2, tel que détectée respectivement en immunohistochimie (Figure 21) et en immunobuvardage de type Western (Figure 22). La protéine p53 est détectée dans les tumeurs solides et les lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie des patientes 1369 et 2295 (Figure 21 et 22). Pour la patiente 3133, très peu ou pas de p53 est détectée par immunohistochimie dans les tumeurs solides pré-chimiothérapie, TOV3133D et TOV3133G (Figure 21). En l'immunobuvardage de type Western, p53 n'est pas détectée dans les lignées cellulaires pré-chimiothérapie ainsi que les lignées post-chimiothérapie de cette même patiente (Figure 22).

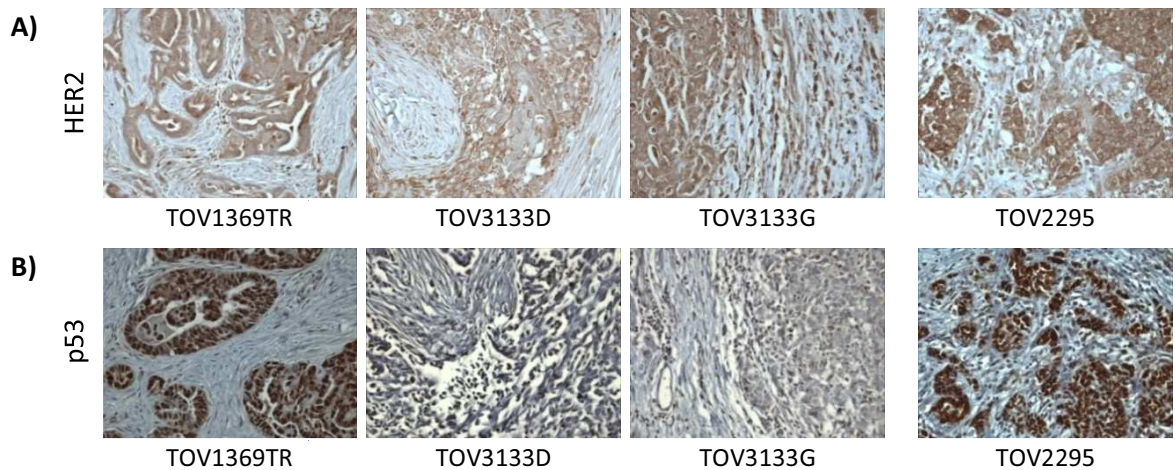


Figure 21 : Expression *in situ* de HER2 et p53 dans les tumeurs solides du CÉO. Chacune des sections des tumeurs solides initiales pré-chimiothérapie (TOV1369TR, TOV3133D, TOV3133G) et post-chimiothérapie (TOV2295) ont été marquées, par immunohistochimie, pour HER2 (A) et p53 (B). Les noyaux ont été contre-colorés avec l'hématoxyline. Les sections de tissu ont été observées à l'aide d'un microscope optique, à un grossissement de 400 x.

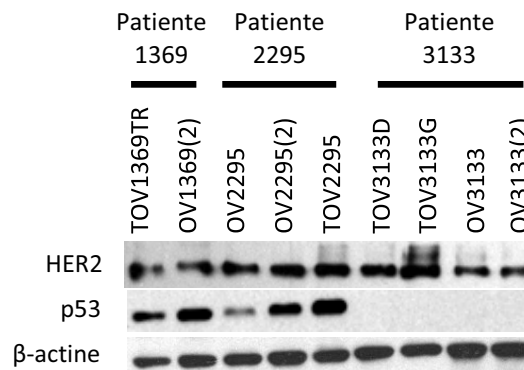


Figure 22 : Expression *in vitro* de HER2 et p53 dans les lignées cellulaires du CÉO. En parallèle, l'expression de HER2 et de p53 a été vérifiée dans les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie des patientes 1369, 2295 et 3133. L'actine a été utilisée comme contrôle pour la quantité de protéine chargée par puits sur le gel.

3.4 Taux de croissance cellulaire des lignées du CÉO

Des essais de prolifération ont été effectués pour les lignées cellulaires dérivées des trois patientes (1369, 2295, 3133) (Figure 23), en parallèle avec les lignées contrôles (Figure supplémentaire 3 en annexe). Pour la patiente 1369, la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR prolifère plus lentement que la lignée post-chimiothérapie OV1369(2) (Figure 23A). Pour la patiente 2295, les courbes de croissance de la lignée pré-chimiothérapie OV2295, ainsi que celles des lignées post-chimiothérapie OV2295(2) et TOV2295 coïncident (Figure 23B). La prolifération est donc similaire pour toutes les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie dérivées de la patiente 2295. Finalement, pour la patiente 3133, les lignées pré-chimiothérapie TOV3133D et TOV3133G semblent, en général, proliférer plus rapidement que les lignées post-chimiothérapie OV3133 et OV3133(2) (Figure 23C).

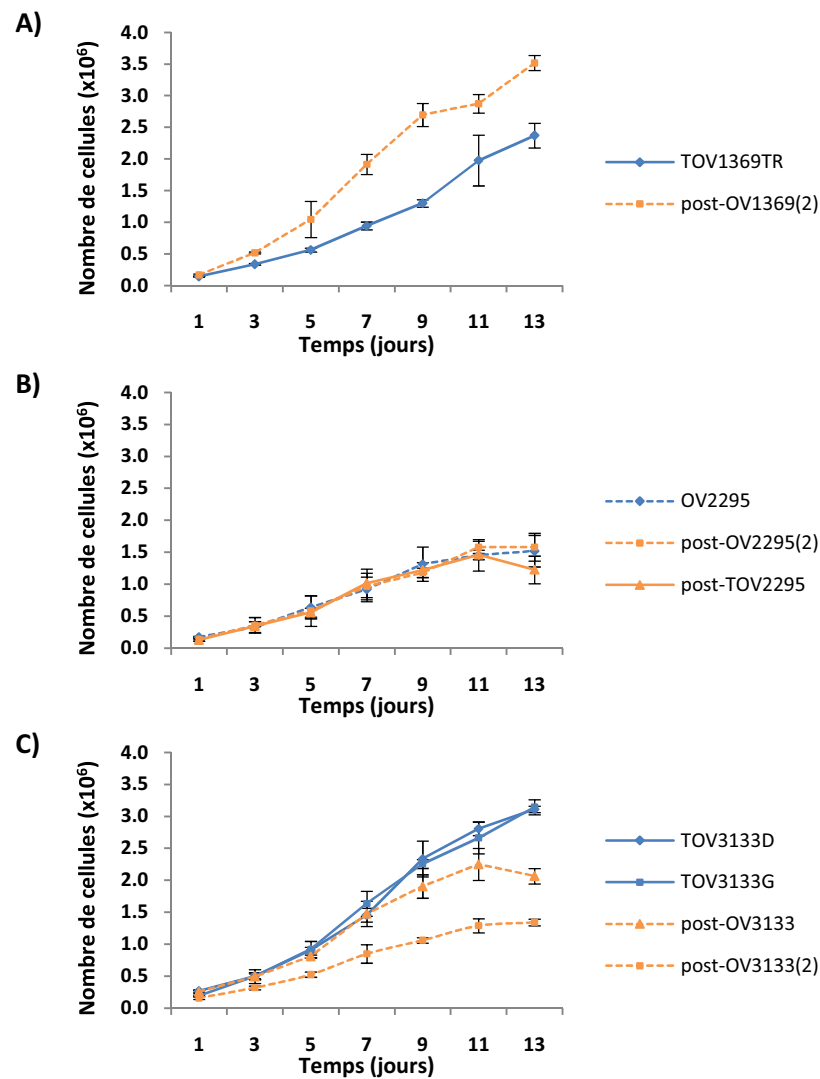


Figure 23 : Taux de croissance des lignées des patientes 1369 (A), 2295 (B) et 3133 (C). Au temps 0, des cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6-puits : 100 000 cellules par puits pour les lignées 1369 et 2295, et 200 000 cellules par puits pour les lignées 3133. Les comptes cellulaires ont été effectués toutes les 48 h, et ce, deux semaines durant. Les expériences ont été exécutées en duplicata pour chaque lignée, et répétées trois fois (n=3). Les temps de dédoublement cellulaire ont été ensuite calculés selon la portion linéaire de la courbe de croissance. Représentation graphique de la moyenne de trois expériences indépendantes avec barres d'erreur correspondant à l'écart-type. Le taux de croissance cellulaire est représenté par des courbes bleues (lignées pré-chimiothérapie) et par des courbes oranges (lignées post-chimiothérapie).

3.5 La capacité de migration cellulaire des lignées

La capacité migratoire des lignées cellulaires a été évaluée par la méthode de recouvrement de plaie sur une monocouche de cellules à confluence. Le temps de recouvrement de plaie observé provient notamment de la capacité de prolifération et de migration des cellules tumorales [93-95]. Il faut donc tenir compte des taux de croissance des lignées lorsque nous évaluons la capacité migratoire, suite à l'essai de recouvrement de plaie. Plus de 48 h sont nécessaires pour recouvrir totalement une plaie pour toutes les nouvelles lignées étudiées (Figures 24, 25 et 26). Le niveau de recouvrement de plaie est déterminé pour chaque lignée en relation avec celui des autres lignées (Tableau 4).

Pour la patiente 1369, le recouvrement semble être légèrement plus rapide pour la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR que pour la lignée post-chimiothérapie OV1369(2), et ce, malgré un plus haut taux de prolifération chez cette dernière (Figures 23A et 24). La capacité de migration cellulaire semble alors être légèrement plus grande pour la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR que pour la lignée post-chimiothérapie OV1369(2). Comparativement à la lignée pré-chimiothérapie OV2295, la lignée pré-chimiothérapie OV2295(2) possède un temps de recouvrement qui est un peu plus rapide tandis que la lignée post-chimiothérapie TOV2295 possède le temps de recouvrement un peu plus lent, ce qui est plus notable à 24 h (Figure 25). Puisque les taux de croissance pour les lignées de la patiente 2295 sont similaires (Figure 23B), la capacité de recouvrement de plaie pour ces lignées est surtout attribuable à la capacité de migration plutôt qu'à la prolifération. Suivant cette logique, c'est la lignée post-chimiothérapie OV2295(2) qui semble avoir la plus grande capacité migratoire, suivie de la lignée pré-chimiothérapie OV2295, puis de la lignée post-chimiothérapie TOV2295. Pour la patiente 3133, le recouvrement est le plus rapide pour la lignée pré-chimiothérapie TOV3133D, puis s'ensuivent la lignée pré-chimiothérapie TOV3133G, et les lignées post-chimiothérapie OV3133 et OV3133(2) respectivement (Figure 26). Ces deux dernières lignées post-chimiothérapie prolifèrent et migrent très peu comparativement aux autres lignées. Dans le cas des lignées pré-chimiothérapie 3133, qui ont des courbes de croissance similaires, c'est la lignée TOV3133D, dérivée de l'ovaire du côté droit, qui migre plus vite que son homologue TOV3133G, dérivée de l'ovaire du côté gauche (Figures 23C et 26).

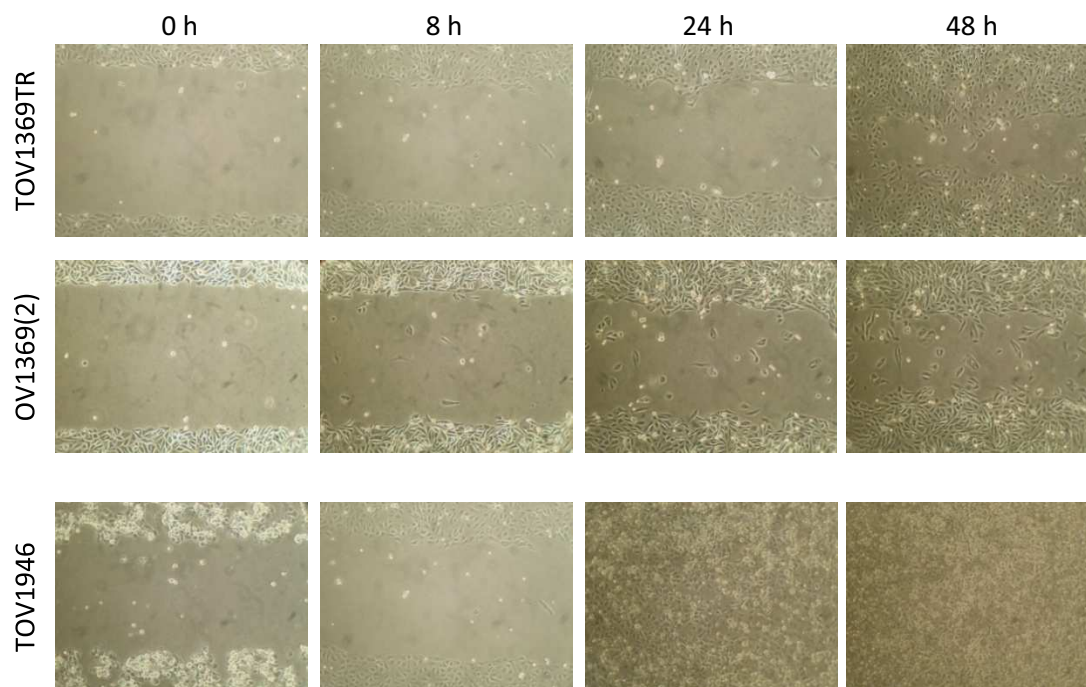


Figure 24 : Capacité de migration cellulaire des lignées 1369 et de la lignée TOV1946. La migration cellulaire a été évaluée par la méthode du recouvrement de plaie. Les stries ont été réalisées sur une monocouche de cellules confluentes. Celles-ci ont ensuite été observées et photographiées aux temps 0 h, 8 h, 24 h et 48 h. La lignée TOV1946 a été utilisée en parallèle comme un exemple de recouvrement complet en dedans de 48 h. Les expériences ont été réalisées au moins deux fois en triplicata.

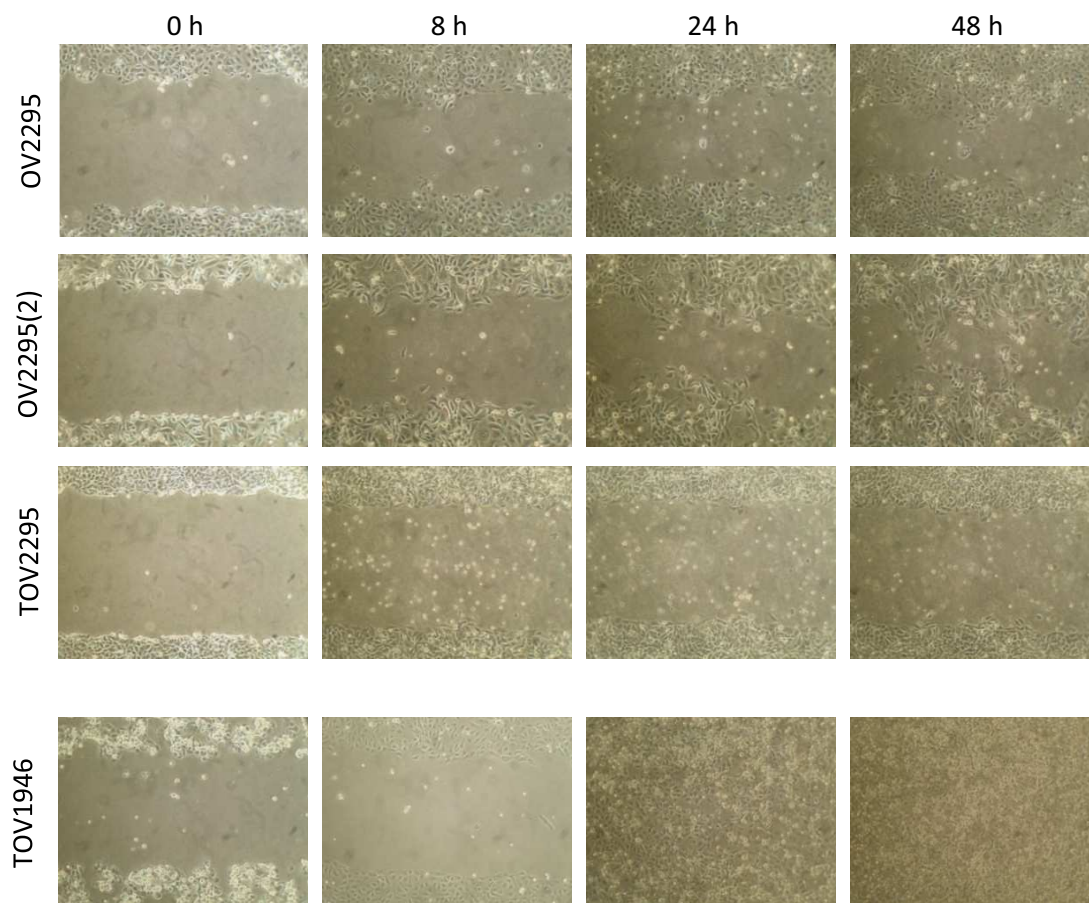


Figure 25 : Capacité de migration cellulaire des lignées 2295 et de la lignée TOV1946. La migration cellulaire a été évaluée par la méthode du recouvrement de plaie. Les stries ont été réalisées sur une monocouche de cellules confluentes. Celles-ci ont ensuite été observées et photographiées aux temps 0 h, 8 h, 24 h et 48 h. La lignée TOV1946 a été utilisée en parallèle comme un exemple de recouvrement complet en dedans de 48 h. Les expériences ont été réalisées au moins deux fois en triplicata.

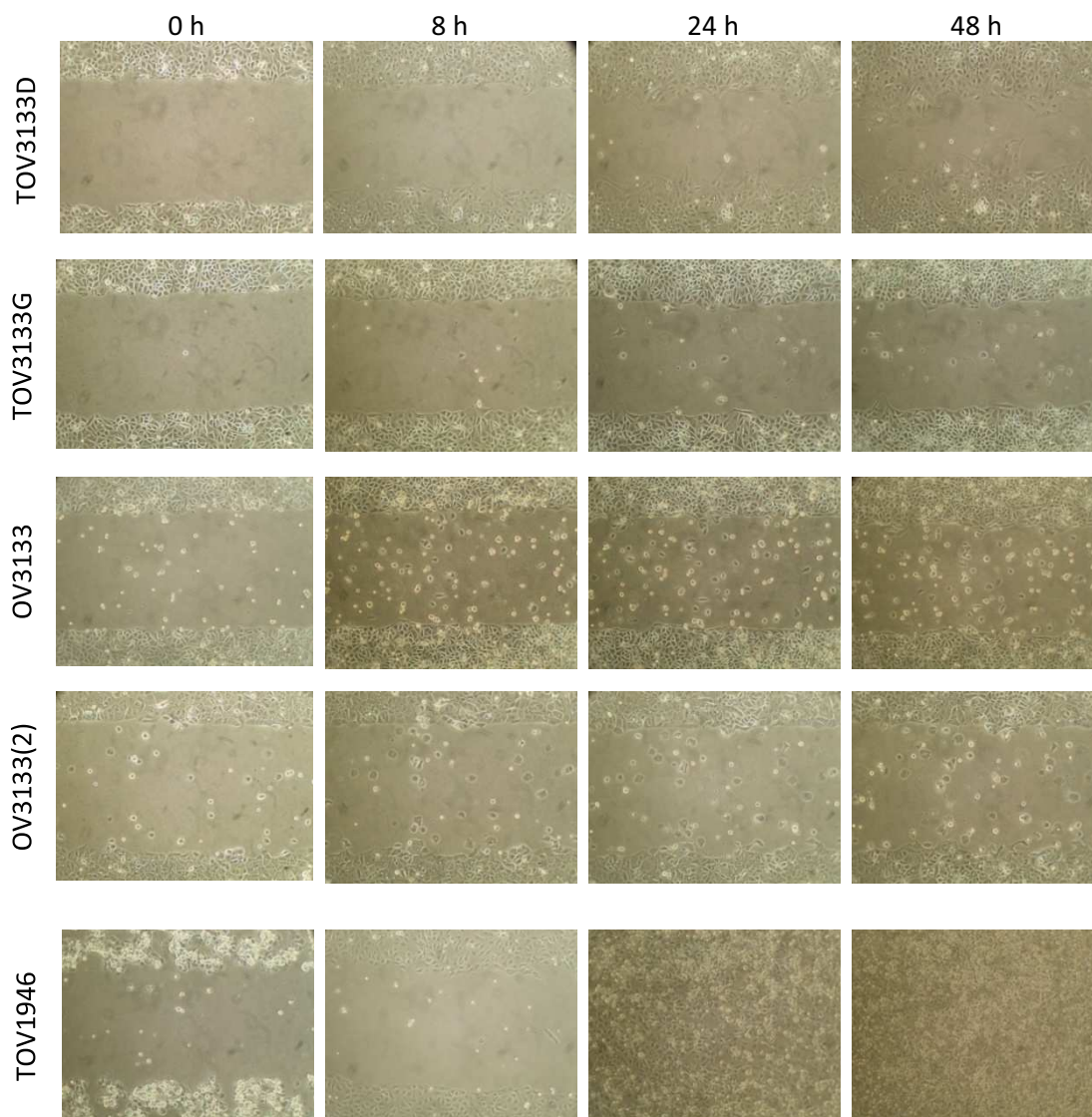


Figure 26 : Capacité de migration cellulaire des lignées 3133 et de la lignée TOV1946. La migration cellulaire a été évaluée par la méthode du recouvrement de plaie. Les stries ont été réalisées sur une monocouche de cellules confluentes. Celles-ci ont ensuite été observées et photographiées aux temps 0 h, 8 h, 24 h et 48 h. La lignée TOV1946 a été utilisée en parallèle comme un exemple de recouvrement complet en dedans de 48 h. Les expériences ont été réalisées au moins deux fois en triplicata.

3.6 La capacité des lignées du CÉO à former des sphéroïdes en 3D

En utilisant la méthode des gouttelettes inversées, nous avons testé la capacité des lignées cellulaires à former des sphéroïdes au cours du temps, notamment au jour 4, où les structures tridimensionnelles sont généralement les mieux définies. Les expériences ont été effectuées au moins deux fois. Plusieurs gouttelettes ont été examinées pour chaque lignée cellulaire. La lignée OV2295 est la seule, parmi les nouvelles lignées, à former des sphéroïdes compacts aux contours bien définis (Figure 27). Le taux de compaction des sphéroïdes OV2295 est comparable à celui des sphéroïdes formés par les cellules TOV1946 et TOV112D (Figure 27), deux lignées références du CÉO, naïves pour la chimiothérapie, qui ont déjà bien été caractérisées au laboratoire [96, 97]. Il est intéressant de noter qu'aucune des lignées post-chimiothérapie n'est capable de former de structures compactes, contrairement à 3/6 lignées pré-chimiothérapie testées (Figure 27). De plus, les agrégats formés par les cellules des lignées post-chimiothérapie sont plus gros et moins bien associés que la plupart des lignées pré-chimiothérapie (Figure 27).

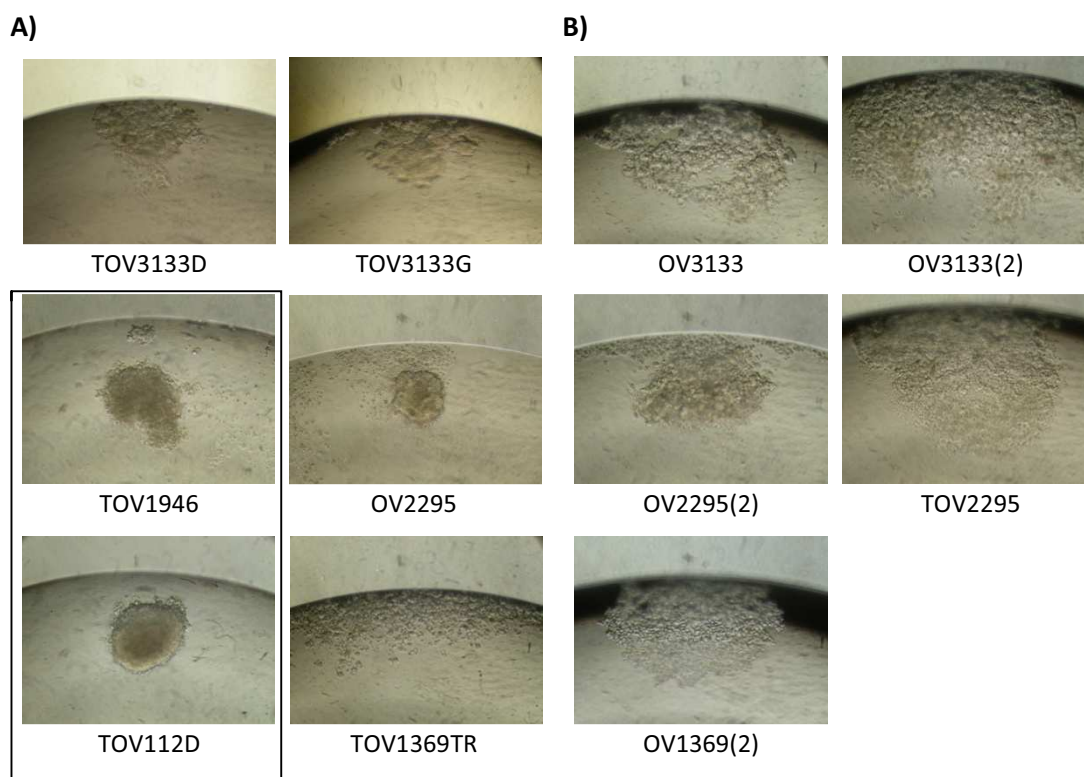


Figure 27 : Formation de structures tridimensionnelles pour les lignées cellulaires du CÉO. La capacité des lignées cellulaires à former des structures en trois dimensions a été évaluée par la culture de gouttelettes suspendues pour les lignées pré-chimiothérapie à gauche (A) et les lignées post-chimiothérapie à droite (B). Au jour 4, des photos représentatives des résultats obtenus ont été prises. La formation des structures en 3D a été comparée à celle des lignées TOV1946 et TOV112D (encadré en noir), qui forment des sphéroïdes compacts.

3.7 Capacité des lignées à former des tumeurs dans les souris immunodéficientes

Les injections sous-cutanées de cellules tumorales des nouvelles lignées dans des souris immunodéficientes SCID et SCID NOD ont été effectuées selon les normes CIPA et CCPA. Des études antérieures, faites au laboratoire, ont révélé une capacité de formation tumorale très rapide pour la lignée invasive de type séreux TOV1946 et pour la lignée agressive de type endométrioïde TOV112D [96, 97]. Ces deux lignées ont été utilisées ici comme contrôles positifs pour la formation de tumeurs *in vivo* dans des souris immunodéficientes SCID. Toutes les souris contrôles, injectées avec les cellules contrôles TOV1946 ou TOV112D, ont bien formé des tumeurs qui se développent dans le temps. Parmi les nouvelles lignées, cependant, seule la lignée post-chimiothérapie OV3133 a pu former de telles tumeurs, quoique plus petites, dans 4 des 6 (66.7%) souris SCID (Tableau 4 et Figure supplémentaire 4 en annexe). Puisque, en général, les lignées n'ont pas pu former des tumeurs similaires qui se développent dans le temps, dans les souris SCID, nous avons fait un projet pilote en incluant des injections de ces mêmes lignées dans des souris SCID NOD, encore plus immunodéficientes. En plus de la perte de fonctionnement des cellules B et des cellules T, les souris SCID NOD démontrent aussi une perte de fonctionnement des cellules NK, pouvant permettre aux tumeurs de s'y former plus facilement [81, 98]. Cependant, les expériences avec les souris SCID NOD n'ont pas été concluantes, ces souris ayant développé plusieurs autres problèmes de santé nécessitant le sacrifice des animaux avant que l'évaluation appropriée du développement de la tumeur soit possible.

Essais de culture cellulaire	Caractéristiques de croissance cellulaire	Lignées cellulaires										
		TOV1369TR	OV1369(2)	OV2295	OV2295(2)	TOV2295	TOV3133D	TOV3133G	OV3133	OV3133(2)	TOV1946	TOV112D
Prolifération	Temps de dédoublement (en jours) ± S.D.	2.24 ± 0.19	1.50 ± 0.15	2.29 ± 0.58	2.33 ± 0.47	2.21 ± 0.64	2.65 ± 0.64	1.81 ± 0.44	3.01 ± 0.45	3.93 ± 0.34	1.85 ± 0.34	1.02 ± 0.05
Sphéroïdes	Formation	agrégat	agrégat	compact	agrégat	agrégat	semi-compact	semi-compact	agrégat	agrégat	compact	compact
Migration	Temps de recouvrement (en heures)	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	> 48	24	48
	Niveau relatif de recouvrement après 48 h	+++++	++++	++++	+++++	++	++++	+++	++	+	+++++ (complet)	+++++ (complet)
Injection sous-cutanée	Nombre de souris SCID avec tumeur	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	0/6	3/3	3/3

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des essais de culture cellulaire *in vitro* et *in vivo*

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 L'importance de l'établissement des lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO

Notre laboratoire a dérivé des lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie provenant d'une même patiente, et ce, pour trois différentes patientes présentant un CÉO. Ceci constitue une première dans le domaine du cancer de l'ovaire, car la majorité des autres modèles cellulaires pour ce cancer sont, soit dérivés d'échantillons de patientes qui ont suivi une chimiothérapie néo-adjuvante [99], soit dérivés d'échantillons de patientes qui n'ont pas encore été exposées à la chimiothérapie [96, 97]. Dans le cas des lignées déjà exposées à la chimiothérapie, la biologie de la cellule peut être altérée suite à l'introduction d'évènements génétiques, épigénétiques ou autres résultant directement du traitement agressif de la chimiothérapie [100, 101]. Il est alors difficile de déterminer si les observations expérimentales faites avec les cellules tumorales post-chimiothérapie du CÉO sont attribuables à leurs propriétés inhérentes ou bien à des caractéristiques acquises lors de traitements précédents, incluant la chimiothérapie. Le développement de modèles de lignées cellulaires ovariennes naïves pour la chimiothérapie est donc devenu primordial, car les études menées avec de telles cellules permettraient de mieux comprendre l'évolution de la biologie des cellules cancéreuses ovariennes suite à la chimiothérapie. Plus précisément, ces modèles permettraient de découvrir et d'étudier certains mécanismes qui pourraient être impliqués dans la chimiorésistance, tels que des mutations de certains gènes ou des modifications de certaines protéines. Il serait maintenant intéressant d'analyser comment les cellules cancéreuses des patientes présentant un CÉO se comportent au cours du temps, suite à divers traitements chimiothérapeutiques. Notre nouveau modèle de lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie représente alors un nouvel outil pour mieux comprendre la biologie de la cellule tumorale du CÉO suite à la chimiothérapie.

Les lignées cellulaires ont été dérivées à partir de tumeurs solides (TOV) ou d'ascites (OV) de trois patientes du CÉO (1369, 2295, 3133), avant et après leurs traitements de chimiothérapie. Les quatre lignées pré-chimiothérapie (TOV1369TR, OV2295, TOV3133D et TOV3133G) et les cinq lignées post-chimiothérapie (OV1369(2), OV2295(2), TOV2295, OV3133 et OV3133(2)) ont été établies suite à plusieurs divisions cellulaires *in vitro*. En culture cellulaire sur monocouche, toutes les nouvelles lignées cellulaires, pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, présentent une structure en forme de pavé caractéristique des tissus épithéliaux (Figure 18), ce qui indique que ces lignées semblent être d'origine épithéliale. De plus, nous avons pu évaluer l'adhésion cellulaire des lignées par le temps de trypsinisation requis pour le détachement cellulaire. Il a été observé

que ces lignées ont des capacités d'adhésion cellulaire différentes les unes des autres, qui sont néanmoins supérieures à celles des lignées contrôles plus agressives (TOV1946 et TOV112D). L'adhésion cellulaire pourrait, en fait, jouer un rôle dans l'invasion cellulaire et dans la tumorigenèse. Ainsi, il a été proposé que plus les cellules tumorales sont adhérentes, moins elles peuvent se disséminer pour former des métastases et nuire à la survie des patientes atteintes du CÉO [102]. Plus encore, le faible taux d'oxygène de 5% utilisé pour toutes les lignées ne semble pas affecter grandement le comportement des cellules des différentes lignées autres que la lignée OV2295, qui se maintient difficilement à un taux d'oxygène de 20%. En général, nous observons que toutes les cellules à 5% d'oxygène se maintiennent mieux et génèrent moins de débris pouvant provenir de mort cellulaire.

Nous voulons ultimement obtenir des lignées cellulaires stables, dont le comportement varie peu dans le temps, afin de pouvoir les utiliser comme modèle d'étude, se rapprochant le plus possible des cellules cancéreuses ovariennes initiales. Plusieurs techniques en biologie moléculaire et expériences en culture cellulaire ont été utilisées lors de ce projet, incluant entre autres, des techniques d'immunohistochimie et d'immunobuvardage de type Western, mais également des essais de prolifération cellulaire, de migration cellulaire, de formation de sphéroïdes, et de xénogreffes en souris.

4.2 Évaluation de l'expression des kératines, de HER2 et de p53 dans les tumeurs solides d'origine et les lignées cellulaires dérivées

Dans un premier temps, il est important de déterminer le type et le site d'origine du cancer ovarien à l'étude, et ce, selon un patron particulier d'expression de kératines. Les kératines 7, 8, 18 et 19 caractérisent les tumeurs du CÉO ainsi que la surface épithéliale de l'OSE [3]. De plus, les kératines 7 et 20 s'avèrent être les plus utiles pour faire la distinction entre les tumeurs primaires de l'ovaire et les tumeurs secondaires de l'ovaire provenant de cellules métastatiques du côlon. En effet, les cellules du CÉO expriment typiquement la kératine 7, mais pas la kératine 20 [48, 87, 103, 104]. Des analyses d'expression de kératines ont été menées à l'aide des techniques de l'immunohistochimie et de l'immunobuvardage de type Western (Figures 19-20). Les résultats en immunohistochimie ont montré que l'expression de toutes ces kératines, dans les lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, reflète généralement celle observée dans les tumeurs solides initiales (Figures 19-20). En fait, toutes les tumeurs solides et la majorité des lignées cellulaires, pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, expriment la kératine 7, marqueur des cellules épithéliales de l'ovaire, mais pas la kératine 20, marqueur des cellules épithéliales du

côlon (Figures 19-20). Ceci confirme l'origine épithéliale et ovarienne de toutes les lignées pré-chimiothérapie ainsi que de la plupart des lignées post-chimiothérapie. Pour la patiente 1369, nous nous attendions à confirmer que les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie TOV1369TR et OV1369(2) soient d'origine ovarienne via l'expression de la kératine 7. Cependant, initialement, la lignée post-chimiothérapie OV1369(2) semble exprimer peu ou pas de kératine 7 (Figure 20). De plus, celle-ci semble également exprimer peu ou pas des kératines 8, 18 et 19 (Figure 20), contrairement aux huit autres lignées dérivées du CÉO. Pour vérifier que la lignée OV1369(2) est d'origine épithéliale et ovarienne, nous pouvons analyser l'expression des kératines dans des cellules de OV1369(2) de passages plus précoces et ayant subi moins de manipulations *in vitro*, conjointement à des cellules de passages plus avancés. Une récente expérience d'immunobuvardage de type Western semble indiquer qu'un passage plus bas de la lignée exprime en fait les kératines testées, et que cette lignée semble donc avoir une origine à la fois épithéliale et ovarienne (Figure supplémentaire 2 en annexe). Il semblerait que la lignée post-chimiothérapie OV1369(2) ait perdu la capacité d'exprimer les kératines au cours des passages (Figure 20), malgré le fait que la lignée pré-chimiothérapie TOV1369TR, de la même patiente, exprime toujours ces marqueurs (Figures 19-20). Une explication de la perte d'expression de kératines pourrait être l'enrichissement de cellules cancéreuses non épithéliales dans la lignée post-chimiothérapie OV1369(2). Cette lignée pourrait aussi avoir subi une dédifférenciation, comme par une conversion épithéliale-mésenchymateuse, et assumer une forme fibroblastique [105, 106] telle que celle observée à la figure 18.

HER2 (*human epidermal growth factor 2*) est un récepteur transmembranaire de la famille des tyrosines kinases [107], codé par le proto-oncogène *HER2*. Son activation résulte en l'initiation de plusieurs voies de signalisation, incluant les voies PI3K/AKT et Ras/Raf/MEK/Erk [108]. Ces voies jouent un rôle important dans l'angiogenèse, la formation de métastase, la différenciation cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales [109]. Par ailleurs, l'amplification de l'expression de *HER2* est bien connue dans le cancer du sein, où la surexpression de la protéine correspondante est associée à un mauvais pronostic [110-112]. La détermination de la surexpression de HER2, dans le cancer du sein, permet de cibler la thérapie par des traitements à base d'anthracyclines comme avec le trastuzumab, plus connu sous le nom de Herceptin [113]. Dans le CÉO, tout comme dans le cancer du sein, environ 20-30% des tumeurs possèdent une amplification de l'expression de *HER2* [3, 114, 115]. Puisqu'il existe des similitudes dans la génétique du cancer de l'ovaire et celle du cancer du sein, et que le risque de cancer de l'un augmente s'il existe des antécédents familiaux pour l'autre, il est envisageable que le niveau

d'expression de *HER2* soit aussi important dans le cancer de l'ovaire et qu'il puisse avoir un effet sur, par exemple, la susceptibilité à la chimiothérapie à base de paclitaxel et carboplatine [116]. Cependant, il ne semble pas y avoir d'expression différentielle évidente de *HER2* dans nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO. Il est donc difficile de déterminer l'effet de l'expression de *HER2* sur la chimiothérapie et la chimiorésistance dans ces lignées. Aussi, il est connu que la surexpression de cette protéine, à elle seule, peut induire la transformation cellulaire dans le cancer de l'ovaire ainsi que d'autres types de cancers humains [110, 117, 118]. Toutes les tumeurs solides d'origine ainsi que toutes les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie dérivées, de patientes présentant un CÉO de grade élevé et de stade avancé, expriment *HER2* (Figures 21-22), tout comme d'autres lignées du CÉO précédemment caractérisées [96, 97]. Il semblerait que *HER2* soit surexprimée dans les CÉO avancés plutôt que dans les CÉO plus précoces [119]. Cependant, contrairement au cancer du sein, le lien entre la surexpression de *HER2* et le pronostic des patientes dans le CÉO demeure controversé. Nos résultats suggèrent que les populations post-chimiothérapie résistantes ne semblent pas clairement avoir acquis plus ou moins d'expression de *HER2*, en comparaison aux populations pré-chimiothérapie correspondantes (Figures 21-22).

Depuis les deux dernières décennies, il a été observé que le gène *TP53* est fréquemment muté dans le cancer de l'ovaire, dans plus de 50% des cas, particulièrement dans le CÉO séreux de grade élevé [120-123]. La protéine encodée, p53, peut aussi subir des modifications post-traductionnelles qui reflètent l'importance du stress cellulaire subi lors de la carcinogenèse [124]. Il est donc essentiel de bien déterminer son statut dans les lignées cellulaires du CÉO. La présence d'une mutation somatique de *TP53* pourrait aussi être utile dans l'étude de l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques à titre préventif, comme c'est le cas dans d'autres cancers humains [125]. Par ailleurs, des analyses mutationnelles, effectuées en parallèle en collaboration avec le laboratoire de Patricia Tonin à l'université McGill, ont montré que *TP53* est muté dans toutes nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie (Tableau supplémentaire en annexe). Il est intéressant de noter que, pour toutes les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie de la patiente 3133, p53 n'est pas détectée par immunobuvardage de type Western (Figure 22). Ces résultats confirment ceux obtenus en immunohistochimie sur les tumeurs solides d'origine de la même patiente (Figure 21). En fait, une même mutation non-sens a été décelée pour les quatre lignées 3133 (Tableau supplémentaire en annexe), se traduisant par une perte d'expression de p53 dans ces lignées (Figures 21-22). Pour les patientes 1369 et 2295, tant les lignées pré-chimiothérapie que les lignées post-chimiothérapie expriment constitutivement p53. Dans ces cas-

ci, une substitution d'acides aminés a été identifiée (Tableau supplémentaire en annexe), stabilisant l'expression de p53 et permettant sa détection en immunohistochimie et en immunobuvardage de type Western (Figures 21-22). De plus, pour ces mêmes patientes, il semble y avoir une augmentation de l'expression de la protéine p53 dans les lignées post-chimiothérapie par rapport aux lignées pré-chimiothérapie (Figure 22). Ceci serait consistant avec le fait que la surexpression de p53 corrèle avec une réponse à la cisplatine, une drogue faisant partie du traitement de chimiothérapie standard administré aux patientes atteintes du CÉO [126, 127]. Une même mutation somatique de *TP53* apparaît pour chaque groupe de lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO, confirmant que les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie d'une même patiente proviennent d'une tumeur initiale commune. Ceci est intéressant, car même si ces lignées possèdent une origine commune, elles présentent pourtant des morphologies très différentes (Figure 18). Puisque la présence de *TP53* muté ne se transmet pas en une détection différentielle équivalente à travers les trois groupes de lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, la protéine p53 ne semble pas jouer un rôle dominant dans la chimiorésistance innée ou acquise de nos lignées (Figures 21-22).

4.3 Croissance cellulaire de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie

Pour évaluer la croissance cellulaire des lignées, nous avons réalisé un essai de prolifération par la méthode du compte cellulaire. Les courbes de croissance ne semblent pas avoir atteint un plateau clair correspondant à un arrêt de la croissance des cellules dans les plaques de six puits. Les courbes de croissance continuent à progresser même si la plupart des lignées ont rapidement atteint la confluence avant les deux semaines complètes d'expérience, ce qui indique une grande capacité d'entassement cellulaire pour ces cellules tumorales du CÉO. Dans les trois cas, le comportement des lignées pré-chimiothérapie et celui des lignées post-chimiothérapie divergent: pour la patiente 1369, c'est la lignée cellulaire post-chimiothérapie (OV1369(2)) qui prolifère plus lentement que la lignée cellulaire pré-chimiothérapie (TOV1369TR); pour la patiente 2295, les taux de croissance sont assez similaires pour la lignée pré-chimiothérapie (OV2295) et les lignées post-chimiothérapie (OV2295(2) et TOV2295); pour la patiente 3133, ce sont plutôt les lignées pré-chimiothérapie (TOV3133D et TOV3133G) qui prolifèrent significativement plus rapidement que les lignées post-chimiothérapie (OV3133 et OV3133(2)) (Figure 23). Il y a donc absence de constance quant aux taux de croissance des lignées pré-chimiothérapie par rapport à ceux des lignées post-chimiothérapie chez les trois patientes. En d'autres termes, la prolifération de chacune des lignées des trois patientes semble différer selon des propriétés qui leur sont propres.

Cette hypothèse semble concorder avec l'observation de morphologies assez distinctes pour toutes les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, plus particulièrement pour celles de la patiente 2295 (Figure 18). Ceci concorde aussi avec les temps de dédoublement calculés qui sont assez différents, surtout pour les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie des patientes 1369 et 3133 (Tableau 4). Plus encore, les lignées dérivées de tumeur solide (TOV) semblent avoir un taux de croissance plus élevé que celles dérivées de cellules d'ascites (OV), ce qui est plus apparent pour les lignées ovariennes de la patiente 3133 (Figure 23 et Tableau 4). Il est donc envisageable que la provenance des cellules cancéreuses (TOV versus OV) puisse également contribuer en partie au comportement de prolifération des lignées du CÉO [96].

4.4 Capacité de migration de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie

La capacité de migration cellulaire des nouvelles lignées a été évaluée par la méthode de recouvrement de plaie ou « *Scratch Assay* », en parallèle avec des lignées du CÉO précédemment caractérisées au laboratoire et naïves pour la chimiothérapie, soit TOV1946 et TOV112D, utilisées ici comme références. La capacité de migration peut nous donner une indication sur la capacité des cellules cancéreuses à disséminer à partir d'une tumeur initiale, pour ensuite potentiellement former des micrométastases en envahissant d'autres parties du corps [128, 129]. Des tests d'invasion utilisant les chambres de Boyden auraient aussi pu être envisagés, car ils pourraient donner des informations additionnelles sur le comportement migratoire des lignées, mais ces tests sont généralement plus complexes, plus dispendieux et plus difficilement reproductibles. Le temps de recouvrement de plaies, observé lors du « *Scratch Assay* », est essentiellement attribuable à une combinaison de la prolifération et de la migration des lignées cellulaires [93-95]. La capacité de migration est donc évaluée selon les temps et degrés de recouvrement cellulaire ainsi que les taux de croissance cellulaire des lignées. Cependant, d'autres éléments peuvent également entrer en compte dans ce type d'essai de migration, tels que la taille des cellules, les stratégies de migration cellulaire individuelle ou collective, ou bien encore la motilité et l'adhérence cellulaire [130]. En fait, la surexpression de certaines molécules d'adhésion, comme celles de la famille BMP, a été associée à un mauvais pronostic pour les patientes, due à une prolifération accrue qui favorise la dissémination cellulaire et la tumorigenèse cellulaire dans les cancers du sein et de l'ovaire [131, 132]. Toutes les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO ont eu besoin de plus de 48 h pour atteindre un recouvrement cellulaire complet, contrairement aux lignées contrôles plus agressives du CÉO (TOV1946 et TOV112D) qui recouvrent une plaie standard en moins de 48 h (Figures 24-26 et Tableau 4). Comme dans le cas de la prolifération, il ne semble

pas y avoir de consensus quant à la capacité de migration des groupes de lignées de cellules tumorales pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO pour les trois patientes.

4.5 Capacité de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie à former des structures tridimensionnelles

La capacité à former des structures tridimensionnelles a été évaluée en utilisant le modèle simple et économique des gouttelettes inversées, tel que mis au point au laboratoire [85]. D'un point de vue expérimentale, il est avantageux de faire la culture de cellules tumorales en 3D dans des gouttelettes suspendues, plutôt qu'en 2D sur monocouche de cellules, car les interactions intercellulaires et les contacts cellules-matrice seront davantage préservés et plus conformes à ce qui se retrouve en réalité *in vivo* [133, 134]. La culture *in vitro* en 3D permet alors de créer certaines conditions fondamentales à la progression tumorale *in vivo*. La culture des sphéroïdes tumoraux cellulaires est donc un modèle de culture cellulaire à la fois pratique et polyvalent, avec la possibilité de créer des structures plus complexes en incluant par exemple des co-cultures cellulaires. Ce modèle peut également servir dans des études sur la résistance multicellulaire des tumeurs [135-138]. La majorité de nos lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie ne forment pas de sphéroïdes compacts, à l'exception de la lignée pré-chimiothérapie OV2295 (Figure 27). Il semble y avoir, en général, une tendance voulant que les lignées post-chimiothérapie ne puissent pas former de structures compactes, contrairement à certaines lignées pré-chimiothérapie du CÉO qui ont été testé (Figure 27). Les lignées post-chimiothérapie forment plutôt des agrégats moins bien associés et de plus grande taille, comparativement aux lignées pré-chimiothérapie (Figure 27). Il se pourrait que les cellules formant des agrégats compacts soient moins sensibles à la chimiothérapie, car les structures plus compactes font en sorte que les cellules plus à l'intérieur seront moins exposées aux drogues chimiothérapeutiques. Les lignées de cellules contrôles TOV1946 et TOV112D, naïves pour la chimiothérapie, qui forment des sphéroïdes bien compacts et définis, sont reconnues comme étant plus agressives que les lignées ne formant pas de sphéroïde [85]. D'autres études ont démontré qu'il existe un lien entre la prédisposition des cellules tumorales à former des sphéroïdes et leur potentiel à former des tumeurs *in vivo* [86, 135, 136]. Plus précisément, plus les sphéroïdes sont compacts, moins il y a de pénétration médicamenteuse possible, d'où une résistance accrue aux traitements de drogues antitumorales [86, 135, 136]. Pour la patiente 2295, les lignées post-chimiothérapie (OV2295(2) et TOV2295) ne forment que des agrégats plus ou moins diffus, à l'opposé des sphéroïdes compacts formés par la lignée pré-chimiothérapie OV2295.

Il se pourrait alors que la chimiothérapie ait contribué à modifier certaines propriétés de ces cellules cancéreuses, par exemple en les rendant moins aptes à former des tumeurs compactes, tout en les rendant moins agressives suite à la chimiothérapie. En plus, nous avons ici deux lignées dérivées de cellules d'ascites de la même patiente, l'une pré-chimiothérapie (OV2295) et l'autre post-chimiothérapie (OV2295(2)), ce qui devrait faciliter davantage leur comparaison et mettre en évidence tout changement de propriétés cellulaires comme étant attribuable à l'effet de chimiothérapie. L'effet d'inhibition de compaction sur les cellules tumorales par la chimiothérapie pourrait aussi être valable pour la patiente 3133. Dans ce cas, nous observons la formation *in vitro* de structures cellulaires tridimensionnelles semi-compactes pour les lignées pré-chimiothérapie (TOV3133D et TOV3133G) en contraste avec la formation d'agrégats cellulaires pour les lignées post-chimiothérapie (OV3133 et OV3133(2)). Cependant, cette théorie ne pourrait pas encore être généralisée pour toutes les patientes du CÉO, car les lignées pré-chimiothérapie (TOV1369TR) et post-chimiothérapie (OV1369(2)) de la patiente 1369 ne semblent pas vraiment suivre cette logique, toutes deux pouvant difficilement former des structures tridimensionnelles *in vitro*. Cette situation pourrait s'expliquer autrement par le fait que TOV1369TR a été prélevée, non directement au niveau de l'ovaire, mais plutôt au niveau de la trompe utérine, qui représente un environnement tumoral potentiellement assez différent de l'ovaire et susceptible d'expliquer pourquoi cette lignée est celle, parmi toutes les nouvelles lignées du CÉO, qui ait le plus de difficulté à former des sphéroïdes compacts *in vitro*.

4.6 Capacité de nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie à former des tumeurs dans les souris SCID

Les souris SCID ont été utilisées comme modèle d'étude animal *in vivo* afin d'étudier le potentiel tumorigénique des lignées cellulaires. Les lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie des trois patientes ont formé des amas de cellules tumorales, dans les souris SCID, suite à des injections sous-cutanées des cellules correspondantes. Toutefois, les masses tumorales générées se développent lentement et n'augmentent pas significativement de taille, nous indiquant que celles-ci ne progressent pas au cours du temps (non prolifératives), contrairement aux lignées contrôles plus agressives qui évoluent et grossissent au cours du temps. Nous observons une progression tumorale limitée uniquement pour une des lignées post-chimiothérapie de la patiente 3133 (OV3133), et ce, dans seulement 66.7% des souris SCID. Ce résultat n'est pas observable pour l'autre lignée post-chimiothérapie de la même patiente (OV3133(2)). Encore une fois, cette différence peut s'expliquer par le fait que les lignées peuvent

être intrinsèquement très différentes l'une de l'autre, même si, dans ce cas-ci, elles sont dérivées de cellules d'ascites échantillonnées à partir d'une même patiente. Aussi, les lignées de cellules injectées, provenant de cellules tumorales humaines à l'origine, pourraient avoir plus de difficulté à former des tumeurs dans des souris SCID, car l'environnement tumoral que fournit le modèle de la souris ne reflète pas exactement celui de l'humain. Nous pourrions également optimiser les conditions d'injection de souris, au niveau de la cavité intrapéritonéale (site plus physiologique), afin de mieux évaluer leur capacité à induire de l'ascite ou à s'implanter dans la paroi et les organes de cette cavité, et ainsi, mieux cerner les différences potentielles de malignité des différentes lignées.

Conclusion

Nous avons, pour la première fois, caractérisé des lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie dérivées de mêmes patientes présentant un CÉO séreux de grade élevé et de stade avancé. Pour ces cancers avancés du CÉO, la thérapie conventionnelle consiste en une cytoréduction chirurgicale de la tumeur suivie d'un traitement de chimiothérapie. Malheureusement, la majorité des patientes présentant un CÉO avancé développeront une chimiorésistance et une récurrence de la maladie qui mèneront souvent au décès de la patiente. Ce projet avait donc pour but de caractériser un nouveau modèle de lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO qui pourrait être utilisé pour révéler des évènements moléculaires associés à la réponse au traitement de chimiothérapie. L'hypothèse était que ces nouvelles lignées possèderaient des différences, au niveau moléculaire et cellulaire, en lien avec leur statut de chimiorésistance, suite aux traitements chimiothérapeutiques des patientes. Nous avons d'abord confirmé l'origine épithéliale et ovarienne de nos lignées par immunohistochimie et immunobuvardage de type Western. Les marqueurs épithéliaux de kératines, HER2 et p53 ont été testés et analysés dans nos échantillons, et nous avons observé une conservation du profil d'expression de ces marqueurs entre les lignées dérivées et leurs tumeurs solides d'origine. Il existe des différences uniques entre les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie de chaque patiente en ce qui concerne leur morphologie cellulaire, leur prolifération cellulaire et leur capacité de migration *in vitro* en culture 2D. Les résultats de la formation de sphéroïdes, *in vitro* en culture 3D, semblent indiquer un effet possible de la chimiothérapie. En fait, nous observons qu'aucune des lignées post-chimiothérapie testées n'est capable de former des structures compactes, à l'opposé de certaines lignées pré-chimiothérapie. La chimiothérapie pourrait alors limiter la capacité des cellules tumorales à former des sphéroïdes compacts, par exemple en sélectionnant pour une population de cellules dont les liens intercellulaires sont plus faibles. Puisque les cellules cancéreuses ainsi sélectionnées seraient plus exposées aux drogues administrées, la survie tumorale diminuerait initialement, contribuant à prolonger quelque peu la survie de la patiente, avant que la chimiorésistance l'emporte de nouveau par un mécanisme encore inconnu. La majorité des lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie ne semblent pas former de tumeurs *in vivo* capables d'évoluer dans le temps dans des souris SCID. En somme, l'ensemble des résultats obtenus tend à soutenir l'hypothèse voulant que les lignées cellulaires pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie possèdent des propriétés qui leur sont propres et uniques. De plus, plusieurs analyses comparatives entre les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie sont possibles. Aussi, une variété de caractéristiques

cellulaires et moléculaires peuvent être comparées, selon des critères qui peuvent inclure la nature des lignées dérivées à partir de tumeurs solides (TOV) ou de cellules d'ascites (OV). Plusieurs horizons s'ouvrent alors à nous, et des études additionnelles, se servant de notre nouveau modèle de lignée pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie, pourraient nous aider à mieux évaluer l'évolution du CÉO à travers les traitements de chimiothérapie.

Perspectives

Nous avons actuellement en notre possession un modèle de lignées du CÉO qui nous permettrait d'étudier divers événements liés à la chimiothérapie et à la chimiorésistance. Afin de compléter davantage la caractérisation des nouvelles lignées cellulaires, des tests sur agar mou seront pris en compte pour évaluer la capacité des lignées à former des colonies. Nous espérons ainsi vérifier les observations réalisées concernant l'incapacité de former des tumeurs dans les souris xéno greffées. Des expériences préliminaires semblent indiquer que toutes nos lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO ont de la difficulté à former des colonies en agar mou, comparativement aux lignées contrôles utilisées. Il reste à valider ces observations, mais nous nous attendons déjà à ce que peu ou pas de colonies ou de tumeurs se forment *in vitro* (en agar mou) comme *in vivo* (dans des souris SCID). Par après, nous pourrions pousser les études plus loin, en examinant histologiquement les xéno greffes prélevées. De plus, des tests d'invasion pourront s'y ajouter pour évaluer le potentiel invasif des lignées. Ce type de test est en fait une forme combinée de migration et d'invasion de cellules, qui se fait *in vitro* en 3D à travers une matrice imitant une membrane basale. Des injections de souris en IP pourront également être réalisées afin de mieux évaluer la formation de tumeur à partir d'un site plus physiologique. Ces expériences additionnelles pourront fournir plus de détails quant à la tumorigenèse des cellules cancéreuses des lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie du CÉO. De plus, afin d'étudier l'effet des agents chimiothérapeutiques sur nos lignées ovariennes, des tests clonogéniques ont également été effectués au laboratoire. Ces expériences ont démontré, entre autres, une forte chimiorésistance acquise pour la carboplatine pour les lignées de la patiente 2295 et une chimiorésistance innée moins évidente pour le paclitaxel pour les lignées de la patiente 1369, cette dernière ayant, rappelons-le, déjà subi un traitement de chimiothérapie antérieur pour un cancer du sein. Ces nouvelles informations, obtenues par Isabelle Létourneau, semblent concorder avec un plus mauvais pronostic et une période de survie moindre pour la patiente 2295. Par ailleurs, des analyses PCR pourraient valider et compléter nos résultats en immunohistochimie. Des analyses mutationnelles et de micropuce à ADN seront complétées pour

la détection de certaines anomalies courantes impliquant *TP53*, *BRCA1/2*, *BRAF* et *KRAS*. Il serait également important d'identifier et d'étudier d'autres candidats potentiels pouvant contribuer à la chimiorésistance, innée ou acquise, dans le CÉO de type séreux. Par exemple, nous pourrions étudier PTEN qui agit négativement sur la voie PI3K/AKT en inhibant la phosphorylation d'AKT, des éléments dans la voie apoptotique comme TRAIL, XIAP, caspase-3, Bcl-2, PARP, FLIP, ou autres cibles d'intérêt comme NF- κ B, IKK β , IL-18, COX-2, MyD88, ou même certaines dérégulations, de la machinerie cellulaire ou de la réparation d'ADN impliquant, entre autres, RAD50, RAD51 en lien avec BRCA1/2 [139-153]. Nous pourrions aussi analyser le transcriptome des lignées par micropuce à ADN, puis utiliser les modèles cellulaires pour vérifier l'impact de ces protéines d'intérêt sur la chimiorésistance. De tels résultats serviront à mieux comprendre les différents mécanismes régissant les tumeurs malignes du CÉO de type séreux lorsque la chimiothérapie est impliquée. Il restera alors à optimiser les procédures à suivre pour maximiser les futurs traitements au cours du temps contre cette maladie redoutable, et ce, pour chaque patiente présentant un CÉO, en nous dirigeant ainsi vers une médecine plus personnalisée.

CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES

1. Kurman, R. J., *Blaustein's pathology of the female genital tract*. Baltimore: The Johns Hopkins Hospital, 2002.
2. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. *Cancer*, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42. doi: 10.1002/cncr.11345
3. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. *Endocr Rev*, 2001. **22**: p. 255-88.
4. Okamura, H., et al., *Ovulatory changes in the wall at the apex of the human Graafian follicle*. *J Reprod Fertil*, 1980. **58**(1): p. 153-5.
5. Naora, H. and D.J. Montell, *Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms*. *Nature Reviews*, 2005. **5**: p. 355-66.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**: p. 57-70.
7. Zitvogel, L., A. Tesniere and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 715-27.
8. Feki, A., et al., *Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009. **72**(1): p. 1-9.
9. Fujimoto, J., et al., *Novel screening technique for dissemination potential of ovarian cancer cells to peritoneum*. *Invasion Metastasis*, 1996. **16**(6): p. 302-7.
10. Société canadienne du cancer, Institut National du cancer du Canada, Statistique Canada, Registres du cancer des provinces et des territoires, Agence de la santé publique du Canada, *Statistiques canadiennes sur le cancer 2010*. Editor, 2010.
11. Binelli, C., et al., *Inhibin assays of ovarian cyst liquid obtained by needle aspiration may allow differential diagnosis between functional and organic cysts*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997. **73**(2): p. 161-5.
12. Boyle, K.J. and S. Torrealday, *Benign gynecologic conditions*. *Surg Clin North Am*, 2008. **88**(2): p. 245-64.
13. Ouellet, V., et al., *Immunohistochemical profiling of benign, low malignant potential and low grade serous epithelial ovarian tumors*. *BMC Cancer*, 2008. **8**(346).
14. Dietel, M. and S. Hauptmann, *Serous tumors of low malignant potential of the ovary*. *Diagnostic Pathology*. *Virchows Arch*, 2000. **436**(5): p. 403-12.
15. Bell, D.A., M.A. Weinstock, and R.E. Scully, *Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors : histologic features and prognosis*. *Cancer*, 1988. **62**: p. 2212-22.

16. Ozols, R.F., P.E. Schwartz, and P.J. Eifel, *Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma*. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1597-1632.
17. Burks, R.T., M.E. Sherman, and R.J. Kurman, *Micropapillary serous carcinoma of the ovary. A distinctive low-grade carcinoma related to serous borderline tumors*. *Am J Surg Pathol*, 1996. **20**(11): p. 1319-30.
18. Bast, R.C. Jr., B. Hennesy, and G.B. Mills, *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(6): p. 415-28.
19. Karst, A.M. and R. Drapkin, *Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution*. *Journal of Oncology*, 2010. p. 1-13. doi:10.1155/2010/932371
20. Kaku, T., et al., *Histological classification of ovarian cancer*. *Med Electron Microsc*, 2003. **36**(1): p. 9-17.
21. Silverberg, S.G., *Histopathological grading of ovarian carcinoma: a review and proposal*. *Int J Gynecol Pathol*, 2000. **19**(1): p. 7-15.
22. Benedet, J.L., et al., *Staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2000. **70**: p. 207-312.
23. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003. **83**: p. 135-66.
24. Malpica, A., *Grading of ovarian cancer: a histotype-specific approach*. *Int J Gynecol Pathol*, 2008. **27**: p. 175-81.
25. Shih, IeM. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. *Am J Pathol*, 2004. **164**: p. 1511-18.
26. Shih, IeM. and R.J. Kurman, *Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**: p. 7273-9.
27. Colombo, N., et al., *Ovarian cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006. **60**: p. 159-79.
28. Yancik, R., L.G. Ries, and J.W. Yates. *Ovarian cancer in the elderly: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results program data*. *Am J Obstet Gynecol*, 1986. **154**: p. 639-47.
29. Purdie, D.M., et al., *Body size and ovarian cancer: case-control study and systematic review (Australia)*. *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(9): p. 855-63.

30. Koushik, A., et al., *Fruits and vegetables and ovarian cancer risk in a pooled analysis of 12 cohort studies*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(9): p. 2160-7.
31. Salehi, F., et al., *Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2008. **11**(3): p. 301-21.
32. Zhang, Y., et al., *Cigarette smoking and increased risk of mucinous epithelial ovarian cancer*. *Am J Epidemiol*, 2004. **159**(2): p. 133-9.
33. Henderson, W.J, et al., *Talc and carcinoma of the ovary and cervix*. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of the British Commonwealth*, 1971. **78**: p. 266-72.
34. Harlow, B.L., et al., *Perineal exposure to talc and ovarian cancer risk*. *Obstet Gynecol*, 1992. **80**: p. 19-26.
35. Baan, R., et al., *Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**: p. 295-6.
36. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia?* *The Lancet*, 1971. p. 163.
37. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006. **247**: p. 4-21.
38. Risch, H.A., et al., *Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer*. *Am J Hum Genet*, 2001. **68**(3): p. 700-10.
39. Lee, H., et al., *Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2*. *Mol Cell*, 1999. **4**(1): p. 1-10.
40. Lu, M., et al., *Characterization of functional messenger RNA splice variants of BRCA1 expressed in nonmalignant and tumor-derived breast cells*. *Cancer Res*, 1996. **56**(20): p. 4578-81.
41. Petrucelli, N., M.B. Daly, and G.L. Feldman, *Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2*. *Genet Med*, 2010. **12**(5): p. 245-59.
42. Metcalfe, K., et al., *Contralateral Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. **22**(12): p. 2328-35.
43. Hall, M.J., et al., *BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer*. *Cancer*, 2009. **115**(10): p. 2222-33.
44. Murdoch, W.J. and A.C. McDonnel, *Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis*. *Reproduction*, 2002. **123**: p. 743-50.

45. Bell, D.A., *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*. Mod Pathol, 2005. **18** (Suppl 2): S19-32.
46. Vergara, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer*. Cancer Letters, 2010. **291**: p. 59-66.
47. Kobel, M., et al., *Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies*. PLoS Medicine, 2008. **5**(12): e232.
48. Prat, J., *Ovarian carcinomas, including secondary tumors: diagnostically challenging areas*. Mod Pathol, 2005. **18**: S99-S111.
49. Crum, C.P., et al., *Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer*. Clin Med Res, 2007a. **5**(1): p. 35-44.
50. Crum, C.P., et al., *The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007b. **19**(1): p. 3-9.
51. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. Clin, 2010. **60**: p. 277-300.
52. Klostergaard, J., K. Parga, and R.G. Raptis, *Current and future applications of magnetic resonance imaging (MRI) to breast and ovarian cancer patient management*. P R Health Sci J, 2010. **29**(3): p. 223-31.
53. Bast, R.C. Jr., et al., *New tumor markers: CA125 and beyond*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15** (Suppl 3): p. 274-81.
54. Jacobs and R. C. Bast Jr., *The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature*. Human Reproduction, 1989. **4**(1): p. 1-12.
55. Bast, R.C. Jr., et al., *Early detection of ovarian cancer: promise and reality*. Cancer Treat Res, 2002. **107**: p. 61-97.
56. Meden, H. and A. Fattani-Meiodi, *CA 125 in benign gynecological conditions*. International Journal of Biological Markers, 1998. **13**(4): p. 231-37.
57. Hawkins, R.E., et al., *The prognostic significance of the half-life of serum CA 125 in patients responding to chemotherapy for epithelial ovarian carcinoma*. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 1989. **96**: p. 1395-9.
58. Gaducci, A., et al., *Serum half-life of CA 125 during early chemotherapy as an independent prognostic variable for patients with advanced epithelial ovarian cancer: results of a multicentric Italian study*. Gynecologic Oncology, 1995. **58**: p. 42-7.
59. Goff, B.A., et al., *Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease*. Gynecologic Oncology, 1996. **68**(3): p. 412-7.

60. Itamochi, H., J. Kigawa, and N. Terakawa, *Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(4): p. 653-8.
61. Jacobsen, A., et al., *Dose-effect study of carboplatin in ovarian cancer: a Danish Ovarian Cancer Group study*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(1): p. 193-8.
62. Sarosy, G. and E. Reed, *Taxol dose intensification and its clinical implications*. *Journal of the National Medical Association*, 1993. **85**(6): p. 427-31.
63. Markman, M., *Rationale for maintenance or consolidation therapy in ovarian cancer*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2003. **1**(3): p. 176-8.
64. Pectasides, D. and E. Pectasides, *Maintenance or consolidation therapy in advanced ovarian cancer*. *Oncology*, 2006. **70**(5): p. 315-24.
65. Hess, L.M., et al., *Continued chemotherapy after complete response to primary therapy among women with advanced ovarian cancer: a meta-analysis*. *Cancer*, 2010. **116**(22): p. 5251-60.
66. Bell, J., et al., *Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecologic Oncology*, 2006. **102**: p. 432-9.
67. Wani, M.C., et al., *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971. **93**: p. 2325-7.
68. Park, J.E., et al., *Paclitaxel stimulates chromosomal fusion and instability in cells with dysfunctional telomeres: implication in multinucleation and chemosensitization*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **404**(2): p. 615-21.
69. Kohn, E.C., et al., *Dose-intense taxol: high response rate in patients with platinum-resistant recurrent ovarian cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(1): p. 18-24.
70. Gregory, R.E. and A.F. DeLisa, *Paclitaxel: a new antineoplastic agent for refractory ovarian cancer*. *Clin Pharm*, 1993. **12**(6): p. 401-15.
71. Wheate, N.J., et al., *The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials*. *Dalton Trans*, 2010. **39**: p. 8113-27.
72. Matsuo, K., et al., *Prediction of chemotherapy response with platinum and taxane in the advanced stage of ovarian and uterine carcinosarcoma: a clinical implication of in vitro drug resistance assay*. *Am J Clin Oncol*, 2010. **33**(4): p. 358-63.
73. Matsuo, K., et al., *Chemotherapy time interval and development of platinum and taxane resistance in ovarian, fallopian, and peritoneal carcinomas*. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. **281**(2): p. 325-8.

74. Matsuo, K., et al., *Overcoming platinum resistance in ovarian carcinoma*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010. **19**(11): p. 1339-54.
75. Reinhold, W.C., et al., *Apoptotic susceptibility of cancer cells selected for camptothecin resistance: gene expression profiling, functional analysis, and molecular interaction mapping*. *Cancer Res*, 2003. **63**(5): p. 1000-11.
76. Fraser, M., et al., *Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003. **1**(66): p. 1-13. doi: 10.1186/1477-7827-1-66
77. Hewitt, S.M., et al., *Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue*. *Arch Pathol Lab Med*, 2008. **132**(12): p. 1929-35.
78. Kubacher, C.M., et al., *Isolation and culture of ovarian cancer cells and cell lines*. *Methods Mol Biol*, 2011. **731**: p. 161-80.
79. Lounis, H., et al., *Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies*. *Experimental Cell Research*, 1994. **215**: p. 303-9.
80. Kruk, P.A., S.L. Maines-Bandiera, and N. Auersperg, *A simplified method to culture human ovarian surface epithelium*. *Lab Invest*. 1990. **63**: p. 132-6.
81. Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. *Nature*, 1983. **301**: p. 527-30.
82. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. *BMC Molecular Biology*, 2006. **7**(3). doi: 10.1186/1471-2199-7-3
83. Liang, C.C., A.Y. Park and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. *Nature Protocols*, 2007. **2**: p. 329-33.
84. Entschladen, F., et al., *Analysis methods of human cell migration*. *Experimental Cell Research*, 2005. **307**: p. 418-26.
85. Zietarska, M., et al., *Molecular description of a 3-D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC)*. *Mol Carcinog*, 2007. **46**: p. 872-85.
86. Sodek, K.L., M.J. Ringuette and T.J. Brown, *Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behaviour and an invasive phenotype*. *Int J Cancer*, 2009. **124**: p. 2060-70. doi: 10.1002/ijc.24188
87. Wauters, A.P., et al., *Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary*. *Human Pathology*, 1995. **26**(8): p. 852-5.

88. Omary, M.B., et al., *Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1794-1805.
89. Martin, P.J.C, et al., *Overexpression and prognostic value of p53 and HER2/neu proteins in benign ovarian tissue and in ovarian cancer*. Med Clin, 2007. **128**(1): p. 1-6.
90. Feng, Q., et al., *DNA Hypermethylation, Her-2/neu Overexpression and p53 Mutations in Ovarian Carcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. **111**(2): p. 320-329.
91. Ramieri, M.T., et al., *Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma*. Anticancer Res, 2010. **30**(4): p. 1287-92.
92. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
93. Coomber, B.L. and A.I. Gotlieb, *In vitro endothelial wound repair. Interaction of cell migration and proliferation*. Arteriosclerosis, 1990. **10**: p. 215-22.
94. Wong, M.K. and A.I. Gotlieb, *The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization*. J Cell Biol, 1988. **107**: p. 1777-83.
95. Zahm, J.M., et al., *Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium*. Cell Motil Cytoskeleton, 1997. **37**: p. 33-43.
96. Ouellet, V., et al., *Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines*. BMC Cancer, 2008b. **8**(152).
97. Provencher, D.M., et al., *Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000. **36**(6): p. 357-61.
98. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. J Immunol, 1995. **154**: p. 180-91.
99. Langdon, S.P., et al., *Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**: p. 6166-72.
100. McCluggage, W.G., et al., *Morphological effects of chemotherapy on ovarian carcinoma*. J Clin Pathol, 2002. **55**: p. 27-31.
101. Jazaeri, A.A., et al., *Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6300-10.
102. Felding-Haberman, B., *Integrin adhesion receptors in tumor metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(3): p. 203-13.

103. Chu, P., E. Wu, and L. Weiss, *Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases*. *Mod Pathol*, 2000. **13**(9): p. 962-72.
104. Tot, T., *Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(6): p. 758-63.
105. Dyck, H.G., et al., *Autonomy of the epithelial phenotype in human ovarian surface epithelium: changes with neoplastic progression and with a family history of ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 1996. **69**(6): p. 429-36.
106. Siemens, C.H. and N. Auersperg, *Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture*. *J Cell Physiol*, 1988. **134**(3): p. 347-56.
107. Schechter, A.L., et al., *The neu oncogene: an erbB-related gene encoding a 185,000 Mr tumour antigen*. *Nature*, 1984. **312**: p. 513-6.
108. de Graeff, P., et al., *The ErbB signalling pathway: protein expression and prognostic value in epithelial ovarian cancer*. *British Journal of Cancer*, 2008. **99**: p. 341-9.
109. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**: p. 127-37.
110. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**: p. 177-82.
111. Meden, H., et al., *EGF-R and overexpression of the oncogene c-erbB-2 in ovarian cancer: immunohistochemical findings and prognostic value*. *J Obstet Gynaecol*, 1995. **21**: p. 167-78.
112. Purdie, C.A., et al., *Increased mortality in HER2 positive, oestrogen receptor positive invasive breast cancer: a population-based study*. *BJC*, 2010. **103**: p. 475-81.
113. Pritchard, K.I., et al., *HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy*. *N Engl J Med*, 2006. **354**: p. 2103-11.
114. Aunoble, B., et al., *Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer*. *Int J Oncol*, 2000. **16**: p. 567-76.
115. Serrano-Olvera, A., et al., *Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2006. **32**: p. 180-90.
116. Tueffert, M., et al., *HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients*. *PLoS ONE*, 2007. **2**(11): e1138.
117. Calvo, B.F., et al., *Human epidermal receptor-2 expression in prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**: p. 1087-97.

118. Meden, H. and W. Kuhn, *Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor*. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol, 1997. **71**: p. 173-9.
119. Afify, A.M., B.A. Werness, and H.F. Mark, *HER-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary serous carcinoma*. Experimental and Molecular Pathology, 1999. **66**(2): p. 163-9.
120. Marks, J.R., et al., *Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer*. Cancer Res, 1991. **51**: p. 2979-84.
121. Okamoto, A., et al., *Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer*. Cancer Res, 1991. **51**: p. 5171-6.
122. Lassus, H., et al., *Distinct subtypes of serous ovarian carcinoma identified by p53 determination*. Gynecol Onco, 2003. **91**(3): p. 504-12.
123. Corney, D.C., et al., *Role of p53 and Rb in ovarian cancer*. Adv Exp Med Biol, **622**: p. 99-117.
124. Appella, E. And C.W. Anderson, *Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses*. Eur J Biochem, 2001. **268**: p. 2764-72.
125. Hofseth., L.J., et al., *p53: 25 years after its discovery*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**: p. 177-81.
126. Righetti, S.C., et al., *Comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**: p. 689-93.
127. Nijman, H.W., et al., *Influence of chemotherapy on the expression of p53, HER-2/neu and proliferation markers in ovarian cancer*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 1999. **83**: p. 201-6.
128. Yarrow, J.C., et al., *A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods*. BMC Biotechnol, 2004. **4**: p. 21– 30.
129. Chambers, A. F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nature Rev Cancer, 2002. **2**: p. 563-57.
130. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nature, 2003. **3**: p. 362-74.
131. Le Page, C., et al., *BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis*. Journal of Ovarian Research, 2009. **2**(4).
132. Theriault, B.L., et al., *BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells*. Carcinogenesis, 2007. **28**(6): p. 1153-62.

133. Friedrich, J., R. Ebner, and L.A. Kunz-Shughart, *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?* Int J Radiat Biol, 2007. **83**(11-12): p. 849-71.
134. Sutherland, R.M, *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model.* Science, 1988. **8**: p. 177-84.
135. Desoize, B., D. Gimonet, and J.C. Jardiller, *Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance.* Anticancer Res, 1998. **18**: p. 4147-58.
136. Yoshida, Y., et al., *Laminin-1-derived scrambled peptide AG73T disaggregates laminin-1-induced ovarian cancer cell spheroids and improves the efficacy of cisplatin.* International Journal of Oncology, 2008. **32**: p. 673-81.
137. Graham, C.H., et al., *Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents.* J Natl Cancer Inst, 1994. **86**: p. 975-82.
138. Kerbel, R.S., et al., *Multicellular resistance: a new paradigm to explain aspects of acquired drug resistance of solid tumors.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994. **59**: p. 661-72.
139. Sansal, I. and W.R. Sellers, *The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway.* Journal of Clinical Oncology, 2004. **22**(14): p. 2954-63.
140. Ouellet, V., et al., *An apoptotic molecular network identified by microarray: on the TRAIL to new insights in epithelial ovarian cancer.* Cancer, 2007. **110**(2): p. 297-308.
141. Saulle, E., et al., *Proteasome inhibitors sensitize ovarian cancer cells to TRAIL induced apoptosis.* Apoptosis, 2007. **12**: p. 635-55.
142. Asselin, E., G.B. Mills, and B.K. Tsang, *XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.* Cancer Research, 2001. **61**: p. 1862-8.
143. Abedini, M.R., et al., *Possible role of FLICE-like inhibitory protein (FLIP) in chemoresistant ovarian cancer cells in vitro.* Oncogene, 2004. **23**: p. 6997-7004.
144. Solomon, L.A., et al., *Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by genistein: the role of NF-kappaB.* J Ovarian Res, 2008. **1**(9).
145. Yang, G., et al., *The biphasic role of NF-kB in progression and chemoresistance of ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2181-94.
146. Chen, R., et al., *Regulation of IKK β by miR-199a affects NF-kB activity in ovarian cancer cells.* Oncogene, 2008. **27**: p. 4712-23.
147. Le Page, C., et al., *From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer.* Int J Cancer, 2006. **118**: p. 1750-8.

148. Ferrandina, G., et al., *Cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) expression and resistance to platinum versus platinum/paclitaxel containing chemotherapy in advanced ovarian cancer*. BMC Cancer, 2006. **6**(182).
149. Silasi, D.-A., et al., *MyD88 predicts chemoresistance to paclitaxel in epithelial ovarian cancer*. Yale Journal of Biology and Medicine, 2006. **79**: p. 153-63.
150. Poulain, L., et al., *Acquisition of chemoresistance in a human ovarian carcinoma cell line is linked to a defect in cell cycle control*. Int J Cancer, 1998. **78**: p. 454-63.
151. Wiltshire, T., et al., *BRCA1 contributes to cell cycle arrest and chemoresistance in response to the anticancer agent iriflufen*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 1051-60.
152. Selvakumanran, M., et al., *Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines*. Cancer Research, 2003. **63**: p. 1311-6.
153. Abuzeid, W.M., et al., *Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy*. J Clin Invest. **119**: p. 1974-85.

CHAPITRE 6 : ANNEXES

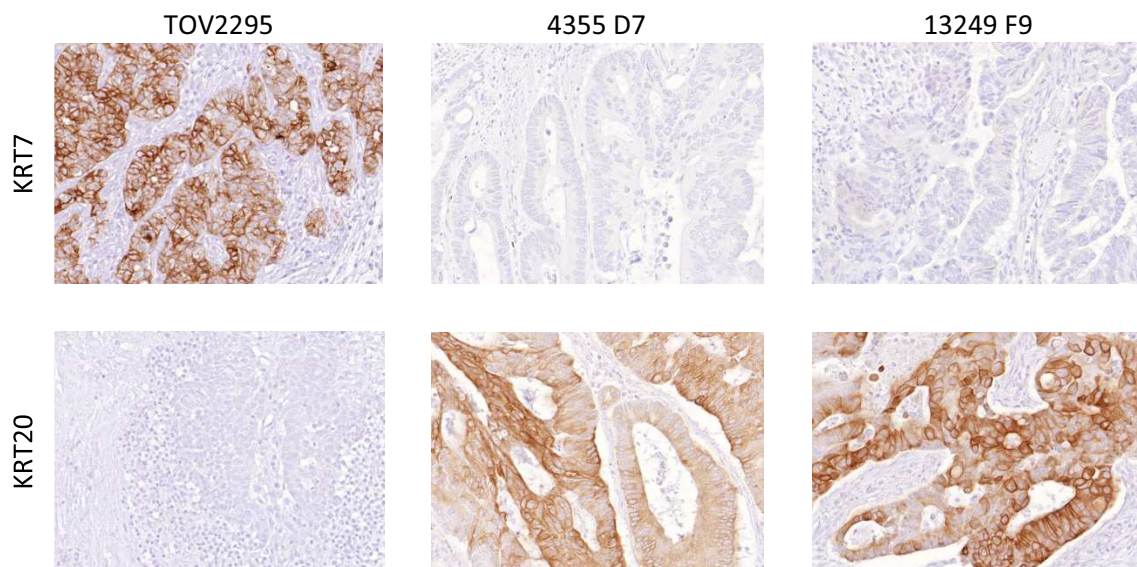


Figure supplémentaire 1 : Comparaison de l'expression *in situ* de KRT7 et de KRT20 dans des tumeurs du CÉO et du carcinome du côlon. Les deux carcinomes du côlon (4355 D7 et 13239 F9), provenant de la banque de tumeurs du CHUM, ont été utilisés comme contrôles positifs pour KRT20 et contrôles négatifs pour KRT7. Comme attendu, la relation est inversée pour une représentante des tumeurs solides du CÉO (TOV2295) : celle-ci est négative pour KRT20, mais positive pour KRT7.

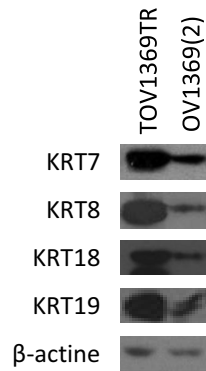


Figure supplémentaire 2 : Expression *in vitro* des kératines dans les lignées de la patiente 1369.

La lignée OV1369(2) semble exprimer toutes les kératines testées ici, mais semble en exprimer beaucoup moins que la lignée TOV1369TR dérivée de la même patiente. Puisque la lignée OV1369(2) semble exprimer KRT7, ainsi que KRT8, 18, et 19, elle apparaît comme de nature épithéliale et ovarienne.

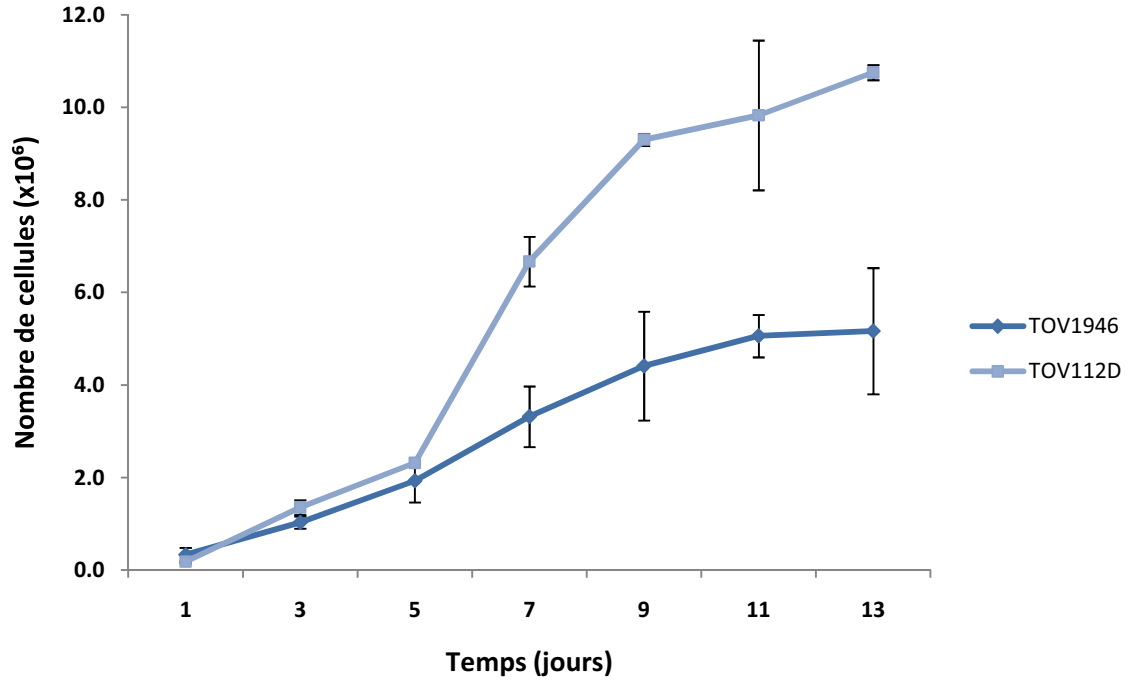


Figure supplémentaire 3 : Taux de croissance des lignées contrôles du CÉO. Les courbes de croissance, des lignées contrôles TOV1946 et TOV112D, ont été obtenues en même temps et aux mêmes conditions que pour nos nouvelles lignées du CÉO.

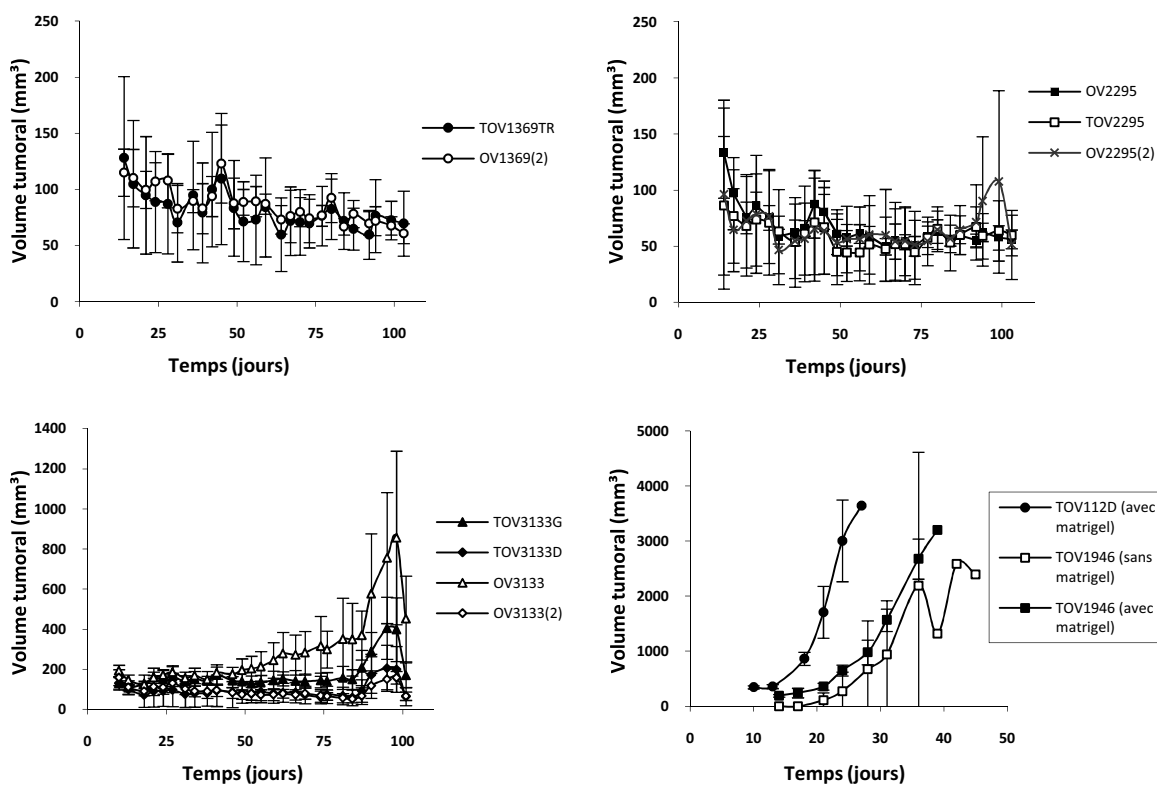


Figure supplémentaire 4 : Suivi tumoral dans les souris SCID suite à des xénogreffes de lignées spécifiques du CÉO. Les xénogreffes de souris SCID ont été réalisées en sous-cutané (n=6). Les lignées contrôles TOV1946 et TOV112D ont formé des tumeurs dans toutes les souris SCID. En comparaison, il n’y a que la lignée OV3133, parmi toutes nos nouvelles lignées, qui semble pouvoir former des tumeurs, mais seulement dans 4/6 souris SCID utilisées.

Échantillon testé	Mutation <i>TP53</i>	Statut de la mutation
TOV1369TR	EX7 G>T, G244C	homozygote
OV1369(2)	EX7 G>T, G244C	homozygote
OV2295	EX6+25 T>C, I195T	homozygote
OV2295(2)	EX6+25 T>C, I195T	homozygote
TOV2295	EX6+25 T>C, I195T	homozygote
TOV3133G	EX6+15 C>T, Q192X	homozygote
TOV3133D	EX6+15 C>T, Q192X	homozygote
OV3133	EX6+15 C>T, Q192X	homozygote
OV3133(2)	EX6+15 C>T, Q192X	homozygote

Tableau supplémentaire : Mutation *TP53* dans les lignées pré-chimiothérapie et post-chimiothérapie des patientes 1369, 2295 et 3133 présentant un CÉO. Les mutations somatiques ci-dessus sont toutes des mutations homozygotes. Il a été observé que les lignées d'une même patiente, présentant un CÉO, possèdent une mutation commune au gène *TP53*. Ces informations ont été recueillies auprès du laboratoire de Dre Patricia Tonin via Suzanna Arcand.

